

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
Vorstand: Prof. Dr. S. Endres

Klinik der Ludwig-Maximilian-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

Modulation der Viruserkennung durch die RNA-Helikase LGP2

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



vorgelegt von
Johannes Peter Raps
aus Augsburg

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. A. Moosmann
Prof. Dr. med. H. Rüssmann

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Schmidt

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

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2020

Meiner Familie gewidmet

Eidesstattliche Versicherung

Raps, Johannes Peter

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

Modulation der Viruserkennung durch die RNA-Helikase LGP2

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, 17.11.2020

Ort, Datum

Johannes Peter Raps

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlegende Funktion des Immunsystems	1
1.2	Das angeborene und erworbene Immunsystem	1
1.3	Das Prinzip der Mustererkennung	2
1.4	RIG-I-like-Helikasen	4
1.4.1	RIG-I	4
1.4.2	MDA5	6
1.4.3	LGP2	7
1.4.4	Aktivierung des Interferonsystems durch die RIG-I-like-Helikasen	10
1.5	Viren	10
1.5.1	Negativ-Strang RNA Viren	11
1.6	Fragestellung und Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	15
2.1.3	Reagenziensätze (Kits)	16
2.1.4	Reagenzien	16
2.1.5	Software	19
2.1.6	Puffer	19
2.1.7	RNA Oligonukleotide	21
2.1.8	<i>Small-interfering</i> RNA (siRNA)	22
2.1.9	qRT-PCR Primer und Sonden	23
2.1.10	Primer für <i>Northern blot</i> Sonden	23
2.1.11	Plasmide	23
2.1.12	Rekombinante Proteine	24
2.1.13	Antikörper	24
2.1.14	Bakterienstämme	25
2.1.15	Zelllinien	25
2.1.16	Viren	26
2.2	Zellulär-immunologische Methoden	26

2.2.1	Zellkultur	26
2.2.2	Transfektion und Stimulation	27
2.2.3	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA)	28
2.2.4	Quantitative <i>reverse transcribed</i> Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)	28
2.2.5	Herstellung von Zelllysaten	30
2.2.6	Co-Immunpräzipitation	30
2.3	Proteinbiochemische Methoden	31
2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	31
2.3.2	Protein Färbung	32
2.3.3	<i>Western blot</i>	32
2.3.4	Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>Native</i> -PAGE)	33
2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	33
2.3.6	<i>Northern blot</i>	34
2.3.7	ATPase Assay	35
2.3.8	Aufreinigung von rekombinanten Proteinkonstrukten	36
2.3.9	Produktion von LGP2-RD Antiseren	39
2.3.10	Aufreinigung von rekombinatem LGP2 und LGP2 K30A	41
2.3.11	Aufreinigung von Ribonukleoprotein Partikeln aus VSV Virionen	43
2.4	Enzymkinetische Auswertung	45
2.5	Statistische Analyse	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Der <i>knockdown</i> von LGP2 verringert im Zellsystem die stimulationsabhängige Produktion antiviraler Zytokine	48
3.2	LGP2 interagiert mit RIG-I Stimulus-abhängig	52
3.3	Aktivierung der DExD/H Box ATPase Domäne von LGP2 und MDA5	53
3.3.1	Rekombinantes LGP2 hydrolysiert ATP <i>in vitro</i>	54
3.3.2	Die Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 erfolgt unabhängig von einer 5'-Modifikation des Liganden <i>in vitro</i>	56
3.3.3	10 Basenpaarungen sind ausreichend zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2	58
3.3.4	Doppelstrang-RNA ab etwa 100 Basenpaaren aktiviert die ATPase Domäne von MDA5	60
3.3.5	Die ATP-Hydrolyse von MDA5 ist unabhängig von einer 5'-Phosphorylierung des RNA Liganden	63

3.4	LGP2 bildet stimulusabhängig hochmolekulare Oligomere <i>in vitro</i>	64
3.5	Enzymkinetische Charakterisierung von LGP2, MDA5 und RIG-I	66
3.5.1	Die Fließgleichgewichtsparameter von LGP2 und MDA5	67
3.5.2	LGP2 zeigt eine hohe basale ATP Hydrolyserate ohne Anwesenheit eines RNA Liganden	68
3.6	VSV RNPs	71
3.6.1	VSV RNPs lassen sich mit 1 % Triton X-100 in großer Reinheit aufreinigen	71
3.6.2	Aufgereinigte RNPs enthalten VSV Vollängen-Genom und VSV DI-LT Genom	73
3.6.3	Chromatographische Analyse der Reinheit der RNP Präparationen	75
3.7	VSV RNPs aktivieren die ATPase Domäne von LGP2 <i>in vitro</i>	78
4	Diskussion	79
4.1	Ergebnisübersicht	79
4.2	Interpretation der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur	80
4.2.1	LGP2 ist ein positiver Regulator für RIG-I und MDA5 im Zellsystem	81
4.2.2	LGP2 interagiert mit RIG-I und bildet Oligomere	84
4.2.3	LGP2 und MDA5 erkennen distinkte RNA Liganden	86
4.2.4	LGP2 zeigt eine konstitutiv aktive, basale ATP Hydrolyserate	88
4.2.5	RNPs lassen sich aus Virionen aufreinigen und aktivieren die ATPase Domäne von LGP2	91
4.3	Ausblick und klinische Relevanz	96
5	Zusammenfassung	99
6	Literaturverzeichnis	101
7	Abkürzungen und Akronyme	110
8	Präsentationen und Poster	113
8.1	Vorträge	113
8.2	Posterpräsentationen	113
9	Danksagung	114

1 Einleitung

1.1 Grundlegende Funktion des Immunsystems

Der menschliche Körper ist als Organismus ständig einer Vielzahl verschiedenster Mikroorganismen ausgesetzt, die sowohl auf, als auch in ihm leben. Entwicklungsgeschichtlich hat sich mit dem Auftreten immer höher organisierter Organismen ein komplexes Netzwerk verschiedenster molekularer und zellgebundener Mechanismen zur Abwehr eindringender Pathogene entwickelt. Das dadurch entstandene Immunsystem ermöglicht ein aktives Auseinandersetzen des Organismus mit den ihn umgebenden Mikroorganismen. Zu diesen Mikroorganismen gehören Bakterien, Viren, Pilze und ein- oder vielzellige Parasiten. Die ersten Abwehrmechanismen, die ein Eindringen pathogener Erreger verhindern, sind mechanische und chemische Barrieren wie die Haut oder die mukoziliäre *clearance* des Respirationstraktes [1].

1.2 Das angeborene und erworbene Immunsystem

Das menschliche Immunsystem muss eine Vielzahl an komplexen Erregern erkennen und bekämpfen können. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, ergänzen sich die genetisch fest kodierten Mechanismen des sogenannten angeborenen Immunsystems mit den spezifischen Abwehrmöglichkeiten der adaptiven Immunität, die auf den Erreger maßgeschneidert werden.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehrlinie zur Detektion und Abwehr verschiedenster Pathogene dar. Dieses phylogenetisch sehr alte System basiert auf einer Reihe konservierter Rezeptor- und Effektormoleküle. Auf molekularer Ebene findet die Erkennung mikrobieller Erreger nach dem Prinzip der Mustererkennung statt. Dabei werden bestimmte mikrobielle Strukturen und molekulare Muster, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) von Mustererkennungsrezeptoren (*pathogen-recognition* Rezeptor, PRR) erkannt. Diese genetisch fest kodierten Rezeptoren sind teilweise ubiquitär exprimiert und aktivieren Signalkaskaden zur Initiierung vorprogrammierter, antimikrobieller Abwehrprogramme. Durch die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, Typ-I-Interferonen und verschiedenen antimikrobiellen Peptiden kann die Infektion auf lokaler und zellulärer Ebene bekämpft werden. Darüber hinaus werden spezialisierte Immunzellen rekrutiert, um eine Ausbreitung auf andere Regionen zu verhindern. Dabei spielen vor allem Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen eine wichtige Rolle. Diese sogenannten Antigen-präsentierenden Zellen können nach Aktivierung durch die rezeptorvermittelten Signalkaskaden wiederum Lymphozyten aktivieren und stellen so die Verbindung zur erworbenen Immunität her. Durch dieses System kann der Organismus sehr schnell und unmittelbar auf eine Vielzahl von Erregern reagieren. Die meisten Erreger, die in den Organismus eindringen, können so innerhalb von Minuten bis Stunden beseitigt werden, ohne

dass der Organismus in seiner Integrität beeinträchtigt wird. Die hohe Konservierung dieses Systems bringt jedoch auch mit sich, dass die angeborene Immunität nur unspezifisch wirken kann und anfällig für verschiedene Umgehungsstrategien der pathogenen Keime ist [2-4].

Das adaptive Immunsystem ist in seiner Funktion untrennbar mit der angeborenen Immunität verwoben. T- und B-Lymphozyten als zelluläre Vertreter können durch somatische Rekombination und somatische Hypermutation eine sehr große Vielzahl verschiedener Rezeptoren bilden und ermöglichen eine effektive und antigenspezifische Immunantwort. Dieser Prozess ist bis ins Detail reguliert. So muss jeder mit seinem individuellen Rezeptormolekül ausgestattete Lymphozyt während seiner Entwicklung einen komplexen Prozess positiver und negativer Selektion durchlaufen, um körpereigene von körperfremden Antigenen unterscheiden zu können [5]. Die Aktivierung durch das angeborene Immunsystem kann jedoch die klonale Selektion und Proliferation von T- und B-Zellen als Antwort auf eine Infektion initiieren [6]. Dies ermöglicht die Bildung von Antikörpern durch reife B-Zellen, die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, sowie die Differenzierung von langlebigen Gedächtniszellen, um bei einer Reinfektion schneller reagieren zu können. Die adaptive Immunität ist im Kampf gegen pathogene Keime äußerst effektiv, kann aber aufgrund des aufwändigen Selektions- und Aktivierungsprozesses erst mit einer Latenz von einigen Tagen seine volle Wirkung entfalten. Erst das zeitliche und funktionelle Zusammenwirken der angeborenen und erworbenen Immunität gewährleistet eine effektive und schnelle Abwehr pathogener Mikroorganismen [1].

1.3 Das Prinzip der Mustererkennung

Eine integrale Aufgabe des Immunsystems ist die Unterscheidung von Selbst und Fremd, die untrennbar mit der Erkennung und Abwehr von Pathogenen einhergeht. Ein für PAMPs wesentliches Charakteristikum ist daher, dass diese molekularen Muster im menschlichen Organismus nicht, oder nur in bestimmten Kompartimenten vorkommen und somit ein spezifisches Erkennungsmerkmal für Pathogene darstellen. Aufgrund des limitierten Repertoires an genetisch fest kodierten Rezeptoren müssen außerdem Muster erkannt werden, die in einer großen Bandbreite an pathogenen Keimen vorkommen. Um eine Umgehung der Erkennung durch das Immunsystem durch Mutationen zu vermeiden, sind PAMPs in der Regel essenziell für das Überleben und die Integrität des Mikroorganismus und hoch konserviert [4]. Konkret handelt es sich meist um Nukleinsäuren, Peptide, Zellwandbestandteile oder komplexe Glykopeptide. Entsprechend ihrer Lokalisation können zytoplasmatische von membrangebundenen Signal- und Phagozytoserezeptoren unterschieden werden [3,7,8].

Viren stellen bei der Erkennung eine Herausforderung dar, da diese keinen eigenen Stoffwechsel besitzen und zur Replikation auf den Metabolismus der Zielzelle angewiesen sind. Daher sind virale Bestandteile nur schwer von zelleigenen Strukturen zu unterscheiden. Virale Infektionen werden durch PRRs meist anhand viraler Nukleinsäuren erkannt. Diese verfügen oft über bestimmte körperfremde Modifikationen und Sequenzmotive, oder befinden sich in zellulären Kompartiments, in denen ähnliche zelleigene Strukturen nicht vorkommen [9]. Koevolutionär zur großen Diversität viraler Entitäten hat sich eine Vielzahl an PRRs zur Erkennung viraler Strukturen entwickelt. Viren besetzen und kapern während ihres Lebenszyklus verschiedene Zellkompartimente, dementsprechend existieren für die verschiedenen Kompartimente und verschiedenen viralen Entitäten spezifische PRRs [10].

Bei der Familie der sogenannten Toll-*like* Rezeptoren (TLR) handelt es sich um eine phylogenetisch alte und hoch konservierte Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren, die Strukturen verschiedenster Pathogengruppen erkennen können. Beim Menschen sind zehn verschiedene Vertreter beschrieben, die pathogene Muster über eine extrazellulär oder endosomal lokalisierte Leucin-reiche Region (*leucin-rich region*, LRR) erkennen. Die Rezeptoren TLR 3, 7, 8 und 9 sind in endosomalen Strukturen von spezialisierten Zellen des Immunsystems wie dendritischen Zellen lokalisiert. Sie erkennen Nukleinsäuren als PAMPs, die im Endosom prozessiert wurden und tragen so maßgeblich zur Erkennung von Viren und bestimmter Bakterien bei. Dabei erkennen TLR 7 und 8 einzelsträngige und TLR 3 doppelsträngige RNA. Das PAMP von TLR 9 ist unmethylierte CpG DNA [8,11-13].

Die zytoplasmatischen NOD-*like* Rezeptoren (NLR) benutzen wie TLRs eine LRR zur Erkennung pathogener Muster. Sie erkennen zytoplasmatische PAMPs und kommen in verschiedenen Zelltypen wie Makrophagen, dendritische Zellen oder Epithelzellen vor, die als Grenze zur Umwelt regelmäßig mit mikrobiellen Strukturen exponiert sind. Mitglieder der NLR Familie sind darüber hinaus am Aufbau einer zytoplasmatischen Signalplattform, dem sogenannten Inflammasom, beteiligt. Neben der Expression von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β kann durch die Aktivierung der NLR auch Apoptose induziert werden [14,15].

Der erst kürzlich entdeckte Rezeptor *cyclic GMP-AMP synthase* (cGAS) ist ein weiterer Rezeptor, der an der Erkennung viraler Nukleinsäuren beteiligt ist. Nach der Erkennung von DNA im Zytosol bildet cGAS den Botenstoff zyklisches GMP-AMP. Dieser löst durch die Bindung an das Adapterprotein STING ein komplexes antivirales Abwehrprogramm aus [16-19].

Die RIG-I-*like* Helikasen sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit und werden im Folgenden detaillierter beschrieben.

1.4 RIG-I-like-Helikasen

Die Familie der RIG-I-like Helikasen (RLH) besteht aus drei Vertretern: *Retinoic acid-inducible gene-1* (RIG-I), *Melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *Laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) (siehe Abb. 1.1). Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems kommen die RLHs fast ubiquitär in allen kernhaltigen Zellen des Körpers vor [20,21]. Bei den RLHs handelt es sich um eine Familie von RNA Rezeptoren, die essenziell zur Erkennung einer großen Bandbreite an RNA Viren und einiger DNA Viren sind. Nach Aktivierung wird eine Signalkaskade ausgelöst, die schlussendlich ein komplexes antivirales Abwehrprogramm startet, das wesentlich auf der Produktion von Typ-I-Interferonen basiert [22].

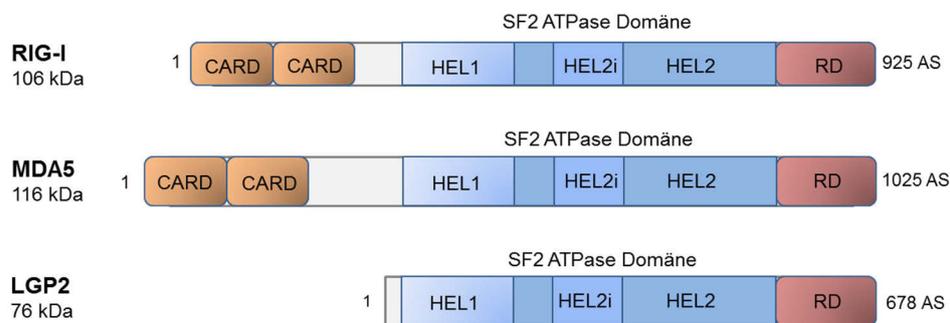


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung der RIG-I-like-Helikasen
Modifiziert nach Yoneyama et al. und Schmidt et al. [23,24].

1.4.1 RIG-I

Der namensgebende Vertreter der RLH Familie RIG-I wurde ursprünglich als Gen beschrieben, das in promyelozytischen Leukämiezellen nach Therapie mit Retinolsäure verstärkt exprimiert wird und die Expression von Interferon- β (IFN- β) induzieren kann [22,25]. Erst 2004 konnte RIG-I als Rezeptor für virale RNA und Induktor des Promotors von Typ-I-Interferonen identifiziert werden [26].

RIG-I gehört wie die anderen Mitglieder der RLH-Familie zur Gruppe der *superfamily 2* (SF2) Helikasen. Am carboxy-terminalen Ende (C-Terminus) trägt RIG-I eine regulatorische Domäne (RD), welche über die Ligandenspezifität entscheidet und bei der Erkennung und Bindung viraler RNA eine wichtige Rolle spielt [27,28].

Das Zentrum von RIG-I wird von einer ligandenabhängigen DExD/H-box RNA Helikase Domäne (ATPase Domäne) eingenommen. Die Funktion der von ihr vermittelten ATP-Hydrolyse ist noch nicht zweifelsfrei geklärt. Das sogenannte *Walker-A-motif*, das als

zentrale Sequenz für die Hydrolyse von ATP zuständig ist, ist für die Signaltransduktion durch RIG-I jedoch essenziell [26,29].

Am amino-Terminus (N-Terminus) ist RIG-I mit zwei *caspase activation and recruitment domain* (CARD) Domänen ausgestattet. Diese sind modulare Bausteine zur Protein-Protein Interaktion und ebenfalls essenziell für die Signalübertragung [26,30].

Das zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit angenommene Modell zur molekularen Aktivierung von RIG-I basiert hauptsächlich auf kristallographischen Analysen. In Abwesenheit von RNA Liganden befindet sich RIG-I in einer inaktiven Konformation, wobei die RD-Domäne die Helikase Domäne bedeckt. Die CARD-Domänen werden durch intramolekulare Bindungen mit der ATPase Domäne im Sinne einer sterischen Hinderung maskiert, wodurch die Aktivierung von RIG-I blockiert wird [31-33]. Nach der Bindung von RNA findet eine ATP-abhängige Konformationsänderung statt, wodurch der auto-inhibierte Zustand aufgehoben wird [28,31,34]. Erst jetzt werden die CARD-Domänen durch die Hydrolyse von ATP exponiert und eine Interaktion mit den CARD-Domänen des mitochondrialen Adapterproteins *mitochondrial-antiviral-signaling* Protein (MAVS) ermöglicht [35]. Unter ATP-Hydrolyse erfolgt darüber hinaus die Translokation von RIG-I entlang des RNA Liganden [36]. Dadurch wird das 5'-Triphosphat Ende wieder für die Erkennung durch andere RIG-I Proteine frei gegeben, sodass eine Oligomerisierung von RIG-I entlang der RNA ermöglicht wird. Diese filamentöse Oligomerisierung ist jedoch kein kooperativer Prozess der einzelnen RIG-I Moleküle, sondern ist eher mit dem Auffädeln von Perlen entlang einer Schnur vergleichbar [37,38]. Die aufgereihten CARD-Domänen von RIG-I können jetzt mit den CARD-Domänen von MAVS interagieren [37,39,40]. Dadurch wird eine Signalkaskade aktiviert, die letztlich zur Expression von Typ-I-Interferonen führt. Neben der Oligomerisierung spielen auch verschiedene posttranslationale Modifikationen an RIG-I eine wichtige regulatorische Rolle [41-44]. Ein drittes Modell beschreibt die Funktion der ATPase von RIG-I als eine Art Korrekturlesemechanismus, der die Erkennung zelleigener RNAs verhindern soll [45].

Auf molekularer Ebene sind bisher mehrere Strukturen beschrieben worden, die von RIG-I als Ligand erkannt werden. Als idealer Ligand wurde doppelsträngige RNA mit einer 5'-Triphosphat (5'-ppp) Modifikation ohne Überhang identifiziert, die zwischen zehn und 300 Basenpaarungen umfasst [46-48]. In den letzten Jahren wurden außerdem einzelsträngige 5'-Triphosphat RNA, 5'-Diphosphat RNA und poly-U/A reiche RNA Abschnitte innerhalb bestimmter viraler Genome als Liganden diskutiert [49-51]. Wesentlich bei der Unterscheidung von fremder und endogener RNA ist die 5'-Triphosphat Modifikation, die bei zelleigener mRNA durch eine 5'-*cap* Modifikation ersetzt wird [42,46,52].

Die oben genannten Strukturen sind in Experimenten mit synthetischer oder aufgereinigter RNA identifiziert worden, *in vivo* konnte bisher jedoch kein virales RNA Produkt zweifelsfrei als

Ligand für RIG-I bewiesen werden [42,50]. Zur Vielzahl an Viren, die von RIG-I erkannt werden, gehören unter anderem Paramyxoviridae wie Masern Virus und Sendai Virus, Rhabdoviridae wie Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV), Orthomyxoviridae wie Influenza-A-Virus und Filoviridae wie Ebola und Marburg Virus [42,52,53]. Hepatitis-C-Virus (HCV) wurde ursprünglich als Ligand für RIG-I beschrieben, neuere Daten deuten jedoch auch auf eine Erkennung durch MDA5 hin [54].

1.4.2 MDA5

MDA5 wurde ursprünglich als Gen in humanen Melanomzellen identifiziert, das nach Behandlung mit IFN- β an der terminalen Differenzierung und Apoptose beteiligt ist [22,55]. MDA5 verfügt über dieselbe Domänenarchitektur wie RIG-I und umfasst eine C-terminale RD-Domäne, eine zentrale Helikase Domäne und zwei N-terminale CARD-Domänen. Über die Interaktion der CARD-Domänen von MDA5 und MAVS erfolgt die Initiierung der gleichen Signalkaskade wie nach Aktivierung von RIG-I. MDA5 ist also ebenso ein potenter Induktor der Expression von Typ-I-Interferonen [56].

Während RIG-I relativ kurze, doppelsträngige 5'-Triphosphat RNA erkennt, wird lange, doppelsträngige RNA als Ligand von MDA5 beschrieben. Dieser Längenbereich ist jenseits des Spektrums endogener, im Zytoplasma vorkommender, doppelsträngiger RNA, wodurch die Diskriminierung von körpereigener RNA erfolgt [57,58].

Experimentell wurde häufig das synthetischen RNA Analogon poly I:C (pI:C) *in vitro* zur Stimulation verwendet. Poly I:C ist das Hybridisierungsprodukt aus poly(Inosin) und poly(Cytidin), das durch die Polynukleotid-Phosphorylase synthetisiert wird. Poly I:C zeichnet sich durch eine 5'-Diphosphat Modifikation aus [57,59]. Die Erkennung von 4000 bis 8000 Basenpaare langem pI:C ist vornehmlich von MDA5 abhängig. Kürzeres poly I:C mit einer Länge von etwa 300 Basenpaaren wird jedoch hauptsächlich durch RIG-I erkannt [57].

Auf molekularer Ebene bildet MDA5 *in vitro* kooperative Filamente entlang der Längsachse von doppelsträngiger RNA. Die RD-Domäne von MDA5 besitzt kein strukturelles Äquivalent zur Erkennung einer 5'-Triphosphat Modifikation wie RIG-I. Daher erkennt MDA5 nicht das 5'-Ende der RNA, sondern beginnt mit der Bildung von Filamenten in der Mitte des Stammes der RNA und kann sich in beide Richtungen fortsetzen [19,23,58,60,61]. Die Helikase und RD-Domäne von MDA5 bilden dabei eine ringähnliche Struktur um die RNA [19]. Die Bildung dieser Filamente ist essenziell für die Erkennung langer, doppelsträngiger RNA durch MDA5 *in vitro*, da monomeres MDA5 nur mit geringer Affinität an den Liganden bindet [38]. Erst durch diese perlenschnurartige Anordnung von MDA5 entlang der RNA können die CARD-Domänen

oligomerisieren, was wiederum der Auslöser für die Filamentbildung der CARD-Domänen von MAVS ist [19,62].

Eine wichtige Funktion übernimmt dabei die ATPase Domäne. Die Hydrolyse von ATP destabilisiert die MDA5 Filamente und ermöglicht die Dissoziation von der gebundenen RNA [38]. Da die Dissoziation vornehmlich am Ende der RNA stattfindet, begünstigt diese dynamische Bindungskinetik die Bildung langer Filamente entlang der RNA, während an vergleichsweise kurzer RNA die Dissoziation überwiegt [60,63]. Die Filamentbildung liefert damit ein Erklärungsmodell für die Präferenz langer dsRNA und die Selbst/Fremd Diskriminierung von MDA5. Experimente mit isolierter viraler RNA lassen vermuten, dass neben der Länge auch Sekundärstrukturen der RNA wie Verzweigungen von doppel- und einzelsträngigen Regionen eine Rolle spielen [64,65].

MDA5 ist funktionell nicht redundant mit RIG-I, erkennt aber teilweise überschneidend mit RIG-I Viren aus der Familie der Paramyxoviridae wie Sendai Virus, Masern Virus und Parainfluenzavirus 5, sowie auch Picornaviridae wie Polio Virus und Encephalomyocarditis Virus (EMCV) [66,67]. Auch das Semliki *forest* Virus aus der Familie der Togaviridae wird hauptsächlich, jedoch nicht ausschließlich von MDA5 erkannt [68]. West-Nil-Virus und Denguevirus als Vertreter der Flaviviridae sowie verschiedene Reoviridae werden sowohl von MDA5 als auch von RIG-I detektiert [52,69-71].

1.4.3 LGP2

LGP2 wurde als drittes Mitglied der RLH Familie ursprünglich im Stat3/5 Genlocus als Gen identifiziert, das insbesondere in Brustdrüsengewebe exprimiert wird [72]. Als Homolog zu RIG-I und MDA5 verfügt LGP2 ebenfalls über eine RD-Domäne am C-Terminus und eine DExD/H-box Helikase Domäne mit intrinsischer ATPase-Aktivität. Über CARD-Domänen verfügt LGP2 jedoch nicht und ist daher auch nicht zur Interaktion mit MAVS und Initiierung der Signalkaskade befähigt. Als zytoplasmatischer RNA Rezeptor zeigt LGP2 jedoch eine höhere Affinität zu RNA als RIG-I und MDA5 [26,43,61,73,74].

Seit seiner Beschreibung als Rezeptor des angeborenen Immunsystems sind für LGP2 verschiedene, teils widersprüchliche Funktionen beschrieben worden. Anfangs wurde LGP2 als negativer Regulator für RIG-I und MDA5 beschrieben. Diese Daten beruhen hauptsächlich auf der Beobachtung, dass überexprimiertes LGP2 *in vitro* die Interferonproduktion nach Stimulation mit RIG-I- und MDA5-spezifischen Liganden vermindert. Dabei soll LGP2 aufgrund seiner hohen RNA-Affinität virale RNA im Zytosol sequestrieren und somit die Erkennung durch RIG-I und MDA5 behindern [20,21,43,56,74-76]. Wie Komuro et al. berichten, inhibiert überexprimiertes LGP2 jedoch auch mit defekten RNA-Bindungsdomänen

noch die RLH-Signalkaskade, wenn auch in vermindertem Ausmaß. Die Autoren dieser Arbeit erklären dies durch eine direkte inhibitorische Interaktion von LGP2 mit MAVS [21].

Neuere Daten zeichnen ein sehr viel komplexeres Bild von LGP2. So wurden seit seiner Entdeckung unabhängig drei verschiedene LGP2 *-/- knockout* Mäuse erstellt. Diese Mäuse zeigten alle eine erhöhte Anfälligkeit für Infektionen mit Viren, welche hauptsächlich von MDA5 erkannt werden [77-79]. Auch nach Infektion mit RIG-I-spezifischen Viren wie VSV, Sendai Virus und Japanische Enzephalitis Virus war in zwei dieser LGP2 *-/-* Mäuse die Produktion von Typ-I-Interferonen signifikant vermindert. Der *knock-in* der ATPase defizienten Mutante LGP2 K30A konnte die erhöhte Anfälligkeit gegenüber viralen Infektionen nicht kompensieren. Die beschriebene positive Regulation ist also direkt von der ATP-Hydrolyse durch LGP2 abhängig. Die Mutante LGP2 K30A weist eine Punktmutation im Walker-A-*motif* der ATPase Domäne auf, wodurch die Hydrolyse von ATP verhindert wird [21,74]. Die Erkennung von Influenza-A-Virus durch RIG-I war jedoch nicht von LGP2 abhängig. Erst die Überexpression von RIG-I- und MDA5-CARD-Domänen konnte in LGP2 *-/-* Zellen die verminderte Aktivität der RLH Signalkaskade ausgleichen. Der positive regulatorische Effekt durch LGP2 findet in der RLH Signalkaskade also vor der Signaltransduktion durch MDA5 und RIG-I statt [78]. Darüber hinaus wurde LGP2 kürzlich durch *in vitro* Experimente als wichtiger Kofaktor bei der Erkennung von HCV durch MDA5 beschrieben, wobei eine spezifische Bindung von LGP2 an das HCV Genom gezeigt wurde [54]. Einen indirekten Hinweis auf die antivirale Funktion von LGP2 gibt auch die Tatsache, dass evolutionär virale Mechanismen zur spezifischen Hemmung von LGP2 entstanden sind. So bindet das Paramyxovirus V-Protein direkt an LGP2 und behindert die Hydrolyse von ATP [80-82].

Auf molekularer Ebene konnte durch *in vitro* Versuche das Zusammenspiel zwischen LGP2 und MDA5 genauer charakterisiert werden. Obwohl LGP2 selbst keine Filamente bildet, modifiziert es die Bildung von MDA5-Filamenten. In Anwesenheit von LGP2 bildet MDA5 in kürzerer Zeit mehr Filamente, die im Verhältnis kürzer sind und die Produktion von Typ-I-Interferonen stärker induzieren als ohne LGP2. Dies wird durch eine schnellere Nukleation von MDA5 an der RNA und eine Stabilisierung der kürzeren Filamente durch LGP2 unabhängig von seiner ATPase-Aktivität erreicht [83].

Ein auf diesen Daten beruhendes Modell beschreibt LGP2 daher als positiven Regulator insbesondere für MDA5-abhängiges *signaling* bei physiologischen, niedrigen Konzentrationen. LGP2 wird Typ-I-Interferon-abhängig nach der Aktivierung der RLH-abhängigen Signalkaskade stark induziert, wodurch es in hohen Konzentrationen als negativer Feedback-Inhibitor fungieren soll. Diese Modellvorstellung zeichnet das Bild eines molekularen Schalters, der konzentrationsabhängig hemmende oder positiv regulierende Eigenschaften besitzt [84].

Bisher konnte *in vivo* auch für LGP2 kein eindeutiger Ligand charakterisiert werden. Während die Interaktion mit MDA5 mechanistisch bereits gut beschrieben wurde, existiert zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit für die Modifikation der Erkennung viraler Strukturen durch RIG-I kein Modell. Es lässt sich spekulieren, dass LGP2 zur Modifikation viraler Liganden notwendig ist, bevor die Erkennung durch MDA5 und RIG-I effizient möglich ist. Während des viralen Lebenszyklus ist virale RNA fast ständig an Proteine gebunden und bildet sogenannte Ribonukleoprotein Komplexe (RNPs) (siehe Abb. 1.2). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich detailliert mit der Frage, welche Strukturen mögliche Liganden für LGP2 darstellen und ob LGP2 mit viralen RNPs interagieren kann.

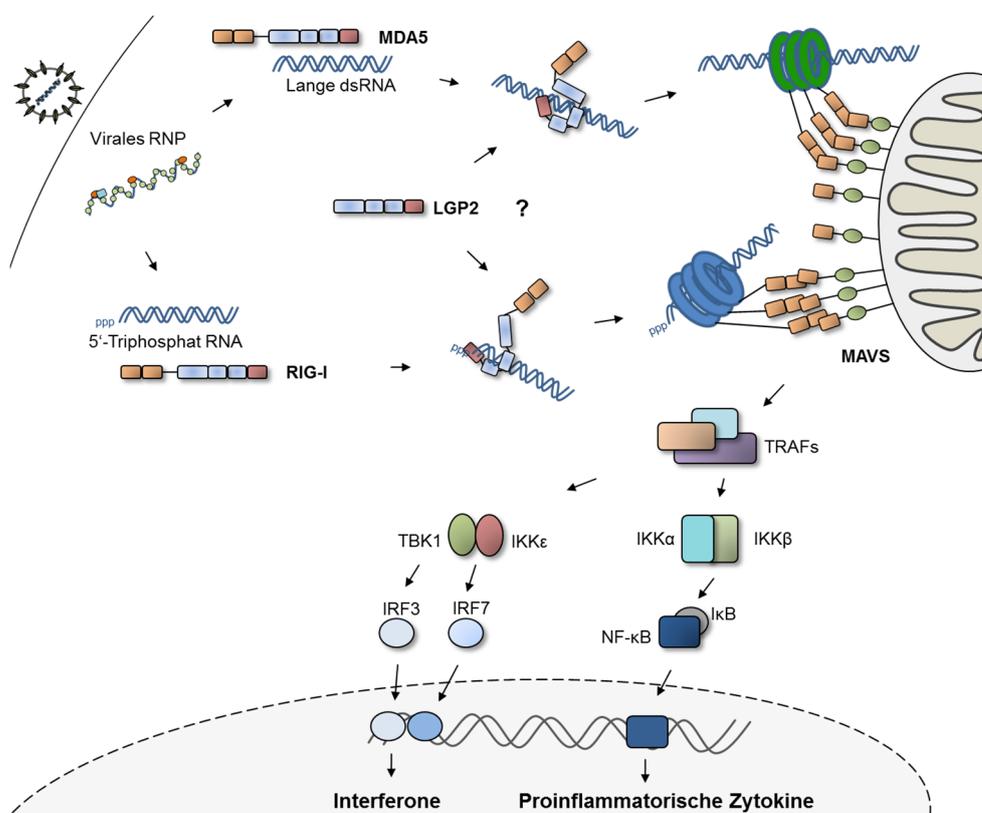


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der Erkennung viraler Infektionen durch die RLHs

Nach der Fusion des Virions mit der Zielzelle werden virale Ribonukleoprotein-Komplexe, bestehend aus dem an Proteine gebundenen viralen Genom freigesetzt. Während RIG-I das 5'-terminale Ende von doppelsträngiger RNA erkennt und durch Translokation oligomerisiert, bildet MDA5 in der Mitte der RNA Filamente. Die Rolle von LGP2 bei diesem Prozess ist umstritten. RIG-I und MDA5 interagieren durch ihre CARD Domänen mit dem mitochondrialen Protein MAVS. Anschließend werden durch Rekrutierung von TRAFs die Kinasen TBK1, IKKα, IKKβ, und IKKε aktiviert. Diese aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF-κB sowie IRF3 und IRF7, welche in den Zellkern translozieren und die Expression von Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen induzieren. Modifiziert nach Yoneyama et al. und Kim et al. [23,85].

1.4.4 Aktivierung des Interferonsystems durch die RIG-I-like-Helikasen

Durch die Aktivierung von RIG-I und MDA5 wird eine gemeinsame Signalkaskade aktiviert, die in der Initiierung eines komplexen antiviralen Abwehrprogramms gipfelt (siehe Abb. 1.2). Eine zentrale Rolle in dieser Kaskade spielt das Adapterprotein MAVS, welches in der äußeren Mitochondrienmembran liegt. Es verfügt ebenfalls über CARD-Domänen, die nach Interaktion mit den CARDS von RIG-I oder MDA5 in einem selbst amplifizierenden Prozess oligomerisieren [62,86-88]. Durch die Rekrutierung von *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF) 2, 3 und 6 sowie weiteren Faktoren werden die Kinasen *TANK-binding kinase 1* (TBK1) und IKK ϵ sowie weitere Faktoren aktiviert. Diese aktivieren wiederum den Transkriptionsfaktor NF- κ B und führen zur Hetero- und Homodimerisierung sowie Translokation der Transkriptionsfaktoren *interferon regulatory factor* (IRF) 3 und 7. Dadurch wird die Expression und Sekretion von Typ-I-Interferonen und anderen pro-inflammatorischen Zytokinen initiiert [87,89-92].

Die Familie der Interferone (IFN) wurde erstmals 1957 als antiviraler Mediator beschrieben. Neben den Typ-I-Interferonen ist auch das Typ-II-Interferon IFN- γ , das hauptsächlich von aktivierten T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert wird, beschrieben. Die Klasse der Typ-III-Interferone wird auch als IFN-ähnliche Zytokine bezeichnet und besteht aus IFN- λ 1 bis 3 [93-96].

Die Typ-I-Interferone IFN- α und IFN- β können von fast allen Zelltypen nach mikrobieller Infektion produziert werden [97]. Typ-I-Interferone haben eine Schlüsselstellung bei der Abwehr viraler Infektionen und aktivieren nach autokriner, parakriner oder endokriner Rezeptorbindung die JAK/STAT-Signalkaskade und setzen so die Expression von mehr als 300 Interferon-stimulierten Genen (ISGs) wie den Mustererkennungsrezeptoren aus der RIG-I-like-Familie in Gang [65,98]. Außerdem werden interferonabhängig eine Reihe pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine wie IP10 (CXCL10) ausgeschüttet [1]. Typ-I-Interferone versetzen infizierte und umgebende Zellen in einen antiviralen Zustand und hemmen unter anderem durch die verstärkte Degradation viraler RNA und die Inhibition der zellulären Translation den viralen Replikationszyklus. Darüber hinaus wird in infizierten Zellen Apoptose induziert, die Infiltration von Immunzellen im Gewebe gefördert und eine spezifische Immunantwort durch Regulation von dendritischen Zellen, B- und T-Zellen eingeleitet [9,74,94,98].

1.5 Viren

Viren besitzen als obligat intrazelluläre Parasiten weder Zellorganelle noch Zytoplasma und bestehen im Wesentlichen aus viralen Proteinen und der daran gebundenen viralen genetischen

Information. Diese kodiert für die viralen Proteine und liegt entweder in Form von DNA oder RNA vor. Viele Viren besitzen darüber hinaus eine Lipidmembran als Hülle. Ein weiteres Einteilungsmerkmal richtet sich danach, ob das virale Genom einzelsträngig oder doppelsträngig vorliegt. Einzelstrang-RNA Viren werden je nachdem, ob ihr Genom direkt als mRNA oder als Muster zur Transkription vorliegt, als positiv- oder negativ-Strang Viren bezeichnet.

1.5.1 Negativ-Strang RNA Viren

Negativ-strang RNA Viren lassen sich in die Ordnung der Multinegavirales und Mononegavirales einteilen. Den Multinegavirales ist gemeinsam, dass ihr Genom in mehrere Teile segmentiert vorliegt. Zu dieser Ordnung gehört zum Beispiel das Influenza-A-Virus. Die Mononegavirales umfassen negativ-Strang Viren mit nicht-segmentiertem Genom, wie Vesikuläres Stomatitis Virus, Masern Virus, Tollwutvirus oder Sendai Virus. Diese Viren teilen sich die Organisation ihres Genoms, das in 3'-5' Richtung immer mindestens für ein Nukleoprotein (N-Protein), Phosphoprotein (P-Protein), Matrix-Glykoprotein und eine RNA-abhängige-RNA-Polymerase (L-Protein) kodiert [9,99].

Virale Ribonukleoprotein Partikel

Eine Besonderheit der Ordnung Mononegavirales ist, dass ihre Polymerase einen helikalen Ribonukleoprotein Komplex (RNP) als Vorlage zur Transkription und Replikation benutzt. Dieser besteht aus dem Genom, das komplett von N-Proteinen umhüllt ist, sowie der Polymerase L und dem Kofaktor P. Wie auch bei den meisten positiv-Strang Viren liegt die genomische RNA des Virus während des viralen Lebenszyklus immer an virale Nukleoproteine gebunden vor. Nur so kann der Polymerasekomplex mit dem Genom interagieren [100-102].

Nach Eindringen eines Virions in die Zelle beginnt der Polymerasekomplex umgehend mit der Transkription viraler mRNA, die mit einer *cap*- und Polyadenylat-Modifikation ausgestattet wird. Sobald genug N-Protein produziert wurde, erfolgt die kontinuierliche Replikation des Genoms über ein positiv-strang Antigenom. Die zur Replikation synthetisierte RNA wird noch während der Produktion umgehend von N-Proteinen umhüllt [9,50]. Dies verhindert sowohl die Basenpaarung mit dem Antigenom, als auch die Erkennung durch die RLHs, da das synthetisierte Genom immer mit einer 5'-Triphosphat Modifikation ausgestattet ist, und somit einen potentiell starken Aktivator für RIG-I darstellt [46,101,103]. Evolutionär haben sich viele Mechanismen entwickelt, um die Erkennung des 5'-Endes durch die RLHs zu verhindern. Während Vertreter der Mononegavirales das 5'-Ende durch die Umhüllung mit N-Proteinen verbergen, trennen andere RNA Viren die Phosphatmodifikation durch Phosphatasen ab oder binden wie Viren der Familie der Picornaviridae das 5'-Ende an virale Proteine [9,104]. Das virale Genom und Antigenom, sowie *defective interfering* (DI) Genome sind wiederholt als

Liganden für RIG-I beschrieben worden. Strukturell konnte die an RIG-I gebundene genomische RNA bisher nie eindeutig auf gebundene virale Proteine untersucht werden [9,102,105-107]. Bei DI-Genomen handelt es sich um defekte virale Genome mit großen intrinsischen Deletionen. Diese entstehen, wenn die virale Polymerase während der Replikation zu einem anderen *template* springt. Da sie kompetitiv mit der Produktion des Volllängen-Genoms konkurrieren, werden sie als interferierend bezeichnet [9,50,108,109].

Vesikuläres Stomatitis Virus

Das Vesikuläre Stomatitis Virus (VSV) ist ein behülltes negativ-Strang RNA Virus aus der Familie der Rhabdoviridae, das *in vitro* fast alle tierischen Zellen infizieren kann [9]. In dieser Arbeit wurde der Serotyp Indiana (NCBI Sequenz: NC_001560.1 VSV Indiana) verwendet. Sein Genom besteht aus 11 161 Nukleotiden und liegt im Zytoplasma der Wirtszelle von etwa 1200 N-Protein Molekülen umhüllt vor [101]. Dieser Nuklease-resistente N-RNA Komplex dient sowohl als Vorlage zur Replikation des Genoms, als auch zur Transkription der viralen mRNA. Zusammen mit etwa 500 P-Proteinen und 50 L-Proteinen wird so der virale Ribonukleoprotein Komplex (RNP) gebildet [100,110].

Das Matrixprotein M und das transmembrane Glykoprotein G sind am Aufbau der viralen Hülle beteiligt. Das VSV M-Protein blockiert in der Wirtszelle darüber hinaus die Produktion von Typ-I-Interferon durch Inhibition der Transkription und Translation. Es existieren zahlreiche Mutanten von VSV, wie die in dieser Arbeit verwendete VSV M51R Mutante, die durch Defekte im M-Protein die Produktion von Typ-I-Interferonen nicht blockieren können [111].

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das angeborene Immunsystem ist ein höchst effektives und komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren und ist zur Initiierung einer effektiven Immunantwort und Rekrutierung des spezifischen Immunsystems essenziell. Die RIG-I-like-Helikasen wurden in den letzten Jahren als entscheidender Schlüsselfaktor bei der Erkennung zytosolischer viraler RNA identifiziert. Bis heute ist jedoch unklar, welche viralen Strukturen in einer infizierten Zelle genau erkannt werden und wie die Regulation dieser mächtigen Signalkaskade im Detail funktioniert.

Im Kern beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit der Frage, welche Funktionen die Helikase LGP2 hat und welche Strukturen von ihr erkannt werden. LGP2 ist ein fast ubiquitär exprimiertes Mitglied der RLH-Familie, das Interferon-abhängig stark induziert wird und große Homologie zu MDA5 und RIG-I aufweist [74]. Im Gegensatz zum Rest der RLH Familie ist LGP2 bisher nur wenig charakterisiert und bisherige Arbeiten zur Funktion von LGP2 zeigen oft widersprüchliche Ergebnisse auf.

Experimente mit *knockout* Mäusen haben gezeigt, dass LGP2 ein wichtiger Kofaktor bei der Erkennung RIG-I-abhängiger Viren wie VSV ist, und in der Signalkaskade *upstream* von RIG-I und MDA5 wirkt [78]. Für Ribonukleoprotein Komplexe von VSV wurde wiederum gezeigt, dass diese nach Transfektion die RLH-abhängige Signalkaskade aktivieren können. Im VSV RNP sind die viralen Erkennungsmuster wie die 5'-Triphosphatmodifikation jedoch durch virale N-Proteine verdeckt [50,112]. LGP2 könnte die an die virale RNA gebundenen viralen Proteine verschieben oder anderweitig modifizieren und so die Mustererkennung durch RIG-I und MDA5 ermöglichen (siehe Abb. 1.3).

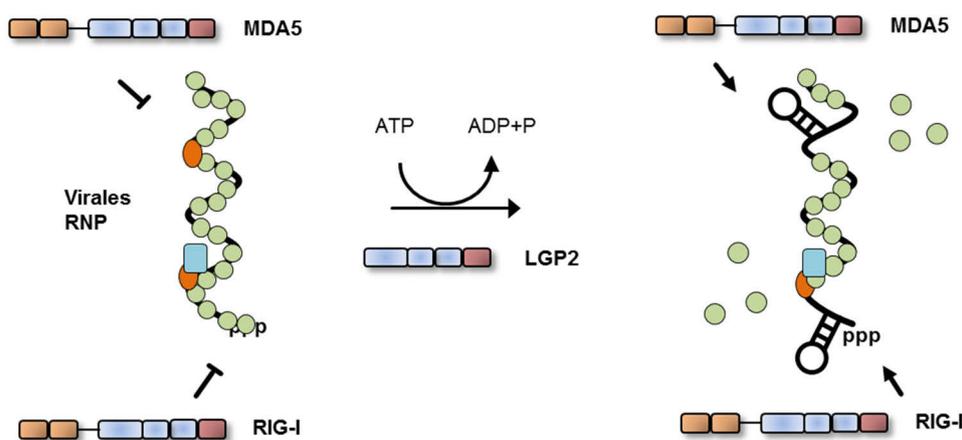


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Hypothese: Modifikation viraler RNPs durch LGP2

Entsprechend der Hypothese dieser Arbeit blockieren die viralen Proteine, die im RNP das virale Genom binden, die Erkennung durch RIG-I und MDA5. In einem ATP-abhängigen Prozess könnte LGP2 das RNP so modifizieren, dass Erkennungsmuster wie ein 5'-Triphosphat-Terminus und doppelsträngige, hybridisierte RNA Abschnitte für RIG-I und MDA5 frei liegen.

Aus den oben genannten Arbeiten ist bekannt, dass LGP2 eine wesentlich Rolle bei der Erkennung verschiedener RIG-I- und MDA5-abhängiger Viren spielt und dass das virale Genom ein möglicher Ligand für die RLHs ist [102,106]. Eine mögliche Interaktion von LGP2 mit viralen RNPs ist bisher nicht bekannt. Auch sind Details zu den viralen Liganden von LGP2 im Hinblick auf eine positive Regulation von RIG-I und MDA5 bisher nicht bekannt.

In dieser Arbeit soll daher die Funktion von LGP2 im Zusammenspiel mit RIG-I und MDA5 näher charakterisiert, und LGP2 auf mögliche Interaktionen mit viralen RNPs untersucht werden. Dafür sollen folgende wissenschaftliche Fragen beantwortet werden:

- Welche Rolle spielt LGP2 im humanen Zellsystem nach Stimulation? Wie wird die RIG-I- und MDA5-vermittelte Immunantwort durch LGP2 modifiziert?

- Was sind Liganden für LGP2 und MDA5 *in vitro*? Welche enzymkinetischen Eigenschaften haben LGP2 und MDA5 dabei?
- Welche Möglichkeiten gibt es, virale RNPs aufzureinigen und diese auf eine mögliche Interaktion mit LGP2 zu untersuchen?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ÄKTA FPLC Chromatographie System	GE Healthcare (München, DE)
ÄKTA micro Chromatographie System	GE Healthcare (München, DE)
Alpha Imager HP	Alpha Innotech (San Leandro, USA)
Biometra Vacu-Blot Transfersystem	Analytik Jena AG (Jena, DE)
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, DE)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen, DE)
Gefrierschränke (-80°C)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Gelelektrophorese Systeme	Biorad (Munich, DE)
InoLab pH Meter 720	WTW (Darmstadt, DE)
Kühl- und Gefrierschränke (4°C, -20°C)	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, DE)
Laminar Air Flow Werkbank (HB 2448)	Heraeus (Hanau, DE)
LightCycler 480	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Luminescent Image Analyzer LAS 4000	Fujifilm (Tokio, Japan)
Magnetrührer Combimag	IKA (Staufen, DE)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena, DE)
Mini Trans-Blot wet Transfer Cell	Biorad (Munich, DE)
MLS-50 Rotor	Beckman Coulter (Brea, USA)
Multiplate Reader Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbach, DE)
NanoDrop 2000c Photometer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
New Brunswick Incubator Shaker Innova 44	Eppendorf (Hamburg, DE)
Power Pac 200 Spannungsgerät	Biorad (München, DE)
Rollenmischgerät RM 5	Karl Hecht (Sondheim/Röhn, DE)
Sonifikator Branson Sonifier 250	Branson (Danbury, USA)
Sorvall SS34 Rotor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Storm 860 Molecular Imager	GE Healthcare (München, DE)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, DE)
Thermomixer 5436	Eppendorf (Hamburg, DE)
Thermoshake Inkubatorschüttler	Gerhardt (Königswinter, DE)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell	Biorad (Munich, DE)
Ultrazentrifuge Optima MAX-XP	Beckman Coulter (Brea, USA)
Ultrazentrifuge Sorvall	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Vortex	Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage LP 6209	Sartorius (Göttingen, DE)
Waage SBC 21	Scaltec Instruments (Heiligenstadt, DE)
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Heraeus (Hanau, DE)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Amicon Ultra-4 Filtereinheiten	Merck (Darmstadt, DE)
Econo-Pac Säule	Biorad (München, DE)
HiPrep Sephacryl S500HR 16/60 Säule	GE Healthcare (München, DE)

HiTrap Heparin HP 5 ml Säule	GE Healthcare (München, DE)
HiTrap Sepharose FF 5 ml Säule	GE Healthcare (München, DE)
Ni-NTA Agarose	Qiagen (Venlo, NL)
Produktion von LGP2-RD Antiserum	BioGenes (Berlin, DE)
Spritzenfilter 0,45 µM	Merck (Darmstadt, DE)

Alle weiteren Verbrauchsmaterialien wurde von den Firmen Becton Dickinson (Heidelberg, DE), Corning (Corning, USA), Eppendorf (Hamburg, DE), Falcon (Heidelberg, DE), Greiner (Frickenhäuser, DE) oder Sarstedt (Nümbrecht, DE) gekauft.

2.1.3 Reagenziensätze (Kits)

ADP Quest Kinase Assay Kit	DiscoverX (Hannover, DE)
Bac-to-Bac Baculovirus Expression System	Invitrogen (Carlsbad, USA)
DC Protein Assay Kit	Biorad (München, DE)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Human IL6 OptEIA ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
Human IP-10 OptEIA ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
JETQUICK Plasmid Spin Kit	Genomed (Löhne, DE)
MegaShortscript T7 Kit	Ambion (Darmstadt, DE)
peqGOLD Total RNA Kit	VWR (Ismaning, DE)
Pierce Silver Stain Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
QIAquick Nucleotide removal Kit	Qiagen (Venlo, NL)
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen (Venlo, NL)
Rediprime II DNA Labeling System	Amersham (Little Chalfont, GB)
Universal Probe Library Set, human	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)

2.1.4 Reagenzien

ELISA

BD OptEIA ELISA Substrat	BD Biosciences (San Diego, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumkarbonat	Roth (Karlsruhe, DE)
Polysorbat 20 (Tween 20)	Roth (Karlsruhe, DE)
Schwefelsäure	Apotheke Innenstadt LMU (München, DE)

Western blot / Northern blot / Gelelektrophorese

Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Blotting Papier	Schleicher & Schuell (Dassel, DE)
Bromphenol Blau	Roth (Karlsruhe, DE)
Deoxycholsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Dinatriumhydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, DE)
ECL <i>Western blot</i> Detektionsreagenz	Amersham (Little Chalfont, GB)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycin	Roth (Karlsruhe, DE)

Guanidin Hydrochlorid	Roth (Karlsruhe, DE)
Immobilon-P PVDF Membran 0,45 µm	Merck (Darmstadt, DE)
Magermilchpulver	Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Merck (Darmstadt, DE)
Natriumazid	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdihydrogenphosphat	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, DE)
Nitrocellulose Membran	Amersham (Little Chalfont, GB)
Nylon Membran	Stratagene (La Jolla, USA)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Rotiphoresis Gel 30 (37,5:1) Acrylamidlösung	Roth (Karlsruhe, DE)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe, DE)
TRIS Hydrochlorid (TRIS HCl)	Roth (Karlsruhe, DE)
Tris hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe, DE)
β-Mercaptoethanol	Biorad (München, DE)

Coomassie Färbung

Ammoniumsulfat	Roth (Karlsruhe, DE)
Coomassie Blau G-250	Roth (Karlsruhe, DE)
Phosphorsäure	Roth (Karlsruhe, DE)

Agarose Gelelektrophorese

Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Agarose LE	Biozym (Hessisch Oldendorf, DE)
Blue Juice Ladepuffer	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe, DE)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Formaldehyd 37 %	Roth (Karlsruhe, DE)
Glyoxal	Roth (Karlsruhe, DE)
Loading Dye (6x)	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
O'GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Zellkultur

Aqua ad injectabilia	Braun (Melsungen, DE)
Ciprofloxacin	Stada (Bad Homburg, DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth (Karlsruhe, DE)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Fötales Kälberserum (FCS)	GibcoBRL (Paisley, GB)
<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i> (GMEM)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Interferon-β	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)
Opti-MEM	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Penicillin / Streptomycin (100 x)	PAA (Linz, A)

<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	PAA (Linz, A)
Trypsin (10 x)	PAA (Linz, A)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Zelllysate

Ethylenglycol-bis-tetraessigsäure (EGTA) <i>for use in mammalian cells</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Nonident P-40	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Transfektionsreagenzien

FuGENE	Roche (Penzberg, DE)
GeneJuice	Merck Chemicals (Darmstadt, DE)
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen (Carlsbad, USA)

Protein- und RNP Aufreinigung und Experimente

4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Ampicillin	Roth (Karlsruhe, DE)
Chloroform	Roth (Karlsruhe, DE)
D(+)-Saccharose	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Express Five SFM Insektenzellmedium	GibcoBRL (Paisley, GB)
Gentamicin	Roth (Karlsruhe, DE)
Glycerol	Roth (Karlsruhe, DE)
Imidazol	Roth (Karlsruhe, DE)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe, DE)
LB-Agar	Roth (Karlsruhe, DE)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe, DE)
Protease Inhibitor Cocktail cOMplete EDTA-free	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
S.O.C. Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Tetrazyklin	Roth (Karlsruhe, DE)
TRIzol Reagent	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

qPCR

dNTPs (10mM)	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Ethanol	Merck Chemicals (Darmstadt, DE)
Isopropanol	Merck Chemicals (Darmstadt, DE)
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
Oligo (dT)18 Primer	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
RevertAid H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
Ribolock RNase Inhibitor	Fermentas (St. Leon-Roth, DE)

In vitro Experimente

Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i> (CIAP)	Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Poly I:C (pI:C) HMW	Invivogen (San Diego, USA)
Poly I:C (pI:C) LMW	Invivogen (San Diego, USA)
RNA 5'Polyphosphatase	Epicentre (Madison, USA)
RNase III	Epicentre (Madison, USA)

2.1.5 Software

Adobe Creative Suite	Adobe Systems (San Jose, USA)
CLC Maim Workbench V7.7.3 Trial	CLCbio (Aarhus, DK)
EndNote X8	Thomson Reuters (New York, USA)
Graph Pad Prism V5.03	Graph Pad Software Inc. (La Jolla, USA)
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics (Mannheim, DE)
Microsoft Office 2010	Microsoft (Redmont, USA)
siRNA Selection Program	Whitehead Institute (Cambridge, USA)
UNICORN Control Software V5.20	GE Healthcare (München, DE)

2.1.6 PufferPuffer zur Aufreinigung von rekombinanter LGP2-RD Domäne

<u>Lysepuffer/Waschpuffer 1</u>	<u>Waschpuffer 2</u>	<u>Elutionspuffer</u>
50 mM Tris-HCl (pH 7,5)	50 mM Tris-HCl (pH 7,0)	50 mM Tris-HCl (pH 7,0)
300 mM NaCl	100 mM NaCl	100 mM NaCl
20 mM Imidazol	20 mM Imidazol	200 mM Imidazol
7 mM β -Mercaptoethanol	7 mM β -Mercaptoethanol	7 mM β -Mercaptoethanol
20 μ M ZnCl ₂	20 μ M ZnCl ₂	20 μ M ZnCl ₂
<u>Niedrigsalzpuffer</u>	<u>Hochsalzpuffer</u>	<u>Puffer Aufkonzentration</u>
<u>Kationenaustausch</u>	<u>Kationenaustausch</u>	5 % (Vol.) Glycerol
50 mM Tris-HCl (pH7,0)	50 mM Tris-HCl (pH7,0)	2 mM Dithiothreitol (DTT)
100 mM NaCl	1 M NaCl	20 μ M ZnCl ₂
7 mM β -Mercaptoethanol	7 mM β -Mercaptoethanol	in PBS
20 μ M ZnCl ₂	20 μ M ZnCl ₂	

Puffer für die Aufreinigung von rekombinantem Vollängen-LGP2 und LGP2 K30A Mutante

<u>Lysepuffer</u>	<u>Waschpuffer</u>	<u>Elutionspuffer</u>
30 mM Tris-HCl (pH 7,0)	30 mM Tris-HCl (pH 7,0)	30 mM Tris-HCl (pH 7,0)
500 mM NaCl	150 mM NaCl	150 mM NaCl
10 % (Vol.) Glycerol	10 % (Vol.) Glycerol	10 % (Vol.) Glycerol
20 mM Imidazol	20 mM Imidazol	200 mM Imidazol
10 mM β -Mercaptoethanol	10 mM β -Mercaptoethanol	10 mM β -Mercaptoethanol
5 μ M ZnCl ₂	5 μ M ZnCl ₂	5 μ M ZnCl ₂

<u>Niedrigsalzpuffer Heparinsäule</u>	<u>Hochsalzpuffer Heparinsäule</u>
30 mM Tris-HCl (pH7,0)	30 mM Tris-HCl (pH7,0)
150 mM NaCl	500 mM NaCl
10 % (Vol.) Glycerol	10 % (Vol.) Glycerol
10 mM β -Mercaptoethanol	10 mM β -Mercaptoethanol
5 μ M ZnCl ₂	5 μ M ZnCl ₂

Puffer zur Aufreinigung von Ribonukleoprotein Komplexen

<u>TEN-Puffer</u>	<u>ATPase-Resuspensionspuffer</u>
50 mM Tris-HCl (pH 7,4)	15 mM HEPES (pH 7,4)
150 mM NaCl	20 mM NaCl
1 mM EDTA	10 mM MgCl ₂
20 % D(+)-Saccharose	0,02 % Polysorbat 20 (Tween 20)

Zellkultur

<u>DMEM Vollmedium</u>	<u>GMEM Vollmedium</u>	<u>Express Five SF-9 Medium</u>
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin	10 μ g/ml Gentamicin
100 μ g/ml Streptomycin	100 μ g/ml Streptomycin	18 mM L-Glutamin
1,5 mM L-Glutamin	1,5 mM L-Glutamin	in Express Five Medium
10 Vol. % FCS	10 Vol. % FCS	
in DMEM-Medium	in GMEM-Medium	

SDS- / Native-PAGE, Agarose Gelelektrophorese, Western blot und Northern blot Puffer

<u>Lysepuffer</u>	<u>Lämmli-Puffer (5x)</u>	<u>Native-Ladepuffer (2x)</u>
20 mM Tris-HCl (pH 7,5)	250 mM Tris-HCl (pH 6,8)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8)
10 Vol % Glycerol	40 Vol % Glycerol	30 Vol % Glycerol
150 mM NaCl	5 % (w/v) SDS	2 % Deoxycholsäure
1,5 mM MgCl ₂	0,05 % (w/v) Bromphenolblau	in ddH ₂ O
0,5 mM EGTA	10 Vol % β -Mercaptoethanol	
0,2 Vol % Nonident P-40	in ddH ₂ O	
1 mM PMSF		
1 mM Natriumorthovanadat		
50 μ l Protease Inhibitor Cocktail		
pro 10 ml Puffer		

<u>Elektrophorese Laufpuffer</u>	<u>Coomassie-Brilliant-Blau</u>
192 mM Glycin	10 % Phosphorsäure
25 mM Tris-Base (pH 8,3)	10 % Ammoniumsulfat
ddH ₂ O ad 1000 ml	0,12 % Coomassie Blau G-250
	20 % Methanol
	in ddH ₂ O

<u>10% Trenngel</u>	<u>3% Sammelgel</u>	<u>Semi-dry / wet Transferpuffer</u>
3,3 ml 30 % Acrylamid	0,68 ml 30 % Acrylamid	192 mM Glycin
2,5 ml 1,5 M Tris-Base (pH 8,8)	1,0 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	25 mM Tris-Base
0,1 ml 10 % Ammoniumpersulfat	0,04 ml 10 % Ammoniumpersulfat	20 Vol. % Methanol
0,004 ml TEMED	0,004 ml TEMED	ddH ₂ O ad 1000 ml
4,1 ml H ₂ O	2,26 ml H ₂ O	

TBS-Tween

50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
150 mM NaCl
0,05 Vol % Tween 20

Blockierungspuffer

5 % (w/v) Milchpulver
in TBS-Tween

Stripping Puffer

6 M Guanidin-HCl
20 mM Tris-HCl (pH 7,5)
0,2 Vol % Nonident P-40
0.1 M β -Mercaptoethanol

50 x Phosphatpuffer

250 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
250 mM NaH₂PO₄ x H₂O

Zeta Hybridisierungspuffer

250 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O
250 mM NaH₂PO₄ x H₂O (pH 7,2)
1 mM EDTA
7% SDS

Zeta Waschpuffer 1% / 5%

8% 50 x Phosphatpuffer
1 mM EDTA
1% / 5% SDS

ELISA PufferELISA Beschichtungspuffer

0,1 M Natriumkarbonat (pH 9,5)
in ddH₂O

ELISA Verdünnungspuffer

10 % FCS in PBS (pH 7,0)

ELISA Waschpuffer

0,05 Vol % Tween 20 in PBS

2.1.7 RNA Oligonukleotide**Tabelle 2.1 Oligonukleotide zur *in vitro* ATPase Stimulation**

Typ	Modifikation	Name	Sequenz 5'-3'
Syn RNA	5'-OH	2.2s-OH	GCAUGC GACCUCUGUUUGA
		2.2as-OH	UCAAACAGAGGUCGCAUGC
		2.2 5-mer	UCAA
		2.2 10-mer	UCAAACAGAG
		2.2 15-mer	UCAAACAGAGGUCGC
		2.2 18-mer	UCAAACAGAGGUCGCAUG
		2.2 5-mer'	CAUGC
		2.2 10-mer'	GGUCGCAUGC
		2.2 15-mer'	ACAGAGGUCGCAUGC
		40s	GAACUAUGAAGAGAAGACCAGACGC GUAAUUGUAAAGAAC
		40as	GUUCUUUACAAUUACGCGUCUGGU CUUCUCUUCAUAGUUC
		70s	GAACCGAAGAGACACGACAAGACG CCGAGACACACAAGACACACGCG AGACCACACCCGAACACACGCU AGCGUGUGUUCGGGUGUGGUCUC
		70as	UGCGUGUGUCUUGUGUGUCUCGG CGUCUUGUCGUGUCUCUUCGGUUC

Tabelle 2.1 Oligonukleotide zur *in vitro* ATPase Stimulation

Typ	Modifikation	Name	Sequenz 5'-3'
Syn RNA	5'-OH	Fas-OH	CUGUUUCUUCUCUUGUUUGGU
	5'-ppp	Syn 2.2s-ppp	GCAUGCGACCUCUGUUUGA
		Fs-ppp	ACCAAACAAGAGAAGAAACAG
IVT RNA	5'-ppp	IVT 2.2s	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA
		IVT 2.2as	GUCAAACAGAGGUCGCAUGC
DNA		ssDNA	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGT CGTATTAGAATTTCGC

Die synthetische, einzelsträngige RNA Fs-ppp wurde von Filiz Civril aus dem Labor von Prof. Karl-Peter Hopfner (Genzentrum, LMU München) zur Verfügung gestellt und, wie in Civril et al. [40] beschrieben, hergestellt. Bei der Verwendung doppelsträngiger Nukleotide wurden der jeweilige Strang (*sense*) und entsprechende Gegenstrang (*antisense*) im Sinne einer Basenpaarung hybridisiert. Zum Beispiel 70ds als Produkt aus 70s und 70as. Chemisch synthetisierte (syn) 5'-OH RNA wurde bei Metabion erworben. Synthetische (syn) 5'-Triphosphat (5'-ppp) RNA stellte die Firma Eurogentec her. *In vitro* transkribierte (IVT) RNA wurde mit dem *MEGashortscript T7* Kit nach dem Protokoll des Herstellers hergestellt. IVT 2.2s und 2.2as RNA entsprechen IVT ss2.2s bzw. IVT ss2.2as RNA aus Schmidt et al. [48]. Das Produkt aus IVT 2.2s und 2.2as RNA ist eine doppelsträngige RNA mit 5'-Triphosphat Modifikation und wird im Folgenden als „2.2ds“ bezeichnet. Analog wird das doppelsträngige Hybridisierungsprodukt der *sense*- (s) und *antisense*- (as) Sequenz jeweils als „ds“ bezeichnet.

2.1.8 *Small-interfering* RNA (siRNA)

Tabelle 2.2 *Small-interfering* RNA

Zielprotein	Zielbereich	Sequenz (5'- 3')	Name
Humanes LGP2 (1)	Kodierender Bereich	GCCAGUACCUAGAACUUAATT	siRNA 1
Humanes LGP2 (2)	3' Untranslatierter Bereich	GCCAUACUGUACUCAGAAUTT	siRNA 2

Die in dieser Arbeit verwendeten *Small-interfering* RNA (siRNA) Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms *siRNA Selection Program* des Whitehead Institute (Cambridge, USA) erstellt (<http://sirna.wi.mit.edu>). Die dargestellten Sequenzen von 21 Basen entsprechen dem *sense*-Strang der mRNA des Zielgens in 5' - 3' Notierung. Am 3'- Ende befindet sich ein dTdT-Überhang. Sämtliche siRNA wurde von der Firma Metabion erworben.

2.1.9 qRT-PCR Primer und Sonden

Tabelle 2.3 qRT-PCR Primer und Sonden

Zielgen	Primersequenz (5' – 3')	Position	Sonde
HPRT	for.: TGACCTTGATTATTTGCATACC	218 – 241	73
	rev.: CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	300 – 319	
LGP2	for.: GCCTTGCAAACAGTACAACCT	862 – 882	72
	rev.: TCTTCAGCAAGTCCCAAAC	907 – 926	
IP10	for.: GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT	363 – 385	34
	rev.: GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA	434 – 459	
IFN- β	for.: CGACACTGTTCGTGTTGTCA	54 – 73	25
	rev.: GAGGCACAACAGGAGAGCAA	101 – 120	

Die in dieser Arbeit verwendeten qRT-PCR Primersequenzen wurden mit Hilfe des *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* von Roche erstellt (www.universalprobelibrary.com). Auf diese Weise wurden auch geeignete Sonden aus der Sondenbibliothek von Roche ausgewählt. Die Synthese sämtlicher qRT-PCR Primer erfolgte durch die Firma Metabion. Für jedes Gen wurden ein Vorwärts-Primer (for.), welcher der zu vervielfältigenden mRNA entspricht, und ein Rückwärts-Primer (rev.), der dem Gegenstrang entspricht, entworfen.

2.1.10 Primer für *Northern blot* Sonden

Tabelle 2.4 Primer für *Northern blot* Sonden

Zielgen	Primersequenz (5' – 3')	Position
VSV Genom	for.: GCGCTAATACGACTCACTATAGGTGACGGACGAA	2101 – 2123
	TGTTCATAA	
	rev.: AGGCTAAGTACAAAAGGCACT	3082 – 3102

Die gezeigten *Northern blot* Primer wurden bei der Firma Metabion bestellt.

2.1.11 Plasmide

Tabelle 2.5 Plasmide

Gen	Vektor	Resistenz	Charakteristika
LGP2	pcDNA5	Ampicillin	3 x FLAG-tag, N-terminal
MDA5	pcDNA5	Ampicillin	3 x FLAG-tag, N-terminal
RIG-I	pcDNA5	Ampicillin	3 x FLAG-tag, N-terminal
LGP2	pcDNA5	Ampicillin	mCherry-tag, C-terminal
LGP2	pcDNA5	Ampicillin	mCherry-tag, N-terminal
LGP2 K30A	pSfiExpress	Kanamycin	HA-tag, C-terminal, als „dsDNA“ in 3.3.1 verwendet

Zur Isolation und Amplifikation von Plasmid-DNA wurde das jeweilige Plasmid durch Hitzeschocktransformation in kompetente *E. coli* (siehe 2.1.14) eingebracht. Dafür wurden die Bakterien mit dem jeweiligen Plasmid für eine Minute bei 42°C inkubiert und anschließend entsprechend der auf dem Plasmid kodierten Antibiotikaresistenz auf antibiotikahaltigen Agarplatten aufgebracht. Anschließend wurden Einzelkolonien abgenommen und unter antibiotischem Selektionsdruck in 3 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Isolation und Aufreinigung der Plasmid DNA erfolgte mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* entsprechend den Vorgaben des Herstellers.

2.1.12 Rekombinante Proteine

Tabelle 2.6 Rekombinante Proteine

Protein	Aminosäuren	Tag	Expressionshost	Vektor	Aufreinigung
LGP2	1 - 678	6 x HIS, N-terminal	High Five Insektenzellen	pFBDM	NiNTA, Heparin
LGP2 K30A	1 - 678	6 x HIS, N-terminal	High Five Insektenzellen	pFBDM	NiNTA, Heparin
LGP2-RD	537 - 678	6 x HIS, N-terminal	<i>E. Coli</i> Rosetta DE3	pET28	NiNTA, Kationenaustausch
Maus MDA5	1 - 1025	6 x HIS, C-terminal	High Five Insektenzellen	mmMDA5 aus Motz et al. 2013 [113]	
RIG-I	1 - 925		High Five Insektenzellen	RIG-I WT aus Cui et al. 2008 [27]	

Die Aufreinigung von rekombinantem LGP2, LGP2 K30A und LGP2-RD Domäne erfolgte im Labor von Prof. Hopfner (Genzentrum, LMU München). Rekombinantes murines MDA5 wurde von Carina Motz und humanes RIG-I von Sheng Cui aus dem Labor von Prof. Hopfner zur Verfügung gestellt.

2.1.13 Antikörper

Tabelle 2.7 Antikörper

Antikörper	Host-Spezies	Hersteller
Anti-LGP2-RD	Hase, polyklonales Antiserum	Immunisierung von Hasen mit LGP2-RD durch Firma BioGenes, siehe 2.3.2
Anti-LGP2	Hase, polyklonal	Proteintech
Anti-FLAG	Maus, monoklonal, Klon M2	Sigma-Aldrich

Anti-FLAG M2 <i>Affinity Gel</i>	Maus, monoklonal, Klon M2, an Agarose- <i>beads</i> gebunden	Sigma-Aldrich
Anti-MDA5 <i>mouse</i>	Hase, polyklonal	Enzo Life Sciences
Anti-MDA5 <i>human</i>	Hase, polyklonal	Enzo Life Sciences
Anti-RIG-I	Maus, monoklonal, Klon Alme-1	Enzo Life Sciences
Anti-VSV-N	Maus, monoklonal, Klon 10G4	Kerafast
Anti-VSV-G	Maus, monoklonal, Kon P5D4	Sigma-Aldrich
Anti-HA	Hase, polyklonal	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
Anti- β -Actin	Maus, monoklonal, Klon C4, HRP- konjugiert	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, USA
Anti- <i>mouse</i> IgG	Ziege, polyklonal, HRP-konjugiert	Sigma-Aldrich
Anti- <i>rabbit</i> IgG	Ziege, polyklonal, HRP-konjugiert	Santa-Cruz Biotech, Santa Cruz, USA

2.1.14 Bakterienstämme

Tabelle 2.8 Bakterienstämme

Stamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) DH10 MultiBac	Prof. Hopfner (LMU, München)
<i>E. coli</i> Rosetta DE3	Prof. Hopfner (LMU, München)

Alle Arbeiten mit Plasmiden und DNA wurden mit DH10 MultiBac durchgeführt. Der Rosetta DE3 Stamm wurde ausschließlich zur Expression von rekombinantem Protein verwendet.

2.1.15 Zelllinien

Tabelle 2.9 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Herkunft
1205LU	Humane Melanomzellen aus einer Lungenmetastase	M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA)
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	American Type Culture Collection (ATCC)
BHK-21	Baby Hamster Nierenzellen	I. Macpherson, M. Stocker (Institute of Virology, University of Glasgow, GB)
SF-9	Insektenzellen aus dem Ovar von <i>S.</i> <i>frugiperda</i>	J.L. Vaughn (Plant Sciences Institute, Beltsville, USA)

PD Robert Besch (LMU München) stellte 1205LU Melanomzellen zur Verfügung. SF-9 Insektenzellen wurden von Prof. Hopfner zur Verfügung gestellt, jegliche Experimente mit SF-9 Zellen wurden im Labor von Prof. Hopfner durchgeführt.

2.1.16 Viren

Tabelle 2.10 Viren

Virus	Merkmale
Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV)	Indiana Stamm, wenig Induktion von Typ-I-Interferonen in der Zellkultur, zur Verfügung gestellt von Prof. Anne Krug, Technische Universität München
VSV M51R	Mutation im VSV M-Protein, Defekte Inhibition der Wirtszell-Genexpression [114], starke Typ-I-Interferon Induktion in der Zellkultur
Sendai Virus	Cantell Stamm; Ursprung: Charles River Laboratories
Semliki <i>forest</i> Virus (SFV)	starke Typ-I-Interferon Induktion in der Zellkultur, zur Verfügung gestellt von PD J. Pavlovic, Institute of Medical Virology, University of Zürich

2.2 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Allgemeines

Die Kultivierung von Zellen in der Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt in der Luft von 5 % und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Jegliche Arbeiten an der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer *Laminar-Air-Flow* Sterilwerkbank, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden.

Kultivierung von adhärennten Tumorzelllinien

1205LU Melanomzellen und HEK293 Zellen wurden für alle Experimente in DMEM Vollmedium kultiviert. Die Kultivierung von BHK Zellen erfolgte in GMEM Vollmedium. Da die Adhärenz der Zellen für deren Vitalität erforderlich ist, wurden diese in Zellkulturflaschen mit einem speziell behandelten Flaschenboden kultiviert, welcher ein adhärenntes Wachstum erlaubt. Kultivierte Zellen wurden regelmäßig mit dem Lichtmikroskop auf Ihre Integrität und Zelldichte überprüft und etwa alle drei Tage wurden überschüssige Zellen verworfen und das verbrauchte Zellmedium gewechselt. Nach Absaugung des Zellmediums und einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch fünfminütige Inkubation mit 1 x Trypsin / EDTA im Begasungsbrutschrank vom Flaschenboden abgelöst und anschließend in frischem

Zellmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde mit Zellmedium auf die gewünschte Verdünnung gebracht und überschüssige Zellsuspension verworfen.

Bestimmung der Zellzahl und Zellviabilität

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte durch die Anfärbung toter Zellen in der Zellsuspension mit Trypanblau in geeigneter Verdünnung. Trypanblau färbt als Perforationsfarbstoff selektiv tote Zellen an, wobei lebende Zellen den Farbstoff kaum annehmen. Anschließend wurde die Gesamt- und Lebendzellzahl durch Auszählen in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

2.2.2 Transfektion und Stimulation

Sowohl die Transfektion als auch die Stimulation von Zellen benutzt das Prinzip der Lipofektion, um Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzuschleusen. Bei den verwendeten Transfektionsreagenzien handelte es sich um polykationische Lipide, die mit anionischen Nukleinsäuren liposomale Strukturen bilden und diese so verpackt nach der endozytotischen Aufnahme durch Fusion mit der Endosomenmembran ins Zytosol der Zelle schleusen.

Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Tumorzelllinien

Zur Überexpression von Proteinkonstrukten wurde Plasmid-DNA in Tumorzelllinien transient transfiziert. Dafür wurden 50 000 HEK293 oder 1205LU Zellen in 500 µl Zellmedium in einer 24-*well*-Platte ausplattiert und diese unter Verwendung von 0,75 µl GeneJuice mit 250 ng Plasmid-DNA pro *well* nach den Vorgaben des Herstellers transfiziert.

Stimulation von Tumorzellen mit RNA

Die Stimulation von 1205LU Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von etwa 60 % in 500 µl Zellmedium in einer 24-*well*-Platte. Zur Stimulation wurden 10 ng/ml poly (I:C) verwendet. Als Transfektionsreagenz kam Lipofectamin RNAiMAX entsprechend des Protokolls des Herstellers zum Einsatz. Je Versuchsbedingung wurde die verwendete RNA jeweils mit 1 µl RNAiMAX komplexiert.

Posttranskriptioneller Gen-*knockdown* mit siRNA

Für den Gen-*knockdown* mit *small-interfering* RNA (siRNA) wurden 50 000 1205LU Zellen in einer 24-*well*-Platte in 500 µl Medium ausplattiert und über Nacht kultiviert. Zur Transfektion wurden 20 pmol siRNA mit 1 µl RNAiMAX in 50 µl Opti-MEM Medium entsprechend des

Protokolls des Herstellers verdünnt und anschließend mit den zu transfizierenden Zellen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die Transfektion der siRNA wiederholt. Für Versuchsbedingungen, die zusätzlich mit RNA stimuliert wurden, wurde die jeweilige RNA zur Stimulation dem zweiten siRNA Transfektionsgemisch direkt hinzugegeben, ohne Zugabe von zusätzlichem Transfektionsreagenz.

2.2.3 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Quantifizierung des pro-inflammatorischen Chemokins IP10 im Zellüberstand wurde ein *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verwendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Sandwich-Prinzip, wobei das jeweilige Zytokin als Antigen zuerst durch einen an eine Polystyrene-Mikrotiter Platte gebundenen, spezifischen Antikörper (sog. *capture*-Antikörper) immobilisiert wird. Weitere freie Bindungsstellen auf der Platte, die nicht vom *capture*-Antikörper besetzt sind, wurden mit einem BSA-haltigen Blockierungspuffer abgesättigt. Eine PBS-Tween Lösung wurde nach jedem Arbeitsschritt für 10 Waschschrte benutzt. Nach Zugabe der zellfreien Überstände aus Zellkulturexperimenten wurde ein zweiter, für ein anderes Epitop des Antigens spezifischer Antikörper (sog. *detection*-Antikörper) hinzugegeben. Dieser war mit Biotin markiert. Durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats, das an Biotin bindet, wurde das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) an den Antikörper angefügt. Die Zugabe des Substrates für die HRP induzierte ein Farbumschlag, dessen Intensität proportional zur Menge des gebundenen Antigens ist. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Schwefelsäure abgestoppt und anschließend anhand der Farbintensität photometrisch bei 450 nm quantifiziert. Über eine serielle Verdünnungsreihe des Antigens bekannter Konzentration wurde eine Standardkurve zur Bestimmung der gesuchten Antigenkonzentrationen erstellt. IP10 wurde mit Hilfe des kommerziell erhältlichen OptEIA Human IP10 ELISA Sets entsprechend des Herstellerprotokolls bestimmt. Sämtliche Puffer wurden wie im Protokoll angegeben hergestellt. Zur photometrischen Auslesung wurde ein Mithras LB 940 Mikroplattenleser der Firma Berthold Technologies benutzt.

2.2.4 Quantitative reverse transcribed Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Allgemeines Funktionsprinzip

Die quantitative *reverse transcribed* PCR (qRT-PCR) dient zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression von Genen. Nach Isolation der gesamten zellulären RNA einer zu untersuchenden Zellprobe wurde die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels der Polymerase Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Die eigentliche Quantifizierung erfolgte während der exponentiellen Amplifizierungsphase der

PCR in Echtzeit durch die Messung eines sequenzspezifischen Fluoreszenzsignals. Dieses ist direkt proportional zur Menge der vorhandenen, genspezifischen cDNA aus dem mRNA-Umschrieb. Aufgrund der exponentiellen Genamplifikation durch die Polymerase Kettenreaktion sind auch sehr geringe Mengen an ursprünglich vorhandener mRNA zuverlässig quantifizierbar.

Zur Quantifizierung eines mRNA-spezifischen Amplifikationsprodukts wurden sequenzspezifische Sonden bestehend aus Nukleinsäure-Analoga verwendet, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Neben dem Fluoreszenzfarbstoff ist an die Sonde zusätzlich ein *quencher* Molekül gekoppelt, das durch die räumliche Nähe zum Farbstoff dessen Lichtemission verhindert. Während der Amplifikation des Gegenstrangen zerschneidet die Polymerase durch deren 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde, wodurch der Farbstoff und der *quencher* räumlich getrennt werden. Das danach photometrisch messbare Fluoreszenzsignal ist daher direkt proportional zur Menge des Amplifikats. Da der Farbstoff bei jedem Amplifikationszyklus freigesetzt wird, kann im Gegensatz zur konventionellen PCR die Menge an vorhandener cDNA während jedes Amplifikationszykluses in Echtzeit gemessen werden. Um in verschiedenen Zellpopulationen eine quantitativ-vergleichende Aussage treffen zu können, wurde als Referenz die gesuchte mRNA in Relation zu einem in allen Zellen konstant und unabhängig von der Zellstimulation produzierten Gen-Transkript gesetzt.

Versuchsablauf

Zelluläre RNA wurde mit Hilfe des *peqGOLD Total RNA* Kit entsprechend des Protokolls des Herstellers isoliert. Zur spezifischen reversen Transkription der mRNA in cDNA wurden Oligo(dT)18 Primer verwendet. Diese synthetischen Nukleotidketten sind komplementär zum Poly(A)-Schwanz des 3'-Endes eukaryotischer mRNA und dienen als Primer für die reverse Transkriptase. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden 500 ng der isolierten RNA durch die Zugabe von 0,2 µl RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl Oligo(dT)18 Primer (10 millimolare Ausgangslösung), 2 µl dNTPs (10 millimolare Ausgangslösung), 0,5 µl Ribolock RNase Inhibitor und ddH₂O (doppelt destilliertes H₂O) ad 20 µl in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz durch Zugabe von 40 µl ddH₂O weiter verdünnt.

Die Quantifizierung der zu untersuchenden mRNA-Transkripte erfolgte unter Verwendung des *Universal Probe Library* Systems. Die zur Amplifikation der untersuchten Gene notwendigen Primer wurden mit Hilfe der auf der Internetpräsenz von Roche zur Verfügung gestellten Software *Assay Design Center* (www.universalprobelibrary.com) konzipiert. Für das jeweilige Gen geeignete Sonden wurden von der Firma Roche erworben. Pro Versuchsbedingung wurde für jedes zu untersuchende Gen ein Versuchsansatz von insgesamt 10 µl in einer speziellen qRT-PCR 96-well-Platte pipettiert. Dabei wurden je 5 µl 2 x KAPA PROBE FAST qPCR

Master Mix, 3 µl der umgeschriebenen cDNA, 0,1 µl der jeweiligen Sonde (10 µmolare Ausgangslösung), je 0,2 µl des Vorwärts- und Rückwärts-Primers (10 µmolare Ausgangslösung) und 1,5 µl ddH₂O verwendet. Sämtliche Pipettierschritte wurden auf Eis und wegen der Lichtempfindlichkeit der Sonden bei abgedunkelten Lichtverhältnissen durchgeführt. Die eigentliche Messung erfolgte mit Hilfe eines LightCycler 480 Geräts. Bei der Analyse wurde während 45 Amplifikationszyklen der Polymerase bei jedem Schritt die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs gemessen. Die Quantifizierung des zu untersuchenden Gens erfolgte für jede Versuchsbedingung als relative Quantifizierung in Relation zur mRNA des konstant exprimierten *housekeeping*-Gens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) in derselben Probe.

2.2.5 Herstellung von Zelllysaten

Um Proben aus der Zellkultur mittels Gelelektrophorese auftrennen und weiter untersuchen zu können, mussten diese zuerst lysiert werden. Dafür wurden die durch Zellmembranen abgegrenzten Zellkompartimente und Organelle mit Hilfe eines Detergens aufgebrochen und die zu untersuchende Proteine freigesetzt. Um Proteindegradation und Denaturierung zu reduzieren, wurde das milde, nichtionische Detergens Nonident P-40 verwendet. Außerdem wurden dem Lysepuffer verschiedene Proteaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren hinzugefügt, sowie sämtliche Arbeitsschritte zur Zelllyse auf Eis durchgeführt (siehe 2.1.6 für verwendete Puffer). Zur Herstellung von Zelllysaten wurden adhärente Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst und mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Lyse für 60 Minuten in 50 µl Lysepuffer auf Eis. Danach wurden verbleibende Membranbestandteile durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 16 000 G pelletiert, das Proteinlysate im Überstand abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach dem Prinzip der Proteinbestimmung von M. Bradford mit dem DC Protein Assay entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Anschließend wurden alle Lysate durch Verdünnung mit Lysepuffer auf die gleiche Proteinkonzentration angeglichen.

2.2.6 Co-Immunpräzipitation

Zum Nachweis von Protein/Protein-Interaktionen wurde einer der zu untersuchenden Interaktionspartner in der Zellkultur mit einem Affinitäts-*tag* überexprimiert. Nach der Herstellung eines Zelllysates wurde das überexprimierte Protein mit Hilfe von Antikörpern, die an eine Festphase gebunden sind, präzipitiert. Der Nachweis des zweiten Interaktionspartners erfolgte nach Durchführung einer SDS-PAGE und eines *Western blot* mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Für die Co-Immunpräzipitation wurden 4×10^5 1205LU Zellen pro *well* in einer 6-*well*-Platte ausplattiert und bis zu einer lichtmikroskopisch abgeschätzten Zelldichte von 80 % kultiviert. Anschließend wurden FLAG-Fusionskonstrukte der zu untersuchenden Proteine mittels Transfektion überexprimiert. Dafür wurde pro *well* 1 µg Plasmid-DNA mit 3 µl GeneJuice entsprechend dem Protokoll des Herstellers transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion des Konstrukts wurden die Zellen mit dem jeweiligen Virus infiziert. Weitere 24 Stunden nach der Infektion wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin abgelöst, mit PBS gewaschen und anschließend mit 250 µl Lysepuffer pro *well* ein Zellysats hergestellt. 30 µl des Zellysats wurde mit 15 µl Lämmli-Puffer aufgeköcht und als *input* (IN) eingefroren. Zur Präzipitation des überexprimierten FLAG-Konstrukts wurde 30 µl Anti-FLAG *M2 Affinity Gel* Suspension verwendet. Diese besteht aus IgG Antikörpern gegen das FLAG-Octapeptid, die an Agarose-*beads* als stationäre feste Phase gebundenen sind. Das Lysat wurde für eine Stunde bei 4°C mit 30 µl Anti-FLAG *Gel* Suspension inkubiert, die vorher vier Mal mit Lysepuffer gewaschen wurde. Nach der Inkubation wurden die *beads* erneut vier Mal mit Lysepuffer gewaschen, in 40 µl Lysepuffer resuspendiert und mit 20 µl Lämmli-Puffer aufgeköcht. Die zentrifugierten *beads* wurden verworfen und der Überstand (IP) aufbewahrt. Anschließend wurden die *input*- (IN) und IP-Fractionen wie in 2.3.4 beschrieben mittels SDS-PAGE und *Western blot* analysiert. Zur Visualisierung der vermuteten Interaktionspartner wurden spezifische Antikörper verwendet.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Als Trennmatrix wurden vertikal zweigeteilte Gele bestehend aus einem Sammelgel und einem Trenngel verwendet. Durch den niedrigeren pH-Wert im Sammelgel erfolgte dort keine Auftrennung, sondern eine Konzentrierung aller Proteine unabhängig ihres Molekulargewichts zu einer scharfen Bande. Aufgrund des höheren pH-Wertes ging dieser Sammeleffekt im Trenngel verloren und die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Der Anteil an Acrylamid im Trenngel bestimmt die Porengröße und somit das Trennverhalten des Gels. Für die durchgeführten Experimente wurden Trenngele mit 10 % und Sammelgele mit 3 % Acrylamid, das unter Zugabe des Radikalbildners Ammoniumperoxodisulfat (APS) vernetzt wurde, verwendet. Das im Gel enthaltene anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS = Sodium Dodecylsulfat) komplexierte die denaturierten Proteine und sorgte für eine konstante, negative Ladung proportional zum Molekulargewicht der Proteine. Die Proben wurden zuvor zusätzlich in SDS-haltigem Lämmli-Puffer für 5 Minuten bei 95°C erhitzt, um jegliche Sekundär- und

Tertiärstrukturen aufzulösen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 Volt für etwa 90 Minuten. Zur Abschätzung der Proteingrößen diente ein Proteinmarker mit bekanntem Molekulargewicht.

2.3.2 Protein Färbung

Zur unspezifischen Anfärbung aller in der Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurde eine Coomassie-Brilliant-Blau G-250 Lösung verwendet (siehe 2.1.6). Das zu analysierende Polyacrylamid Gel wurde für 60 Minuten gefärbt und anschließend für 12 Stunden in ddH₂O entfärbt.

2.3.3 Western blot

Allgemeines Funktionsprinzip

Zum spezifischen Nachweis einzelner, im SDS-Polyacrylamid Gel aufgetrennter Proteine mit einem Antikörper wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran als Matrix übertragen (engl. *blotting*). Dafür wurde senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine entsprechend ihrer Größenauftrennung auf die Membran wanderten und dort durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen adhärirten. Anschließend wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch Milchprotein abgeblockt. Die Detektion einzelner Proteine erfolgte durch Inkubation der Membran mit spezifischen Primärantikörpern in geeigneter Verdünnung. Konsekutive Waschschrte entfernten unspezifisch gebundene Antikörper und erhöhten die Spezifität des Verfahrens. Die eigentliche Visualisierung des detektierten Proteins erfolgte schließlich durch einen Sekundärantikörper, der gegen den Fc-Rezeptor des Primärantikörpers gerichtet ist. Dieser ist mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt, welches das Substrat Luminol oxidativ umsetzt und so eine Chemolumineszenz freisetzt, die digital mit einem CCD Sensor detektiert werden kann.

Versuchsablauf

Als Matrix für den Proteintransfer wurde eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran verwendet, welche zuvor durch Schwenken in Methanol und Inkubation in Transfer Puffer aktiviert wurde. Der Transfer wurde mit Hilfe eines *semi-dry transfer* Systems bei 150 mA für 55 Minuten durchgeführt. Das anschließende Blocken erfolgte mit 5 % Milchpulver in TBS-Tween für mindestens 60 Minuten. Primärantikörper wurden zwischen 1:100 und 1:1000 in 5 % BSA in TBS-Tween verdünnt und über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Sekundärantikörper wurden in 1:1000 Verdünnung in 5 % Milchpulver in TBS-Tween für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach jedem Arbeitsschritt erfolgten 3 Waschschrte je 10 Minuten in TBS-Tween Lösung. Die Visualisierung der Proteine erfolgte digital im *Luminescence Image Analyzer 4000* nach Benetzung der Membran mit 1 ml ECL Substrat. Um

weitere Proteine auf der Membran detektieren zu können, wurde der verwendete Primärantikörper anschließend mit einem β -Mercaptoethanol-haltigen *stripping* Puffer entfernt und mit einem weiteren Antikörper inkubiert.

2.3.4 Nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*Native-PAGE*)

Um Proteine und Proteinkomplexe in ihrer nativen, nicht-denaturierten Form darzustellen, wurden diese in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch ohne den Zusatz von SDS aufgetrennt. Im Gegensatz zur in 2.3.1 beschriebenen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine dabei lediglich entsprechend ihres isoelektrischen Punktes pI aufgetrennt. Die aufzutrennenden Proben wurden dazu ohne anschließendes Erhitzen in einem SDS-freien *Native*-Ladepuffer verdünnt. Die Auftrennung erfolgte bei 4°C in einem SDS-freien Trenngel mit 10 % Polyacrylamid bei einer konstanten Spannung von 70 Volt für 90 Minuten. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-Glycin Puffer verwendet, wobei dem Kathodenpuffer 1 % Deoxycholsäure hinzugefügt wurde. Anschließend erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran wie in 2.3.3 beschrieben. Für den Transfer wurde allerdings ein *wet blotting* System verwendet. Dieser erfolgte in einem SDS-freien Tris-Glycin Puffer bei 4°C für 70 Minuten bei einer konstanten Spannung von 100 V. Die weitere, antikörpervermittelte Proteindetektion erfolgte wie in 2.3.3 beschrieben.

2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Nukleotiden wurde ein Agarose-Gel verwendet. Dafür wurde Agarose in einem Elektrophoresepuffer aufgeköcht, wodurch beim Abkühlen durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen den Polysacchariden ein Gel entstand. Wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen wanderten Nukleotide durch Anlegen einer elektrischen Spannung durch das Gel hindurch und wurden dabei entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnten die Nukleotide unter ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und extrahiert werden. Ein Nukleotidmarker bekannter Größe erlaubte dabei die Abschätzung der Größe der aufgetrennten Nukleotide. Für die vorliegende Arbeit wurden Gele aus 2 % (w/v) Agarose verwendet, die in 200 ml TBE-Puffer mit 10 μ l Ethidiumbromid aufgeköcht wurde. Die Auftrennung erfolgte in Elektrophorese Laufpuffer bei einer Spannung von 100 V für 1 Stunde. Zur weiteren experimentellen Verwendung der aufgetrennten Nukleotide wurden Banden von Interesse aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem *JETquick Gel Extraction Spin* Kit nach den Vorgaben des Herstellers extrahiert.

2.3.6 Northern blot

Die sequenzspezifische Darstellung von RNA erfolgte mittels *Northern blot*. Analog zum *Western blot* wurde dabei RNA in einem Gel mittels Elektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Die Detektion bestimmter RNA Sequenzen auf der Membran erfolgte durch eine komplementäre Oligonukleotid Sonde, welche radioaktiv markiert wurde. Nach Exposition eines speziellen Films mit der radioaktiven Membran wurde dieser ausgelesen und so das Signal der radioaktiven Sonde auf der Membran detektiert.

Die zu analysierende RNA wurde in einem ersten Schritt unter Verwendung des *TRIZOL Reagent* Kits nach den Vorgaben des Herstellers aus der Probe isoliert. Im Labor von Prof. Conzelmann (Genzentrum, LMU München) wurde die RNA anschließend auf einem Agarose-Gel aufgetrennt. Dafür wurden jeweils 7,2 µl der RNA Präparation mit 1,8 µl Glyoxal 8,8 M und 3 µl 5 x Phosphatpuffer gemischt und für 45 Minuten bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde 3 µl *Blue Juice* Ladepuffer hinzugefügt. Die Auftrennung der RNA erfolgte in einem Formaldehyd-haltigen Agarosegel in 1 x Phosphatpuffer bei 25 V über Nacht. Zur Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose in 4 ml 50 x Phosphatpuffer, 167,3 ml ddH₂O und 26,7 ml 37 % Formaldehyd aufgekocht.

Danach wurde von Konstantin Sparrer ein *Northern blot* angefertigt. Dafür wurde die im Gel aufgetrennte RNA mit Hilfe eines *Biometra Vacu-Blot* Transfersystems durch einen für 2 Stunden angelegten Unterdruck von 100 mBar auf eine Nylon Membran übertragen. Mit 0,125 J UV Licht erfolgte die Vernetzung der RNA mit der Membran.

Zur anschließenden, sequenzspezifischen Detektion der gesuchten RNA auf der Membran wurde eine komplementäre, mit ³²P-α-CTP radioaktiv markierte Sonde verwendet. Diese wurde in Zusammenarbeit mit Konstantin Sparrer, Maximilian Gradel und Andreas Linder erstellt. Um spezifisch das Genom von VSV zu detektieren, wurde ein zum Genom komplementäres, 1000 Basenpaare umfassendes Oligonukleotid als Vorlage zur Produktion der Sonde erstellt. Dieses Oligonukleotid umfasste dabei Teile der Sequenzen des VSV P-, M-, und G-Proteins auf dem viralen Genom. Zur Amplifikation des Oligonukleotids aus dem Genom von VSV dienten die in Tabelle 2.8 beschriebenen Primer. Das so entstandene DNA Fragment wurde mit Hilfe des *Rediprime II DNA Labeling System* Kits nach Vorgabe des Herstellers radioaktiv markiert. Anschließend wurde die Präparation mit dem *QIAquick Nucleotide removal* Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt und bei 95°C denaturiert.

Die *Northern blot* Membran wurde nach dem *blotting* zunächst für 10 Minuten bei 68°C mit Zeta Hybridisierungspuffer inkubiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Sonde in 8 ml Zeta Hybridisierungspuffer über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag wurde die Membran für je 20 Minuten einmalig mit Zeta Waschpuffer 5 % und

anschließend zweimal mit Zeta Waschpuffer 1 % bei 68°C gewaschen. Die eigentliche Detektion des radioaktiven Signals der Sonde erfolgte durch Exposition eines Phosphor Radiographie Films mit der Membran für 3 Tage. Dieser wurde anschließend mit Hilfe eines *Storm 860 Molecular Imager* ausgelesen.

2.3.7 ATPase Assay

Der *ADP Quest Assay* ist eine fluoreszenzbasierte Methode zur Messung von ADP, welches im Allgemeinen bei der Hydrolyse von ATP entsteht. Dieser Assay diente zur Messung der ATP-Hydrolyse Aktivität von rekombinanten RIG-I-like-Helikasen in Gegenwart von verschiedenen Liganden.

Allgemeines Funktionsprinzip

Die Messung von ADP erfolgte durch die Umsetzung von ADP in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin in mehreren enzymkatalysierten Schritten. Vermittelt durch die Pyruvatkinase wurde dabei ADP mit Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat umgesetzt. Die Pyruvatoxidase setzte in einer anschließenden Reaktion Pyruvat zum Nebenprodukt Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um. Das fluoreszierende Resorufin entstand nun durch eine Peroxidasereaktion aus seinem Vorläufer Acetyldihydroxyphenoxazine (ADHP) und dem entstandenen H₂O₂. Nach Anregung des Farbstoffs durch Licht der Wellenlänge 530 nm konnte das Fluoreszenzsignal als Emissionslicht der Wellenlänge 590 nm ausgelesen werden. Das Fluoreszenzsignal war dabei direkt proportional zur ADP Konzentration im Reaktionsansatz.

Versuchsablauf

Der ATPase Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 µl auf einer 384-well Platte durchgeführt. Als Reaktionspuffer wurde der ATPase Puffer des Herstellers verwendet. Rekombinantes Protein wurde dabei in einer Endkonzentration von 1,3 ng/µl verwendet, für die verwendeten RNA Liganden wurde eine Endkonzentration von 1 ng/µl gewählt. Um eine vorzeitige ATP-Hydrolyse zu erschweren, wurde der Reaktionsansatz auf Eis pipettiert und ATP in einer Endkonzentration von 100 µM als letztes hinzugefügt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 90 Minuten bei 37°C inkubiert und das Fluoreszenzsignal mit Hilfe eines Mithras LB 940 Mikroplattenlesers ausgelesen. Die Inkubationszeit von 90 Minuten wurde auf Grundlage einer Kinetik zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von spezifischem Signal zu Hintergrundsignal gewählt (siehe Abb. 2.4). Dafür wurde LGP2 mit ATP und einem RNA Liganden (2.2ds-OH, Sequenz siehe Tab. 2.1) inkubiert und der Umsatz von ATP zu ADP zu verschiedenen Zeitpunkten wie oben beschrieben gemessen. Bei 90 Minuten Inkubationszeit lag der Umsatz von ATP, gemessen in frei gewählten Fluoreszenzeinheiten *arbitrary units* (AU), im Bereich des linearen Anstiegs. Es lag ein sogenanntes Fließgleichgewicht vor.

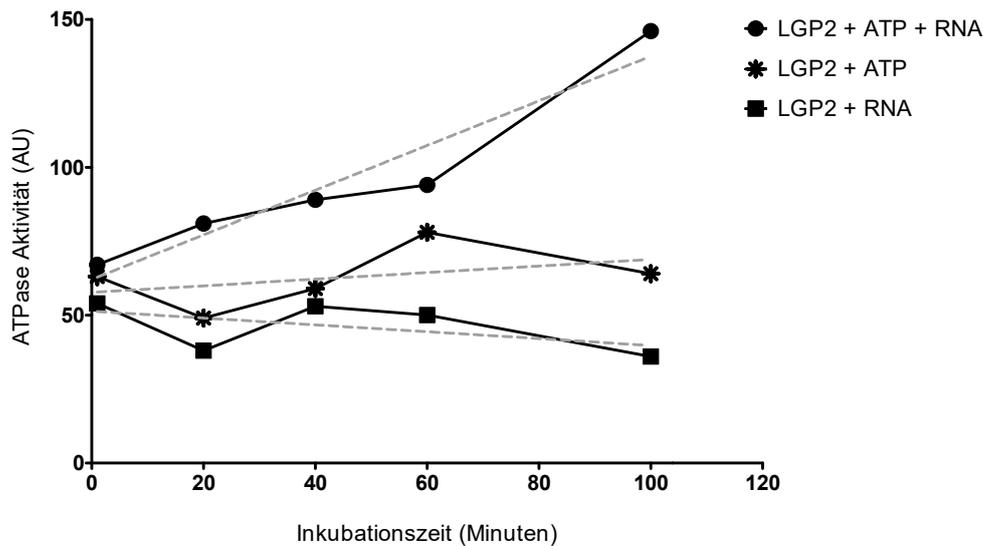


Abbildung 2.1 Kinetik des ATPase-Assay mit rekombinatem LGP2

Rekombinantes LGP2 mit einer Endkonzentration von 1,3 ng/μl wurde wie dargestellt in verschiedenen Ansätzen parallel jeweils mit und ohne 2.2ds-OH RNA auf Eis inkubiert. Im Abstand von 20 oder 40 Minuten wurde den Reaktionsansätzen ATP hinzugefügt und diese bei 37°C über die oben angegebene Zeit inkubiert. Als Kontrollgruppe dienten Ansätze ohne RNA oder ohne ATP. 100 Minuten nach der ersten Stimulation wurde in allen Ansätzen parallel die Konzentration des produzierten ADP mittels des *ADP Quest Assay Kits* nach den Vorgaben des Herstellers gemessen. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU), angegeben. Die unterbrochenen Linien stellen die durch lineare Regression mit der Software Graph Pad Prism angenäherten Trendlinien der Kurven dar. Gezeigt ist ein repräsentativer Einzelversuch.

2.3.8 Aufreinigung von rekombinanten Proteinkonstrukten

Allgemeines Funktionsprinzip

Zur Expression und Reinigung von rekombinatem Protein steht eine Vielzahl an Expressionsorganismen zur Verfügung, der einfachste davon ist *E. coli*. Zur korrekten Faltung benötigen einige Proteine jedoch das posttranslationale Modifikationssystem eukaryotischer Organismen. Hier bieten sich beispielsweise Insektenzelllinien an. Diese Zelllinien lassen sich nicht wie *E. coli* direkt mit dem Expressionsplasmid transformieren, sondern werden mit einem modifizierten Baculovirus infiziert, der das Expressionskonstrukt des zu exprimierenden Proteins in die Insektenzellen liefert.

Zur spezifischen Isolation wurden Proteinkonstrukte als Fusionskonstrukt mit Sechs Histidin-Aminosäuren als Affinitäts-tag (6 x HIS-tag) exprimiert. Durch die hohe Affinität der Histidin-Residuen zu Nickel Ionen konnte das exprimierte Protein aus dem Zellysate isoliert und anschließend mit hochmolarem Imidazol aus der Bindung an Nickel verdrängt werden. Zur weiteren affinitätschromatographischen Aufreinigung wurden Flüssigchromatographiesysteme verwendet. Neben der Ionenaustausch-Chromatographie fand auch die Heparin-Affinitätschromatographie Anwendung. Heparine sind negativ geladene Glykosaminoglykane, die durch starke Sulfatierung saure Eigenschaften besitzen. Immobilisierte Heparine lassen sich

sowohl als allgemeiner Ionen-Austausch Ligand, als auch als Affinitätsligand für Nukleotid-bindende Enzyme verwenden. Dem Prinzip der Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie liegt die Tatsache zugrunde, dass sich die physikalischen Bindungseigenschaften eines Proteins durch graduelle Änderung der Salzkonzentration des Chromatographiepuffers verändern lassen. Auf diese Weise lässt sich ein gebundenes Protein spezifisch von der Matrix der Affinitätssäule fraktioniert ablösen (eluieren) und so von anderen unspezifisch gebundenen Bestandteilen isolieren.

Alle Arbeiten zur Proteinexpression und chromatographischen Proteinaufreinigung wurden bei einer Temperatur von 4°C im Labor von Prof. Hopfner durchgeführt.

Proteinexpression in *E. coli*

Die Expression einer rekombinanten LGP2-RD Domäne erfolgte in *E. Coli* Rosetta DE3 Zellen mittels Transformation eines pET28-LGP2-RD-6xHIS Expressionsplasmids (siehe Tab. 2.6). Ein mit dem Expressionskonstrukt transformierter Rosetta DE3 Glycerolstock wurde von Diana Pippig aus dem Labor von Prof. Hopfner zur Verfügung gestellt. Für 1 l Expressionskultur wurden 10 ml Vorkultur aus dem Glycerolstock angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Expressionskultur wurde am nächsten Tag im Verhältnis 1:100 aus der Vorkultur angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 18°C im Schüttelinkubator inkubiert. Bei erreichter OD₆₀₀ wurde mit 0,1 mM IPTG die Proteinexpression induziert und die Kultur für 18 Stunden bei 18°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die anschließend pelletierten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

Erstellung des *bacmid-shuttle*-Vektors zur Expression in Insektenzellen

Der zur Herstellung des Baculovirus notwendige, sogenannte *bacmid-shuttle*-Vektor wurde durch Transformation des jeweiligen pFBDM-Vektorkonstrukts in *E. coli* DH10 MultiBac erzeugt. Dafür wurden die kompetenten Zellen mittels Hitzeshock bei 42°C transformiert und anschließend in 900 µl S.O.C. Medium bei 37°C für 4 Stunden inkubiert. Die Selektion erfolgte mittels Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agar Kulturplatten mit Kanamycin, Gentamicin, Tetrazyklin, X-Gal und IPTG, auf der Kolonien mit erfolgreicher Transposition des Plasmids in die *bacmid*-DNA weiß erschienen. Die *bacmid*-DNA wurde aus der isolierten Bakterienkolonie über eine 200 ml Flüssigkultur amplifiziert, mit einem *Qiagen Plasmid Midi* Kit nach Vorgabe des Herstellers isoliert und bei -20°C gelagert.

Proteinexpression in Insektenzellen

Zur Proteinexpression in Insektenzellen wurde ein modifiziertes *Bac-to-Bac* Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet. Die Produktion des Baculovirus erfolgte durch Transfektion der *bacmid*-DNA in *High Five* SF9 Insektenzellen. Dafür wurden 5 µg des *bacmid*-Plasmids mit 2 µl FuGENE für 45 Minuten in 200µl *High Five* Zellmedium inkubiert und damit anschließend 1 x 10⁶ *High Five* SF9 Insektenzellen in 2 ml Zellmedium transfiziert. Die Zellen wurden

danach in einer 6-well Zellkulturplatte für 48 Stunden bei 27,5°C in einem Schüttelinkubator bei 85 rpm inkubiert und anschließend die erste Generation des Baculovirus im Überstand abgenommen. Mit dem jeweiligen Baculovirus wurde über zwei weitere Generationen je 50 ml Insektenzellsuspension bei einer Zellzahl von 5×10^5 / ml infiziert und für 72 Stunden bei 27,5°C im Schüttelinkubator bei 85 rpm inkubiert, um den Virustiter weiter zu erhöhen.

Zur letztendlichen Proteinexpression wurden SF9 Insektenzellen bei einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen / ml mit 3 ml Baculovirus pro 1 l Insektenzellsuspension infiziert und für 72 Stunden bei 27,5°C in einem Schüttelinkubator bei 85 rpm inkubiert. Anschließend wurden die abzentrifugierten Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Protein Aufreinigung

Zur Aufreinigung des exprimierten Proteins wurden die pelletierten Zellen des jeweiligen Expressionsorganismus aufgetaut und im entsprechenden Lysepuffer (10 % des ursprünglichen Kulturvolumens) resuspendiert. Um Proteindegradation zu verhindern, wurde dem Lysepuffer ein Proteaseinhibitor hinzugefügt (*cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, 1 Tablette je 500 ml Puffer). Nachdem die Expressionszellen durch Sonifikation (3 x 60s, *duty cycle* 7, *output control* 40%) mit einem Branson Sonifier 250 auf Eis aufgebrochen wurden, wurde das Zellysate für 60 Minuten bei 4°C mit 18000 rpm (entspricht 37000 G) in einer Sorvall Ultrazentrifuge Zentrifuge mit einem SS34 Rotor zentrifugiert. Vor den weiteren Aufreinigungsschritten wurde der Überstand mit 0,45 µm Spritzenfiltern filtriert.

In einem ersten Aufreinigungsschritt wurden alle exprimierten Proteinkonstrukte anhand ihres HIS-tags einer Nickel-Affinitätschromatographie unterzogen. Anschließend wurde abhängig vom Konstrukt eine Heparin-Affinitätschromatographie oder eine Ionenaustausch-Chromatographie durchgeführt. Jedem Aufreinigungsschritt folgend wurde die Reinheit der aufgereinigten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung überprüft. Aufgereinigte Fraktionen ausreichender Reinheit wurden zusammengefasst und mittels Ultrafiltration in Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten geeigneter nomineller Molekulargewichtsgrenze konzentriert. Nachfolgend werden die verwendeten Chromatographie Verfahren im Detail erklärt.

Nickel-Affinitätschromatographie

Proteinkonstrukte mit 6 x HIS-tag wurden im ersten Schritt mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt. Dieser Methode liegt die hohe Affinität des Histidin-tags zu Nickel Ionen zugrunde. Als Matrix wurde Nitrilotriessigsäure-Agarose mit Ni^{2+} als Chelatligand (NiNTA) verwendet. Pro Liter Ausgangszellsuspension wurde ein Milliliter NiNTA Agarose in eine Econo-Pac Säule gefüllt und anschließend mit je 5 Säulenvolumina Lysepuffer equilibriert, um unspezifische Proteinbindungen zu reduzieren. Nach Beladen mit

der Proteinsuspension wurde die Matrix konsekutiv mit je 8 bis 10 Säulenvolumina Lysepuffer und Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Anschließend wurde das spezifisch gebundene Protein mit 10 ml Elutionspuffer (enthielt 200 mM Imidazol) von der Matrix verdrängt und aufgefangen.

Heparin-Affinitätschromatographie

Als Nukleinsäure-bindende Proteine eigneten sich die aufgereinigten LGP2-Konstrukte zur weiteren Reinigung mittels Heparin-Affinitätschromatographie. Anschließend an die Nickel-Affinitätschromatographie wurde eine 5 ml HiTrap Heparin HP Säule in einem ÄKTA FPLC Chromatographie-System zur weiteren Aufreinigung verwendet. Nach Equilibrierung der Säule mit 5 Säulenvolumina 150 mM NaCl Niedrigsalzpuffer und Proteinbeladung wurde verbleibendes, ungebundenes Protein mit 4 Säulenvolumina Niedrigsalzpuffer ausgewaschen. Zur Elution wurde ein linearer 100 ml Gradient von 0 bis 100 % 500 mM NaCl Hochsalzpuffer verwendet. Anschließend wurden die Elutionsfraktionen von je 1 ml auf einem SDS-Polyacrylamidgel mittels einer Coomassie-Brillant-Blau Färbung auf ihre Reinheit analysiert und entsprechende Fraktionen zusammengefasst.

Kationenaustausch-Chromatographie

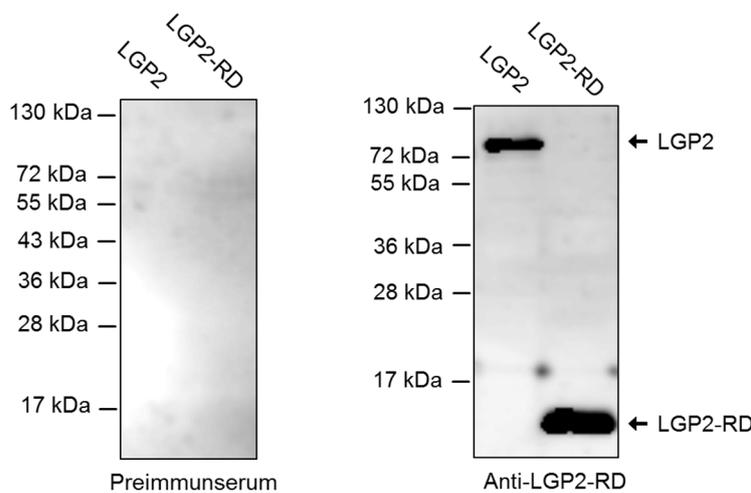
Das Prinzip der Ionenaustausch-Chromatographie wurde für die aufgereinigte LGP2-RD als nächster Aufreinigungsschritt anschließend an die Nickel-Affinitätschromatographie verwendet. Das damit gereinigte Konstrukt lag mit seinem theoretischen isoelektrischen Punkt pI deutlich über 7,5, daher wurde eine Kationenaustausch-Chromatographie unter Verwendung einer 5 ml HiTrap Sepharose FF Chromatographiesäule durchgeführt. Nach Equilibrierung der Säule mit 5 Säulenvolumina 100 mM NaCl Bindungspuffer und Proteinbeladung wurde verbleibendes ungebundenes Protein mit 4 Säulenvolumina Bindungspuffer ausgewaschen. Zur Elution wurde ein 20 Säulenvolumina umfassender linearer Gradient von 0 bis 100 % Hochsalzpuffer, der 1 M NaCl enthielt, verwendet. Die Elutionsfraktionen von je 1 ml wurden mittels SDS-PAGE auf ihre Reinheit überprüft und entsprechende Fraktionen zusammengefasst.

2.3.9 Produktion von LGP2-RD Antiseren

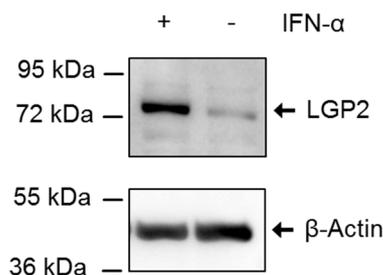
Zur Produktion von Antiserum gegen die LGP2-RD Domäne wurden Hasen mit aufgereinigter rekombinanter LGP2-RD Domäne immunisiert. Rekombinante LGP2-RD Domäne wurde wie oben beschrieben entsprechend des Protokolls aus Pippig et al. in *E. coli* exprimiert und anschließend mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Ionenaustausch-Chromatographie aufgereinigt [73]. Die Produktion des Antiserums erfolgte durch die Firma BioGenes durch Immunisierung von Kaninchen mit dem aufgereinigten Protein. Nach der Grundimmunisierung mit dem Protein am Tag 0 wurden *boosts* jeweils an Tag 7, 14, 28 und 42 durchgeführt. Neben

der Entnahme von Preimmunserum vor der Immunisierung am Tag 0 erfolgten Serumentnahmen jeweils an Tag 28 und 49. Das Antiserum und das Preimmunserum wurden jeweils mittels *Western blot* auf ihre Affinität zu rekombinantem Volllängen-LGP2, LGP2-RD Domäne und LGP2 in Zelllysaten untersucht. Dafür wurde ein LGP2-mCherry Konstrukt in HEK293 Zellen überexprimiert. Außerdem wurden HEK293 Zellen mit Interferon- α (IFN- α) für 24 Stunden stimuliert, um die endogene Expression von LGP2 als Typ-I-Interferon-abhängiges Gen zu induzieren (siehe Abb. 2.1). Dabei zeigte das Anti-LGP2-RD-Antiserum eine hohe Affinität zu rekombinantem LGP2 und LGP2-RD, sowie zu LGP2 im Zelllysat. Endogenes LGP2 ohne vorhergehende Stimulation konnte im Zellsystem nicht zuverlässig detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt).

A



B



C

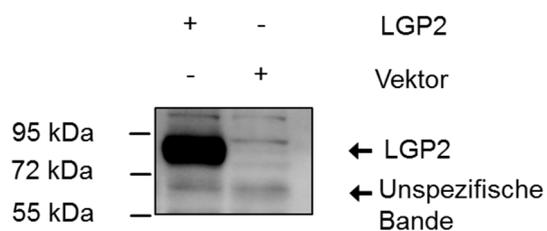


Abbildung 2.2 Anti-LGP2-RD-Antiserum erkennt Volllängen-LGP2

A) Rekombinantes Volllängen-LGP2 (155 ng) und LGP2-RD (10 ng) wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend wurde ein *Western blot* durchgeführt. Als Detektionsantikörper wurde das Hasen-Serum vor Immunisierung mit rekombinantem LGP2-RD (Preimmunserum) und nach Immunisierung (Anti-LGP2-RD) verwendet. Für das Anti-LGP2-RD Antiserum ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten gezeigt. Der *Western blot* mit dem Preimmunserum ist einmalig durchgeführt worden.

B) HEK293 Zellen (50 000 / 500 μ l, 24-well Format) wurden mit 1000 U/ml rekombinantem Interferon- α (IFN α) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE ein *Western blot* durchgeführt. Als Antikörper wurde das Anti-LGP2-RD-Antiserum verwendet. Eine unstimulierte Bedingung diente als Vergleich. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

C) HEK293 Zellen (50 000 / 500µl, 24-well Format) wurden mit einem LGP2-mCherry Konstrukt (LGP2) oder dem mCherry-Leervektor (Vektor) als Kontrolle transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und nach Auftrennung mittels SDS-PAGE ein *Western blot* durchgeführt. Als Antikörper wurde das Anti-LGP2-RD-Antiserum verwendet. Eine unspezifische Bande zeigt eine ähnliche Proteinladung in beiden Bedingungen. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

2.3.10 Aufreinigung von rekombinantem LGP2 und LGP2 K30A

Humanes Volllängen-LGP2

Volllängen-Wildtyp-LGP2 wurde mit einem N-terminalen 6 x HIS-tag im *High Five* Insektenzellsystem exprimiert. Der zur Expression von Wildtyp-LGP2 notwendige Baculovirus wurde von Diana Pippig aus dem Labor von Prof. Hopfner zur Verfügung gestellt. Danach erfolgte die Aufreinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie und Heparin-Affinitätschromatographie. Das gereinigte Protein wurde mit Hilfe einer Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit bei einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 50 000 Dalton auf eine Konzentration von 0,26 mg/ml aufkonzentriert. Das finale Proteinkonzentrat wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung auf Kontaminationen überprüft (siehe Abb. 2.2). In der spektrometrischen Analyse konnten bei einem 260 nm / 280 nm Absorptionsverhältnis von 0,56 Verunreinigungen mit Nukleotiden ausgeschlossen werden.

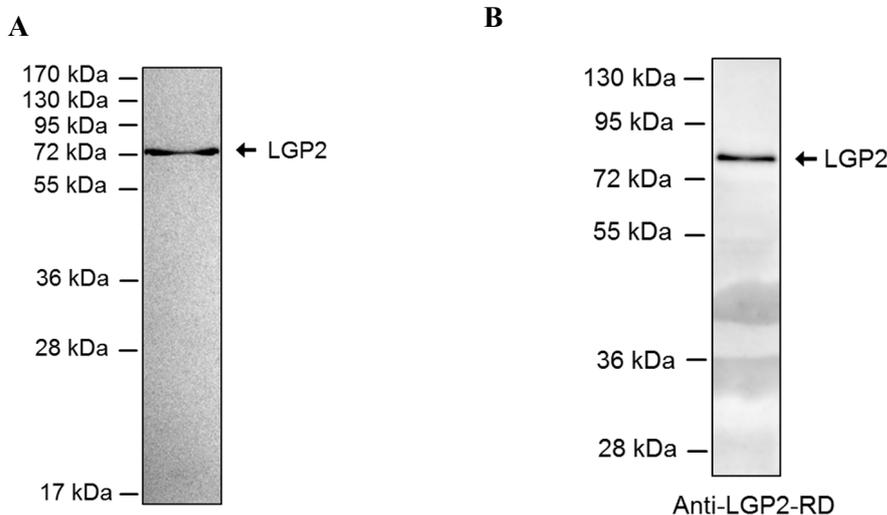


Abbildung 2.3 Aufreinigung von rekombinantem LGP2

Rekombinantes Volllängen-LGP2 wurde wie oben beschrieben aufgereinigt und in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. LGP2 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 76,5 kDa.

A) Coomassie-Brilliant-Blau Färbung. 2 µg der LGP2 Präparation wurden durch eine unspezifische Proteinfärbung dargestellt. Dieses Experiment wurde einmalig als Quadruplikat durchgeführt.

B) *Western blot*. 25 ng der LGP2 Präparation wurde durch das oben beschriebene Anti-LGP2-RD-Antiserum dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus sechs unabhängigen Experimenten.

Humane LGP2 K30A Mutante

Als DExD/H Box-RNA-Helikase enthält die ATPase Domäne von LGP2 eine hochkonservierte Sequenz zur Bindung von ATP, ein sogenanntes Walker-A-*motif*. Eine Mutation von Lysin (K) zu Alanin (A) innerhalb dieser Sequenz verhindert die regelrechte Bindung von ATP und somit die ATP-Hydrolyse [75]. Die humane Walker-A-*motif* Mutante LGP2 K30A wurde mit einem N-terminalen 6 x HIS-tag im *High Five* Insektenzellsystem exprimiert. Zur Aufreinigung von LGP2 K30A wurde die entsprechende Sequenz mittels Restriktion und Ligation in den pFBDM-Expressionsvektor kloniert. Die Herstellung des Baculovirus und die Proteinexpression erfolgten laut Protokoll mit Hilfe von Manuela Moldt im Labor von Prof. Hopfner. Die spezifische Aufreinigung erfolgte mittels Nickel-Affinitätschromatographie und anschließender Heparin-Affinitätschromatographie. Das gereinigte Protein wurde mit einer Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit bei einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 50 000 Dalton auf eine Konzentration von 0,53 mg/ml aufkonzentriert. Das finale Proteinkonzentrat wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau Färbung auf Kontaminationen überprüft (siehe Abb. 2.3). In der spektrometrischen Analyse konnten bei einem 260 nm / 280 nm Absorptionsverhältnis von 0,53 Verunreinigungen mit Nukleotiden ausgeschlossen werden.

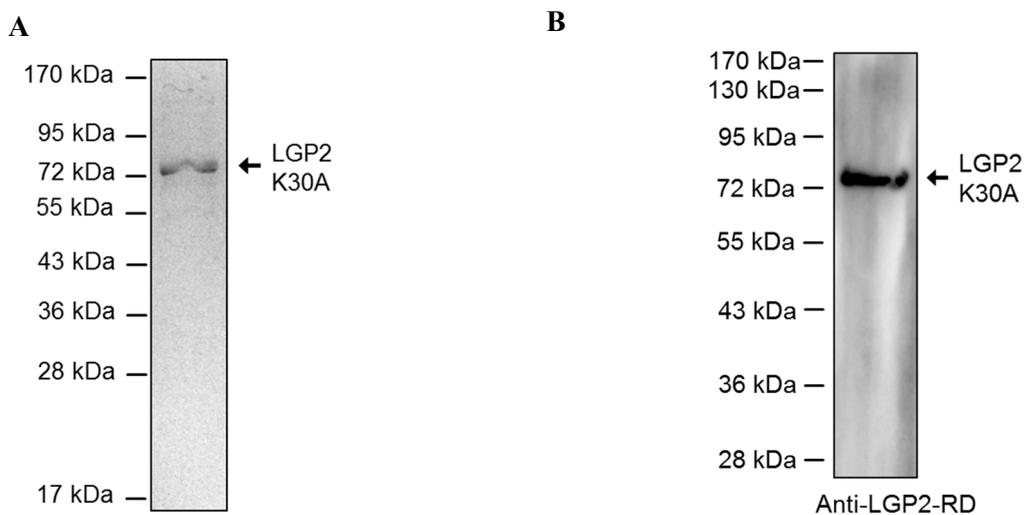


Abbildung 2.4 Aufreinigung von rekombinantem LGP2 K30A

Rekombinantes LGP2 K30A wurde wie oben beschrieben aufgereinigt und mittels SDS-PAGE in einem Gel aufgetrennt. LGP2 K30A hat ein theoretisches Molekulargewicht von 76,5 kDa.

A) Coomassie-Brilliant Blau Färbung. 1 µg der LGP2 K30A Präparation wurde durch eine unspezifische Proteinfärbung dargestellt. Dieses Experiment wurde einmalig als Duplikat durchgeführt.

B) *Western blot*. 25 ng der LGP2 K30A Präparation wurde durch das oben beschriebene LGP2-RD Antiserum dargestellt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei Experimenten. Ein weiteres repräsentatives Experiment wurde mit einem Antikörper gegen ein weiteres Epitop von LGP2 K30A durchgeführt.

2.3.11 Aufreinigung von Ribonukleoprotein Partikeln aus VSV Virionen

Allgemeines Funktionsprinzip

Zur Aufreinigung von viralen Ribonukleoprotein Komplexen (RNPs) wurden intakte Virionen verwendet, die in einem Zellkultursystem hergestellt wurden. Um die notwendige Reinheit für *in vitro* Experimente zu erreichen, waren mehrere Aufreinigungsschritte notwendig. Abgestorbene Zellen und Zelltrümmer aus dem Zellsystem wurden durch Zentrifugation pelletiert. Bei den verwendeten VSV Virionen handelt es sich um membranumhüllte negativ-Strang RNA Viren, das RNP ist im Inneren des Virions enthalten. Das RNP konnte aus dem Virion durch Lyse der Virionenmembran mit Hilfe eines Detergens freigesetzt werden. Die eigentliche Trennung der RNPs von den Membranresten erfolgte unter Ausnutzung der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeiten der Bestandteile mittels Ultrazentrifugation.

VSV Virusproduktion

Zur Produktion von Vesikulärer Stomatitis Virus (VSV) Virionen wurden BHK Zellen verwendet. Da in dieser Hamsterzelllinie der für die Abwehr von Viren essenzielle Interferon-Signalweg defekt ist, können sich die verwendeten Viren sehr gut replizieren und so hohe Virustiter erreichen. Entsprechend des viralen Replikationszyklus befinden sich die entstehenden infektiösen Virionen im Zellüberstand der Zellkultur. BHK Zellen wurden in einer 75 ml Kulturflasche gehalten, als Zuchtmedium wurde GMEM Vollmedium verwendet. Eine lichtmikroskopisch abgeschätzte Zellkonfluenz von etwa 80 % bei guter Zellproliferation wurde als Infektionszeitpunkt gewählt. Nach dreimaligem Waschen mit je 25 ml PBS wurden die Zellen mit einer *MOI* (*multiplicity of infection*) von 0,0001 verdünnt in 3 ml Opti-MEM infiziert. Für einige Experimente waren RNPs aus serumfrei erstellten Virionen notwendig. Dafür wurde das Zellmedium zum Zeitpunkt der Infektion mit dem serumfreien Zellmedium Opti-MEM ausgetauscht. Nach Zwei Stunden Inkubationszeit wurde je nach Verwendungszweck der RNPs das Kulturmedium mit Opti-MEM auf 10 ml aufgefüllt oder durch serumhaltiges GMEM-Vollmedium ersetzt. Bei lichtmikroskopisch abgeschätztem Zelltod von etwa 50 % der Zellen und gut sichtbarem zytopathischen Effekt durch das Virus wurde der Zellüberstand abgenommen. Zelluläre Bestandteile der Virionensuspension wurden nach 30-minütiger Zentrifugation bei 3000 g verworfen.

Aufkonzentration von Virionen

Bei der Produktion von VSV Virionen in serumhaltigem Vollmedium ließ sich ein maximaler Titer von 1×10^9 Virionen / ml erreichen, bei der Produktion in serumfreiem Opti-MEM lediglich maximal 1×10^8 Virionen / ml. Für den folgenden Präparationsschritt mittels Dichtegradientenzentrifugation konnte, begrenzt durch das Rotorvolumen der Zentrifuge, nur eine geringe Menge an Virionensuspension verwendet werden. Um die RNP Konzentration im

fertigen Präparat zu erhöhen, wurde für einige Experimente die produzierte VSV Virionensuspension mittels Ultrafiltration zehnfach konzentriert, bevor die RNPs vom Rest der Virionen getrennt wurden. Dazu wurden Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 100 000 Dalton nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Die Konzentration der Virionensuspension erfolgte durch Zentrifugation bei 1500 g bei 4°C.

Bestimmung des Virustiters

Anschließend wurde die Replikationseffizienz und Konzentrierung des Virus kontrolliert und die Anzahl an replikationsfähigen Virionen bestimmt. Der Algorithmus nach Spearman und Kärber erlaubte mittels einer Endpunktverdünnung des Virus die Bestimmung der Infektiosität. Dazu wurden BHK Zellen in einer 96-well Platte bei 80 % Konfluenz mit seriellen, jeweils zehnfachen Verdünnungen des Virus infiziert. Durch die Gleichung nach Spearman und Kärber konnte dabei die maximale Virusverdünnung bestimmt werden, welche noch einen zytopathischen Effekt auslöst, die sogenannte *tissue culture infectious dose 50 (TCID50)*. Daraus ließ sich die Anzahl der infektiösen Viruspartikel errechnen.

Aufreinigung der RNPs

Die präparative Aufbereitung und Aufreinigung von RNPs aus Virionen erfolgte nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation. Dabei wurden die RNPs durch ihre höhere Sedimentationsgeschwindigkeit von den übrigen Bestandteilen der lysierten Virionen getrennt. Die 15-minütige Inkubation der Virionensuspension mit 1 % (w/v) des nichtionischen Detergens Triton X-100 bei Raumtemperatur setzte die RNPs aus den membranumhüllten Virionen frei. Zur Zentrifugation wurden 3 ml der lysierten Virionen ohne Vermischung auf 2 ml 20 % Saccharose in TEN Puffer geschichtet. Anschließend wurde in einer Optima MAX-XP Ultrazentrifuge in einem MLS-50 Rotor bei 4°C für zwei Stunden bei 35 000 rpm ultrazentrifugiert. Nach dem Dekantieren der Überstände wurden die pelletierten RNPs in geeignetem Puffer resuspendiert und bei -80°C gelagert.

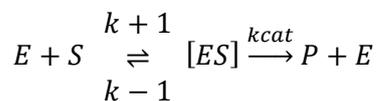
Analytische Gelfiltration

Zur Untersuchung der Reinheit der ultrazentrifugierten RNPs erfolgte eine chromatographische Auftrennung der Proben in einer Sephacryl S500HR 16/60 HiPrep Gelfiltrationssäule mit Hilfe eines ÄKTA micro Chromatographie-Systems. Das theoretische Molekulargewicht der VSV RNP Partikel beträgt etwa 70 000 kDa und fällt damit in den Auftrennungsbereich der Sephacryl S500HR Gelfiltrationssäule, der zwischen ca. 4 kDa und 100 000 kDa liegt. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumina (cv) PBS equilibriert und anschließend mit der in 2 ml PBS resuspendierten RNP Probe beladen. Fraktionen von je 200 µl wurden aufgefangen und entsprechend der Absorptionskurven bei 280 nm und 260 nm mittels Coomassie-Brilliant-Blau Färbung und *Western blot* analysiert. Da sich die Absorptionskurven über mehrere Fraktionen

erstreckten, wurden diese zusammengefasst und mit Hilfe einer Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheit bei einer nominellen Molekulargewichtsgrenze von 100 000 kDa auf ein Volumen von etwa 100 μ l aufkonzentriert. Alle Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.4 Enzymkinetische Auswertung

Die enzymkinetische Analyse der enzymatischen Eigenschaften der RLHs erfolgte auf Grundlage der Michaelis-Menten Kinetik mit Hilfe der Software Graph Pad Prism. Das enzymatisch umgesetzte Substrat war dabei ATP, dessen Zerfall zu ADP und P_i durch die Aktivität der RLHs thermodynamisch begünstigt und damit beschleunigt wurde. Dies geschah unter der Annahme, dass ein Fließgleichgewicht vorlag, bei dem die Konzentration des untersuchten Enzym-Substrat-Komplexes während der untersuchten Zeit annähernd konstant bleibt, das Substrat über die gemessene Zeit also im Überschuss vorhanden war. Entsprechend der Modellvorstellung, die der Michaelis-Menten Kinetik zugrunde liegt, geht dabei das untersuchende Enzym E mit dem spezifischen Substrat S einen reversiblen Enzym-Substrat Komplex [ES] ein, aus dem heraus sich die Katalyse zum Produkt P vollzieht. Die Konstanten k_{+1} und k_{-1} bestimmen die Bildung und Dissoziation des Enzym-Substrat Komplexes, während die Konstante k_{cat} die eigentliche Katalyse bestimmt [115].



Formel 2.1 Umsatz des Substrats S zum Produkt P

Für die Geschwindigkeit v_0 der Gesamtreaktion gilt die Michaelis-Menten Gleichung [115]:

$$v_0 = \frac{v_{max} * [ATP]}{K_m + [ATP]}$$

Formel 2.2 Michaelis-Menten Gleichung

V_0 ist dabei die initiale Reaktionsgeschwindigkeit bei einer definierten ATP Konzentration [ATP], K_m ist die Michaelis-Menten Konstante und v_{max} die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit. Die Michaelis-Menten Gleichung beschreibt dabei eine rechtwinklig hyperbolische Beziehung zwischen der enzymkatalysierten Produktion von ADP pro Zeiteinheit und der im Versuch eingesetzten Konzentration des Substrates ATP. Diese hyperbolische Beziehung kann durch Messung der initialen ADP Produktion bei verschiedenen ATP

Konzentrationen angenähert werden. Bei hoher Substratkonzentration nähert sich die Umsatzgeschwindigkeit einem Maximalwert v_{\max} asymptotisch an, bei dem alle Enzymmoleküle im Reaktionsansatz mit ATP gesättigt sind [115].

Alle Experimente zur Enzymkinetik der RLHs basieren auf dem Prinzip, dass über einen definierten Zeitraum die Produktion von ADP durch das zu untersuchende Enzym *in vitro* mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* gemessen wurde. Dies erfolgte über ein unspezifisches Fluoreszenzsignal wie in 2.3.7 beschrieben. Es wurden Reaktionsansätze von je 10 μl verwendet und der RNA Ligand mit einer Endkonzentration von 1 $\text{ng}/\mu\text{l}$ zugesetzt. Das dabei entstandene ADP wurde aus dem gemessenen Fluoreszenzsignal mittels einer Eichgeraden errechnet, die durch Messung bekannter ADP Konzentrationen erstellt wurde.

Zur Bestimmung der Fließgleichgewichtsparameter K_m , v_{\max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m wurde in parallelen Ansätzen ATP in ansteigenden Endkonzentrationen von 5, 10, 50, 100, 500 oder 1000 μM hinzugefügt. Die Auslesung des Fluoreszenzsignals erfolgte nach 90-minütiger Inkubation mit der jeweiligen RLH, das dabei produzierte ADP wurde mit Hilfe einer Eichgeraden errechnet. Die rechtwinklig hyperbolische Beziehung zwischen der Umsatzgeschwindigkeit $d[\text{ADP}]/dt$ und der eingesetzten ATP Konzentration wurde aus den so ermittelten Messwerten durch nicht-lineare Regression nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit der Software Graph Pad Prism angenähert. Dabei wurden die experimentell gemessenen Daten an die Michaelis-Menten Gleichung so angepasst, dass deren Parameter v_{\max} und K_m die kleinste Fehlerquadratsumme in Bezug auf die gemessenen Daten aufwiesen. So konnten die Fließgleichgewichtsparameter K_m , v_{\max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m rechnerisch ermittelt werden.

Die Michaelis-Menten Konstante K_m ist eine enzymspezifische Konstante, die der Substratkonzentration entspricht, bei der die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht ist ($v = \frac{1}{2} v_{\max}$). Dabei ist die Hälfte der Enzymmoleküle mit Substrat gesättigt. Sie ist eine Maßzahl für die Affinität des Enzyms zum jeweiligen Substrat, welche ansteigt, je geringer K_m ist. Die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} ist bei vollständiger Sättigung aller verfügbaren Enzymmoleküle mit ihrem Substrat erreicht. v_{\max} entspricht damit einer maximal möglichen Umsatzgeschwindigkeit von ATP zu ADP für eine bestimmte Enzymmenge. In der graphischen Darstellung der Michaelis-Menten Gleichung entspricht v_{\max} jenem Wert, an den sich die rechtwinklige Hyperbel asymptotisch annähert. Dieser kann durch Extrapolation der Reaktionsgeschwindigkeit bei sehr großen Substratkonzentrationen bestimmt werden [115].

Die Wechselzahl k_{cat} entspricht im Falle der enzymkinetischen Charakterisierung der RLHs der Anzahl an ATP Substratmolekülen, die von einem Enzymmolekül in einer bestimmten Zeitspanne in ADP umgesetzt wird. Sie beschreibt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der ATP-Hydrolyse (siehe Formel 2.1) [115]. Unter Einbeziehung von k_{cat} lässt sich die Michaelis-Menten Gleichung wie folgt umformen [115,116]:

$$v_0 = \frac{k_{cat} * [Enzym] * [ATP]}{K_m + [ATP]} x$$

Formel 2.3 Umgeformte Michaelis-Menten Gleichung

Einbeziehung der Wechselzahl k_{cat} in die Michaelis-Menten Gleichung.

Aus der Relation der Wechselzahl k_{cat} und der Michaelis-Menten Konstante K_m kann die katalytische Effizienz k_{cat} / K_m errechnet werden. Sie ist eine Maßzahl für die Effizienz der Umsetzung des Substrates ATP zum Produkt ADP und die Relation aus Aktivität und Affinität des Enzyms [116].

Ein Maß für die entsprechend der Enzymmenge normierte Umsatzgeschwindigkeit von ATP zu ADP ist die spezifische ATP-Hydrolyse Aktivität. Sie wird als $d[ATP]/dt$ pro Milligramm Enzym definiert. Zur Bestimmung dieses Wertes wurde die Konzentration von produziertem ADP in Relation zur vergangenen Zeit nach Zugabe von 100 μ M ATP wie in 2.3.7 beschrieben mit dem *ADP Quest Assay* Kit gemessen, auf ein Milligramm des eingesetzten Enzyms normiert und graphisch aufgetragen. Im Fließgleichgewicht ergibt sich so ein lineares Verhältnis zwischen der Konzentration von ADP und der Zeit nach Zugabe von ATP, das durch eine Geradengleichung der Form $y = ax + b$ beschrieben werden kann. Die Steigung a entspricht dabei der spezifischen ATP-Hydrolyse Aktivität als Zunahme von ADP pro Minute pro Milligramm Enzym, y entspricht der Menge an umgesetztem ATP und x der seit Zugabe von ATP vergangenen Zeit [117]. Diese Gleichung wurde für jedes untersuchte Enzym durch *in vitro* Messung der Menge an umgesetztem ADP zu verschiedenen Zeitpunkten errechnet, wobei angenommen wurde, dass zum Zeitpunkt 0 kein ADP im jeweiligen Ansatz vorhanden war. Mit Hilfe bekannter ADP Konzentrationen wurde eine Eichgerade erstellt und so die gemessenen Fluoreszenzeinheiten *arbitrary units* (AU) in ADP Konzentrationen übertragen. Die ermittelten Werte wurden jeweils um die über den gemessenen Zeitraum stattgefundene spontane, enzymunabhängige ATP Spaltung korrigiert.

2.5 Statistische Analyse

Die für diese Arbeit erhobenen Daten werden, sofern nicht anders beschrieben als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe der Software Graph Pad Prism. Zur Ermittlung der statistischen Signifikanz des Unterschiedes zweier Analysen wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests durchgeführt. Ab einem p-Werten von $p < 0.05$ wurde statistische Signifikanz angenommen. Dabei wurden Werte von $p < 0,05$; $p < 0,01$ und $p \leq 0,001$ mit *, ** und *** wie in den entsprechenden Abbildungen dargestellt gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Der *knockdown* von LGP2 verringert im Zellsystem die stimulationsabhängige Produktion antiviraler Zytokine

Seit seiner Erstbeschreibung wurden für LGP2 in der Literatur verschiedene, teils widersprüchliche Funktionen beschrieben. Während LGP2 ursprünglich als negativer Regulator von RIG-I charakterisiert worden war, zeichneten daraufhin Experimente mit drei unabhängig erstellten *knockout* Mäusen ein weitaus komplexeres Bild. Während Satoh et al. und Suthar et al. LGP2 als positiven Regulator für RIG-I und MDA5 beschreiben, beobachteten Venkataraman et al. eine negative Regulation für RIG-I und positive Regulation für MDA5 [77-79]. Obwohl LGP2 mittlerweile auf molekularer und zellulärer Ebene als Interaktionspartner von MDA5 ausführlich charakterisiert worden ist, steht eine umfassende Einfügung in die Funktion der RLHs bis auf weiteres aus [83]. Es wurde jedoch gezeigt, dass LGP2 auch mit RIG-I interagiert [20]. Daher sollte die Modulation der antiviralen Immunantwort durch LGP2 in einem humanen Zellsystem untersucht und der in den verschiedenen Mausmodellen beschriebene Funktionsverlust nach Verlust von LGP2 nachvollzogen werden. Es sollte sich der Fragestellung genähert werden, welchen Einfluss LGP2 als Interaktionspartner von RIG-I und MDA5 Stimulus-spezifisch auf die Erkennung von RNA Viren und die Produktion proinflammatorischer Zytokine hat. Dazu wurden zwei LGP2-spezifische siRNA erstellt und ein transients, posttranskriptioneller *knockdown* von LGP2 in der Zellkultur durchgeführt.

Der *knockdown* von LGP2 erfolgte durch zweimalige Transfektion einer siRNA je zum Zeitpunkt 0 und 24 Stunden in der Melanomzelllinie 1205LU. Als Kontrollbedingung wurde die unspezifische siRNA CO4 in parallelen Ansätzen transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die mRNA der behandelten Zellen isoliert und das Zellmedium zur Analyse im ELISA abgenommen. Um exemplarisch die Effizienz des *knockdowns* auf Protein-Ebene zu validieren, wurde in einem Kontrollversuch ein LGP2-FLAG Konstrukt zeitgleich zur ersten siRNA-Transfektion überexprimiert. Nach 48 Stunden wurde mittels *Western blot* die Expression des FLAG-Konstrukts in der LGP2 *knockdown*- und Kontrollbedingung verglichen. Zusätzlich erfolgte die Detektion des Kontrollproteins β -Actin, zur Kontrolle, ob in den verglichenen Bedingungen eine ähnliche Gesamtproteinmenge vorhanden ist (siehe Abb. 3.1.1).

Um den Einfluss des *knockdowns* von LGP2 auf die Immunantwort zu untersuchen, wurde die RLH-abhängige Signalkaskade durch Infektion mit den von RIG-I erkannten Viren VSV M51R und Sendai Virus, sowie Semliki *forest* Virus (SFV42), das sowohl von MDA5, als auch von RIG-I erkannt wird, stimuliert [118]. Zusätzlich wurde der synthetische MDA5 Ligand pl:C zur Stimulation verwendet. Die Stimulation erfolgte für 6 und 24 Stunden. Anschließend wurde die Expression des Zytokins IP10 (*Interferon gamma-induced protein 10*) mittels qRT-PCR und im

Zellüberstand mittels ELISA gemessen. IP10 wird sowohl Interferon-abhängig, als auch direkt durch die RLH-Signalkaskade MAVS- und IRF-3-abhängig induziert und spiegelt somit die Aktivierung der RLH-Signalkaskade sowie die Amplifikation der Immunantwort durch die RLH-abhängige Induktion pro-inflammatorischer Zytokine wieder [119,120].

Durch die Transfektion von siRNA 1 zeigt sich im *Western blot* im Vergleich zur Kontroll-siRNA CO4 eine vollständige Unterdrückung der LGP2-FLAG Expression. Die parallele Detektion von β -Actin zeigt dabei eine ausgeglichene Proteinladung in beiden Bedingungen. In der qRT-PCR erfolgt jeweils für die siRNA 1 und siRNA 2 die Validierung der *knockdown*-Effizienz. So vermindert sich nach 48 Stunden die LGP2 mRNA je nach Bedingung zuverlässig um 80 % bis 95 % relativ zu den mit CO4 transfizierten Kontrollbedingungen (siehe Abb. 3.1.2).

Das Fehlen von LGP2 als Interaktionspartner der RLH-Signalkaskade spiegelt sich in einer signifikanten Einschränkung der Immunantwort auf verschiedene Stimuli wieder. Durch den *knockdown* von LGP2 verringert sich nach Stimulation mit den RIG-I-abhängigen Viren VSV M51R und Sendai Virus die Expression und Produktion von IP10 signifikant um etwa 60 % bis 90 %. Auch die Immunantwort des von MDA5 und RIG-I erkannten Virus SFV42 reduziert sich um ähnliche Werte. Dies gilt auch für das synthetische, MDA5-abhängige RNA Analogon pI:C. Damit ist sowohl die Erkennung viraler, als auch synthetischer Liganden eingeschränkt und es zeigt sich ein deutlich weniger immunkompetenter Phänotyp als in Anwesenheit von LGP2. Dies bestätigt sich sowohl in der qRT-PCR, als auch im ELISA. Insbesondere nach der Stimulation mit SFV42 und pI:C können, je nach verwendeter siRNA jedoch relativ große Unterschiede in der IP10 Expression festgestellt werden. Die Verringerung im Vergleich zur Kontrolle ist jedoch durch beide siRNAs signifikant. Dies könnte dem relativ starken zytotoxischen Effekt von SFV42 und pI:C geschuldet sein, wodurch die stimulierten Zellen schnell in ihrer Integrität geschädigt werden und es deshalb zu großen Schwankungen in der Proteinexpression kommen kann.

Im verwendeten humanen Zellsystem präsentiert sich LGP2 also als positiver Regulator sowohl für RIG-I, als auch für die MDA5-abhängige Ligandenerkennung unabhängig davon, ob virale oder synthetische Liganden verwendet werden.

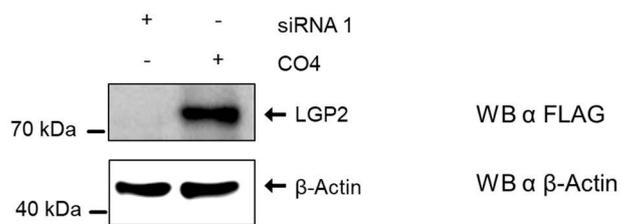
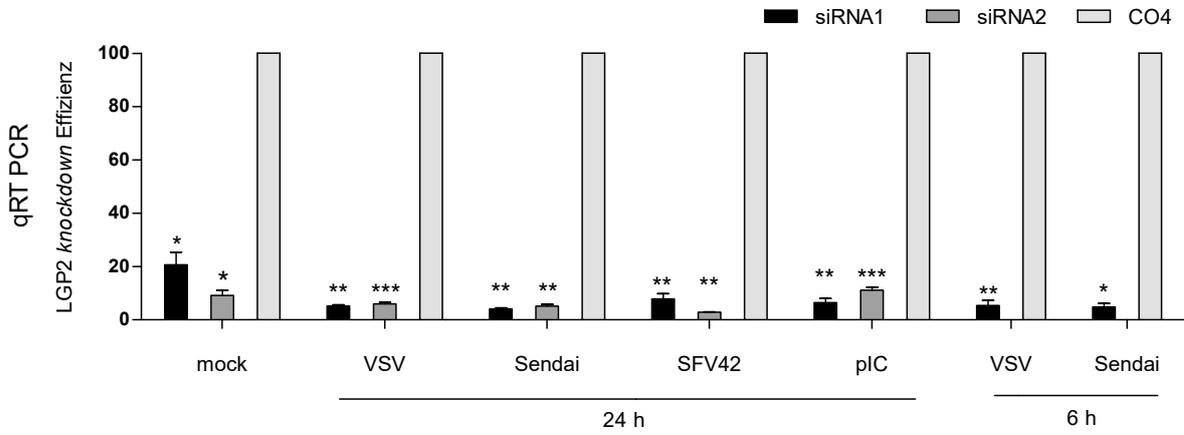


Abbildung 3.1.1 Effizienz des *knockdowns* von LGP2 durch siRNA 1

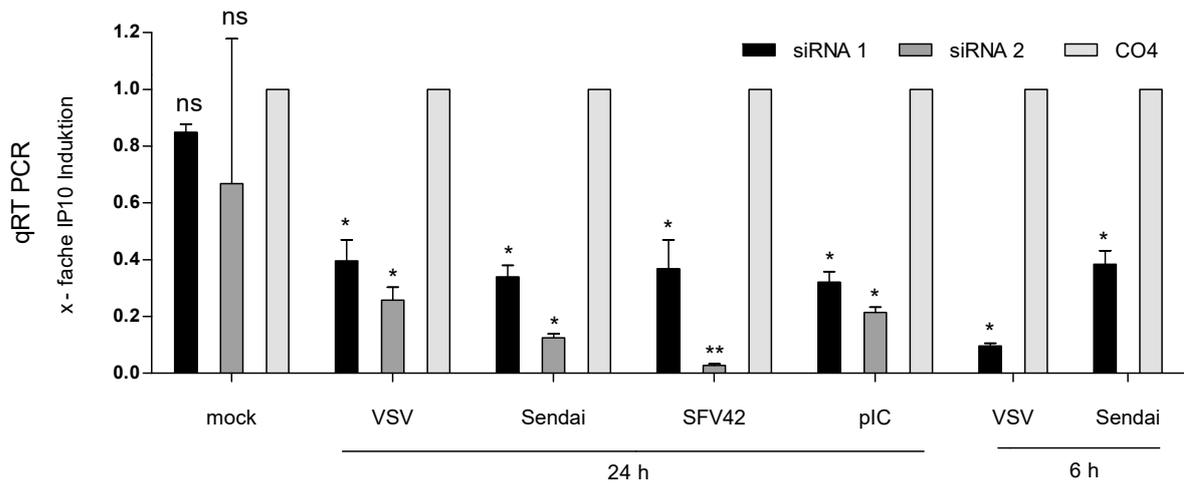
1205LU Zellen (5×10^4 / 500 μ l, 24-well Format) wurden entweder mit LGP2 siRNA1 (20 μ M) oder Kontroll-siRNA CO4 (20 μ M) transfiziert. Gleichzeitig wurde ein LGP2-FLAG Expressionskonstrukt transfiziert. Weitere 24 Stunden später wurden die Zellen lysiert und LGP2 wurde im *Western blot* mit Hilfe eines Anti-FLAG-Antikörpers nachgewiesen (WB α FLAG). Zur Kontrolle der Menge der Proteinladung wurde außerdem β -Actin mit Hilfe eines Antikörpers detektiert (WB α β -Actin). Dieses Experiment wurde exemplarisch einmalig durchgeführt.

Abbildung 3.1.2

A



B



C

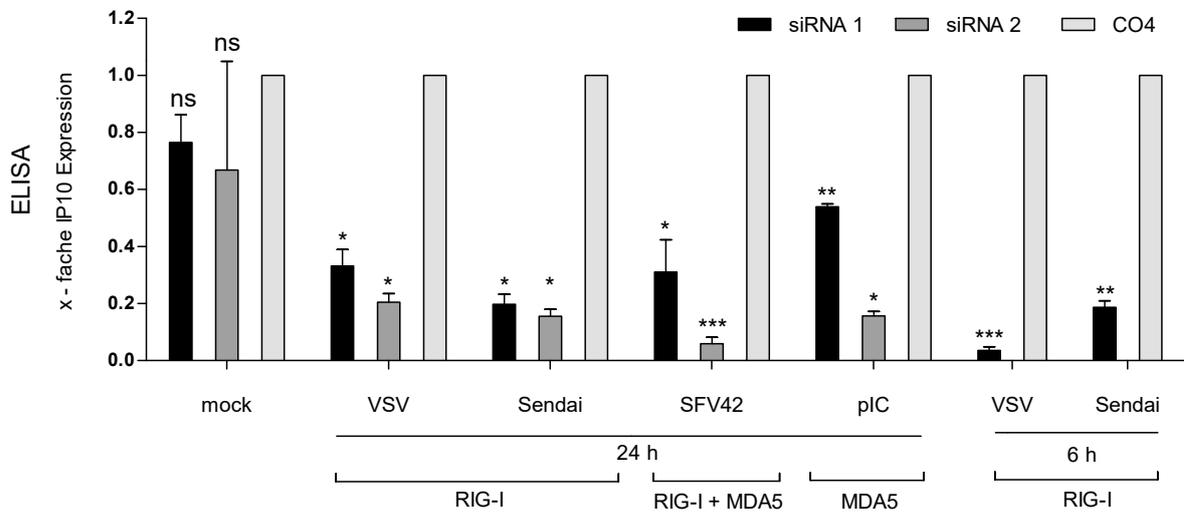


Abbildung 3.1.2 Der *knockdown* von LGP2 verringert die Produktion von IP10 nach viraler Infektion und Stimulation mit pl:C

1205LU Zellen (5×10^4 / 500 μ l, 24-well Format) wurden entweder mit LGP2 siRNA 1 (20 μ M), LGP2 siRNA 2 (20 μ M) oder Kontroll-siRNA CO4 (20 μ M) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen erneut mit der gleichen siRNA transfiziert. Die Infektion mit VSV M51R, Sendai Virus und SFV42 sowie die Transfektion mit pl:C erfolgte nach 24 oder 42 Stunden. 48 Stunden nach der ersten Transfektion wurden alle Zellen lysiert, sodass die Bedingungen wie dargestellt für 24 oder 6 Stunden stimuliert wurden. Anschließend wurden die isolierte zelluläre mRNA sowie die Zellüberstände analysiert.

A) Die *knockdown*-Effizienz der verwendeten siRNA wurde mittels qRT-PCR validiert. Die Expression wurde relativ zum Haushaltsgen HGPRT bestimmt. Das Expressionsniveau von LGP2 in den mit siRNA 1 und siRNA 2 behandelten Bedingungen wird prozentual zur jeweiligen CO4 Kontrollbedingung gezeigt.

B) Bestimmung der Expression von IP10 mittels qRT-PCR. Die Expression wurde relativ zum Haushaltsgen HGPRT bestimmt. Die IP10 mRNA in den siRNA 1 und siRNA 2 Bedingungen ist relativ zur mRNA in der CO4 Kontrollbedingung so normalisiert, dass der jeweilige CO4 Kontrollwert den Wert 1 annimmt.

C) Bestimmung der Konzentration von IP10 im Zellüberstand mittels ELISA. Die Konzentration von IP10 in den siRNA 1 und siRNA 2 Bedingungen wird relativ zur CO4 Kontroll-siRNA dargestellt, sodass die Kontrollbedingungen auf 1 normiert sind. Unter den verwendeten Stimuli wird jeweils dargestellt, durch welche RLH die Erkennung vorrangig erfolgt.

Alle gezeigten Daten sind als Mittelwerte von jeweils mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SEM dargestellt (mock: n=3, VSV 24h: n=6, Sendai 24h: n=6 für A),B), n=3 für C), SFV42: n=6, plC: n=6 für A), B), n=4 für C), VSV 6h: n=5, Sendai 6h: n=6). Die Bestimmung der statistischen Signifikanz erfolgte durch zweiseitige, ungepaarte t-Tests jeweils im Vergleich zur CO4 Kontrollbedingungen (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p \leq 0.001$; ns $p \geq 0,05$).

3.2 LGP2 interagiert mit RIG-I Stimulus-abhängig

In einem nachfolgenden Versuch sollte geklärt werden, ob LGP2 für seine positive Regulierung eine direkte oder indirekte Interaktion mit RIG-I eingeht, oder ob die regulierende Eigenschaft unabhängig davon ist. Um eine mögliche Interaktion zwischen LGP2 und RIG-I zu untersuchen, wurden Co-Immünpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dafür wurde LGP2 im gleichen Zellsystem, in dem die positive Regulation von RIG-I mittels siRNA beobachtet wurde, als FLAG-Fusionskonstrukt überexprimiert. Zur Stimulation wurden die Zellen mit der VSV M51R Mutante für 24 Stunden infiziert. Anschließend erfolgte die Präzipitation von LGP2 in Bedingungen mit und ohne Stimulation mittels Anti-FLAG-*beads*. Das Präzipitat wurde nach Durchführung eines *Western blots* mittels Antikörper auf die Expression von RIG-I untersucht (siehe Abb. 3.2). Als Kontrolle auf unspezifische Bindungen wurde ein mCherry-Protein in einem Leervektor ohne FLAG-*tag* überexprimiert und mit Anti-FLAG-*beads* inkubiert. Um die Expression und Präzipitation des LGP2-FLAG Konstrukts zu prüfen, wurde LGP2-FLAG mit einem FLAG-spezifischen Antikörper detektiert.

In der mit VSV M51R Mutante stimulierten Fraktion zeigt sich im Präzipitat eine Anreicherung von RIG-I. Ohne vorherige Stimulation kann RIG-I im Präzipitat nicht nachgewiesen werden. In der stimulierten Kontrollbedingung lässt sich nach Überexpression des Kontrollplasmids keine unspezifische Bindung von RIG-I an die Anti-FLAG-*beads* nachweisen. LGP2 und RIG-I liegen also während der Infektion mit VSV M51R in einem Komplex vor. Dieser besteht

nur stimulationsabhängig. In Anbetracht der in 3.1 gezeigten, verringerten IP10 Produktion nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von LGP2 ist denkbar, dass dieser LGP2 und RIG-I enthaltende Komplex für eine effiziente Erkennung der Infektion durch VSV und die Signalweiterleitung notwendig sein könnte.

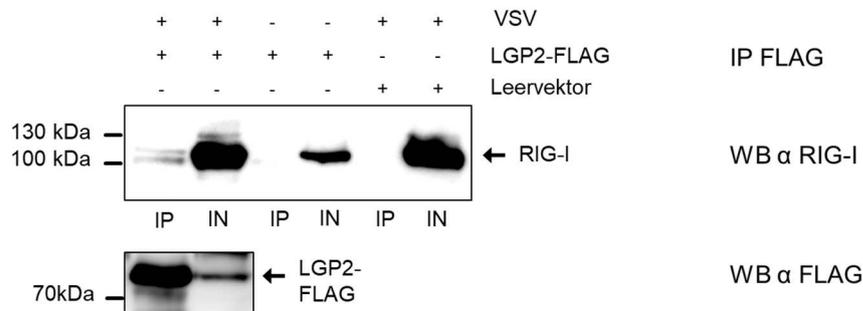


Abbildung 3.2 LGP2 liegt stimulusabhängig im Komplex mit RIG-I vor

In 1205LU Zellen (4×10^5 / 2ml, 6-well Format) wurde entweder ein LGP2-FLAG Konstrukt oder ein Leervektor, der für ein mCherry-Protein kodiert transfiziert. Am folgenden Tag wurden die Zellen lysiert. Die Immunpräzipitation (IP FLAG) von LGP2 erfolgte mit Hilfe eines an Agarose *beads* gebundenen Anti-FLAG Antikörpers (Anti-FLAG Affinity Gel). Danach wurde von der Immunpräzipitation (IP) und vom Lysat vor der Immunpräzipitation (IN = *input*) ein *Western blot* durchgeführt. Der Nachweis von RIG-I erfolgte mit einem Antikörper (oberer Abschnitt, WB α RIG-I). Zur Kontrolle der Expression des LGP2-FLAG Konstrukts wurde zusätzlich ein Anti-FLAG-Antikörper verwendet (unterer Abschnitt, WB α FLAG). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.3 Aktivierung der DExD/H Box ATPase Domäne von LGP2 und MDA5

Wie RIG-I und MDA5 gehört auch LGP2 zur Familie der DExD/H Box RNA-Helikasen. Die Fähigkeit, ligandenabhängig ATP zu hydrolysieren ist ein integraler Bestandteil der RLHs. Während für RIG-I die ATP-Hydrolyse essenziell zur Signaltransduktion ist, hat sie für MDA5 eher eine regulatorische Funktion [65]. Die RNA wird dabei sowohl von der Helikase Domäne, als auch von der RD gebunden [65]. Für die regulatorische Domäne RIG-I-RD wurde gezeigt, dass diese doppelsträngige RNA (dsRNA) und einzelsträngige RNA (ssRNA) mit 5'-Triphosphat Modifikation binden kann [61]. Die ATPase Domäne von RIG-I kann aber nur durch doppelsträngige RNA aktiviert werden, unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation. Zur Stimulation des RIG-I-abhängigen Signalwegs *in vivo* ist dahingegen zwingend ein doppelsträngiger Ligand mit einem 5'-Triphosphat notwendig [48].

Auch für die regulatorische Domäne LGP2-RD konnte gezeigt werden, dass diese RNA bindet. Ähnlich wie die RIG-I-RD bindet die LGP2-RD *in vitro* doppelsträngige RNA und einzelsträngige RNA mit 5'-Triphosphat Modifikation mit ähnlich hoher Affinität [61]. Ob diese auch die physiologischen Liganden von LGP2 *in vivo* darstellen, ist ungeklärt. Aus Experimenten mit überexprimiertem LGP2 im Zellsystem ist zwar bekannt, dass auch Vollängen-LGP2 das doppelsträngige RNA-Analogon pI:C bindet, zur Funktion und physiologischen Relevanz dieser Bindung *in vivo* ist jedoch nichts bekannt [74]. Da LGP2 in

Ermangelung von CARD Domänen die Signalkaskade nicht direkt aktivieren kann, wird für die nachfolgenden Experimente eine andere Eigenschaft als Indikator für Ligandeninteraktion genutzt. Daher wurde für die Experimente in dieser Arbeit rekombinantes Volllängen-LGP2 aufgereinigt und die Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 in Anwesenheit verschiedener RNA Liganden *in vitro* untersucht.

3.3.1 Rekombinantes LGP2 hydrolysiert ATP *in vitro*

Um zu eruieren, ob LGP2 *in vitro* ligandenabhängig ATP hydrolysiert, wurde die ATPase-Aktivität von LGP2 wie in 2.3.7 beschrieben mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits in vitro* gemessen. Dafür wurde 1,3 ng/ μ l rekombinantes Protein mit verschiedenen RNA und DNA Oligonukleotiden (siehe Tabelle 2.1) in einer Endkonzentration von 1 ng/ μ l in Anwesenheit von ATP inkubiert. Die Mutante LGP2 K30A, die auf Grund einer Punktmutation im Walker-A-motif der Helikase Domäne kein ATP hydrolysieren kann, diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle für ATP-Hydrolyse wurde rekombinantes RIG-I verwendet, das wie von Schmidt et al. gezeigt in Anwesenheit von doppelsträngiger RNA ATP hydrolysiert [48].

Als RNA Liganden wurde *in vitro* transkribierte (IVT 2.2 ds) und synthetische doppelsträngige RNA verwendet. Die *in vitro* transkribierte IVT 2.2s RNA wurde mit Hilfe des *MegaShortscript T7 Kits* nach den Vorgaben des Herstellers hergestellt. Herstellungsbedingt ist *in vitro* transkribierte RNA am 5'-Ende mit einer Triphosphat-Gruppe ausgestattet. Ferner entstehen bei der Herstellung der an sich einzelsträngigen IVT 2.2s RNA durch die Fehleranfälligkeit der verwendeten T7 Polymerase ungewollt doppelsträngige RNA als Nebenprodukt [48]. Als definierte RNA Liganden wurde neben der synthetisch hergestellten einzel- und doppelsträngigen RNA 2.2s-OH und 2.2ds-OH auch poly I:C (pI:C) verwendet, ein inhomogenes, synthetisches RNA Analogon mit einer Länge im Bereich von 1,5 bis acht Kilobasenpaaren. Ein Säugerzell-Expressionsplasmid, das 6084 Basenpaare umfasst, diente als doppelsträngiger DNA Ligand (dsDNA). Als einzelsträngiger DNA Ligand (ssDNA) kam ein synthetisches, 45 Basen umfassendes Oligonukleotid zum Einsatz (siehe Tabelle 2.1 für die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide). Ein Ansatz ohne Ligand diente als Negativkontrolle (mock) (siehe Abb. 3.3.1).

Alle doppelsträngigen RNA Liganden können dabei die ATPase-Aktivität von LGP2 auslösen. Dies geschieht unabhängig davon, ob chemisch synthetisierte oder *in vitro* transkribierte RNA verwendet wird. Auch die Länge der Liganden, die zwischen 19 und mehreren Tausend Basenpaaren streut, hat keinen Einfluss. RNA mit einer 5'-OH Modifikation aktiviert die ATP-Hydrolyse ebenso gut wie Liganden mit 5'-Triphosphat Modifikation. Im Gegensatz dazu kann weder doppelsträngige, noch einzelsträngige DNA ATP-Hydrolyse induzieren. Auch einzelsträngige RNA ist dazu nicht in der Lage (siehe Abb. 3.3.1). LGP2 K30A hingegen zeigt

keine durch doppelsträngige 2.2 RNA auslösbare ATPase-Aktivität. Die ATPase-Aktivität von RIG-I übersteigt die von LGP2 in Anwesenheit von IVT 2.2ds RNA deutlich, wohingegen die ATP-Hydrolyse ohne Ligand geringer ausfällt.

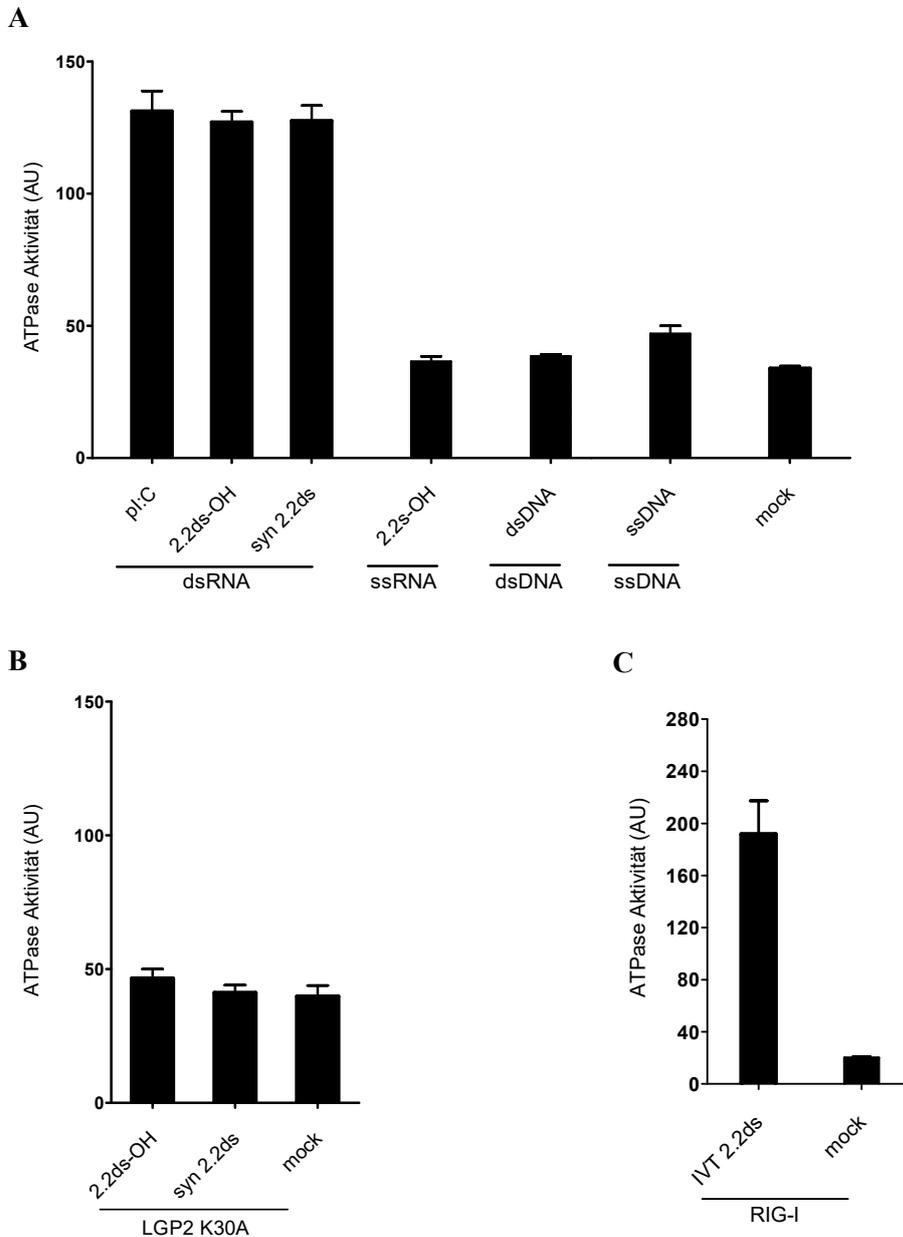


Abb. 3.3.1 LGP2 hydrolysiert in Anwesenheit von doppelsträngiger RNA ATP *in vitro*

Rekombinant hergestelltes LGP2, LGP2 K30A und RIG-I wurde mit RNA- oder DNA-Oligonukleotiden wie angegeben inkubiert. Als Negativkontrolle (mock) diente jeweils rekombinantes Protein mit ATP ohne Zugabe eines Liganden. Nach Zugabe von ATP und 90-minütiger Inkubation wurde die Menge an produziertem ADP mit dem *ADP Quest Assay*, wie in 2.3.7 beschrieben gemessen. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU) dargestellt.

A) LGP2 wurde mit einem einzel- oder doppelsträngigen RNA- (ssRNA, dsRNA) oder DNA- (ssDNA, dsDNA) Oligonukleotid wie angegebenen inkubiert. Als Doppelstrang-DNA (dsDNA) wurde ein Expressionsplasmid mit 6084 Basenpaaren verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4, für ssDNA n=2.

B) LGP2 K30A wurde mit doppelsträngiger 2.2ds-OH RNA inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=6, für 2.2ds-OH n=2.

C) RIG-I wurde mit doppelsträngiger IVT 2.2ds RNA inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4.

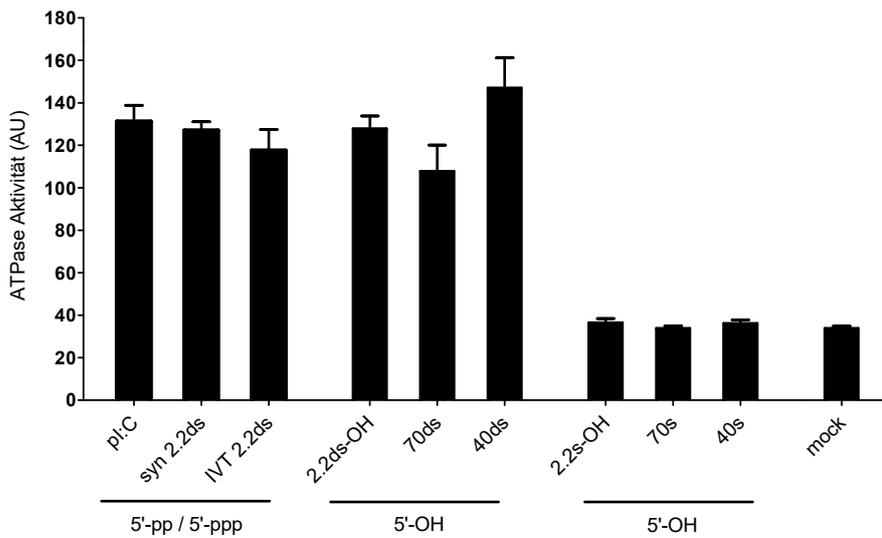
3.3.2 Die Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 erfolgt unabhängig von einer 5'-Modifikation des Liganden *in vitro*

In einem Folgeversuch wurde die Rolle des 5'-Terminus des RNA Liganden zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 untersucht. Aus *in vitro* Bindungsstudien von Pippig et al. und anderen Autoren mit rekombinanter LGP2-RD ist übereinstimmend bekannt, dass die RD-Domäne doppelsträngige RNA bindet. Andere Autoren berichten außerdem von einer starken Bindung an einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA [61,73].

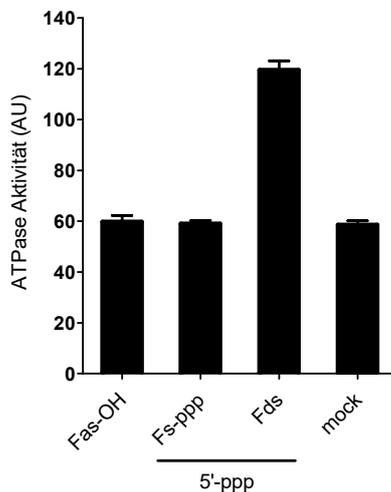
Rekombinantes LGP2 wurde mit einzel- und doppelsträngigen RNA Liganden inkubiert, die verschiedene Modifikationen am 5'-Ende aufwiesen. Neben pI:C als Liganden mit einer 5'-Diphosphat Modifikation wurde auch synthetisch hergestellte, doppelsträngige und einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA (syn 2.2ds, Fds), sowie *in vitro* transkribierte, doppelsträngige RNA (IVT 2.2ds) verwendet (siehe Tabelle 2.1.7 für die Sequenzen und genaue Länge der genannten Oligonukleotide). Sowohl synthetische 2.2 RNA, als auch synthetisch hergestellte einzel- und doppelsträngige RNA einer Länge von 40 und 70 Nukleotiden (40ds und 70ds) dienten als Liganden mit einem 5'-OH Ende. Außerdem wurde in einem weiteren Versuch pI:C mit CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*), welche die komplette 5'-Diphosphatmodifikation entfernt, oder 5'-Polyphosphatase, die lediglich 5' β -Phosphatreste abtrennt, verdaut. Anschließend erfolgte die Bestimmung der ATPase-Aktivität.

Synthetische und *in vitro* transkribierte kurze RNA ist mit einer 5'-OH Modifikation ebenso in der Lage, die ATPase Domäne von LGP2 aktivieren, wie mit einer 5'-Triphosphat Modifikation. Auch die definierten, 40 und 70 Basenpaare langen Liganden aktivieren als doppelsträngige RNA LGP2 sequenzunabhängig. Poly I:C kann mit einem 5'-Diphosphat, 5'-Monophosphat oder 5'-OH Terminus unverändert die Hydrolyse von ATP induzieren. Dahingegen ist einzelsträngige RNA weder mit 19, 40 oder 70 Nukleotiden dazu in der Lage. Aus Bindungsstudien mit der regulatorischen Domäne LGP2-RD ist bekannt, dass diese auch einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA bindet. Im Gegensatz dazu reicht einzelsträngige 5'-Triphosphat-RNA zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 nicht aus. Bei Inkubation mit den entsprechenden doppelsträngigen Basenpaarungsprodukten kann jedoch sequenzunabhängig die Bildung von ADP detektiert werden (siehe Abb. 3.3.2). Dieser Versuch zeigt, dass doppelsträngige RNA unabhängig von einer Phosphorylierung am 5'-Ende die ATPase Domäne von LGP2 aktivieren kann. Damit sind die Aktivierungseigenschaften der ATPase Domäne von LGP2 ähnlich den Bindungseigenschaften der LGP2-RD wie von Pippig et al. demonstriert [73].

A



B



C

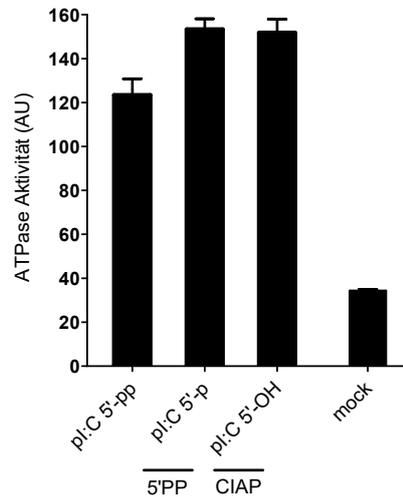


Abbildung 3.3.2 Die ATPase Domäne von LGP2 wird durch RNA unabhängig von einer Modifikation des 5'-Endes aktiviert

Rekombinantes LGP2 wurde mit ATP und RNA Oligonukleotiden wie angegeben inkubiert. Als Negativkontrolle (mock) diente rekombinantes Protein mit ATP ohne Ligand. Die Menge an produziertem ADP wurde mit dem *ADP Quest Assay*, wie in 2.3.7 beschrieben gemessen. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU) dargestellt.

A) Rekombinantes LGP2 wurde mit einzel- oder doppelsträngiger RNA inkubiert, die entweder mit einer 5'-Triphosphat oder einer 5'-OH Modifikation wie dargestellt ausgestattet war. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=5.

B) Einzelsträngige, synthetische Triphosphat-RNA (Fs-ppp) sowie das komplementäre 5'-OH Gegenstück (Fas-OH) wurden entweder einzeln, oder als Paarungsprodukt (Fds) mit LGP2 inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4.

C) Poly I:C wurde wie dargestellt für je 60 Minuten durch 5'-Polyphosphatase (5'PP) zu einem 5'-Monophosphat oder durch *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) verdaut, wodurch alle Phosphatreste zu einem 5'-OH Terminus abgetrennt wurden. Anschließend wurde die ATP-Hydrolyse durch LGP2 in Anwesenheit dieser Liganden im Vergleich zu unverdautem pl:C (pl:C 5'-pp) gemessen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4.

3.3.3 10 Basenpaarungen sind ausreichend zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2

Die Beobachtung, dass zur ATP-Hydrolyse durch LGP2 doppelsträngige RNA notwendig ist, wirft die Frage auf, wie viele Basenpaarungen zur Aktivierung der ATPase Domäne mindestens notwendig sind.

In 3.3.1 konnte gezeigt werden, dass die 19 Nukleotide lange, doppelsträngige 2.2s 5'-OH RNA zur Aktivierung von LGP2 ausreicht. In parallelen Ansätzen wurden nun Oligonukleotide verschiedener Länge an die komplementäre, einzelsträngige 2.2s 5'-OH RNA angefügt. Das dabei entstehende RNA Produkt hat damit bei genau definierter Länge eine bekannte Anzahl an Basenpaarungen relativ zum 5'- und 3'-Ende. So wurden vier RNA Produkte mit einem fünf, zehn, 15 oder 18 Nukleotiden umfassenden doppelsträngigen Abschnitt durch Basenpaarung zusammengefügt, der am 3'-Ende des 2.2s 5'-OH Gegenstrangs beginnt (siehe Tab. 2.1 für Sequenzen). Nach dem gleichen Prinzip wurde RNA mit fünf und zehn Basenpaarungen am 5'-Ende der 2.2s 5'-OH RNA zusammengefügt. Anschließend wurde diese nun abschnittsweise doppelsträngige RNA *in vitro* auf die Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 untersucht (siehe Abb. 3.3.3).

Wie erwartet aktiviert weder die einzelsträngige 2.2s RNA noch die komplementären einzelsträngigen Oligonukleotide alleine die ATPase Domäne von LGP2. Auch das Produkt aus der einzelsträngigen 2.2s RNA und den 5 Nukleotide umfassenden komplementären Stücken 3'-5nt oder 5'-5nt ist dazu nicht in der Lage. Eine eindeutige ATP-Hydrolyse kann erst durch das 10 Basenpaarungen umfassende Produkt aus 2.2s RNA und 5'-10nt Oligonukleotid beobachtet werden. Der dementsprechende doppelsträngige Ligand mit 3'-10nt als komplementären Strang aktiviert die ATP Hydrolyse, jedoch wie in Abb. 3.3.3 ersichtlich deutlich schwächer. Die mit diesem Ligand gemessene ATP-Hydrolyse ist zwar höher als das mit der Negativkontrolle 2.2s gemessene Signal, liegt jedoch deutlich unter dem entsprechenden Signal mit dem 5'-10nt Komplementärstrang. Die weiteren, längeren Paarungsprodukte aus den 3'-15nt und 3'-18nt Oligonukleotiden sind eindeutig in der Lage, die ATPase Domäne von LGP2 zu aktivieren.

Dieser Versuch zeigt, dass ein doppelsträngiges, fünf Basenpaarungen umfassendes Oligonukleotid unabhängig von der Lage der Basenpaarungen zum 5'- oder 3'-Ende keinen ausreichenden Ligand für die ATPase Domäne von LGP2 darstellt. Erst ein Ligand mit 10 Basenpaarungen am 5'-Ende des komplementären Strangs zeigt sich eindeutig als Ligand für LGP2. Auch wenn die Aktivierung durch das analoge Nukleotid mit Doppelsträngigkeit am 3'-Ende weniger stark ist, können 10 Basenpaarungen auch in diesem Fall im Vergleich zur Negativkontrolle ATP-Hydrolyse induzieren. Dieser Versuch zeigt, dass zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 10 Basenpaarungen ausreichend sind. Möglicherweise genügt auch

ein kürzerer doppelsträngiger Abschnitt, der Bereich zwischen sechs und 10 Basenpaarungen wird durch diesen Versuch jedoch nicht erfasst. Auch kann beobachtet werden, dass ein einzelsträngiger Überhang bei einem ausreichend langen, doppelsträngigen Abschnitt des Liganden kein Hindernis für die Aktivierung der ATPase-Aktivität von LGP2 darstellt.

Schmidt et al. konnten darüber hinaus zeigen, dass die hier verwendeten Basenpaarungsprodukte jeweils aus 5'-10nt und 3'-10nt mit dem 2.2s Gegenstrang die ATPase Domäne von RIG-I aktivieren können. Für die Experimente von Schmidt et al. wurden dieselben Oligonukleotid-Präparationen benutzt, die auch für vorliegende Arbeit verwendet wurden. Bei Betrachtung der Daten von Schmidt et al. fällt auf, dass auch die ATP-Hydrolyse von RIG-I durch das 3'-10nt Produkt deutlich niedriger ausfällt, als durch das 5'-10nt Produkt [48]. Die Autoren kommentieren dies nicht weiter. Womöglich liegt daher die Ursache der für RIG-I und LGP2 verminderten ATPase Aktivierung am 3'-10nt Oligonukleotid an sich. Denkbar wäre jedoch auch, dass sowohl die ATPase Domäne von RIG-I, als auch von LGP2 schlechter durch RNA Liganden mit einem einzelsträngigen Überhang am 5'-Ende aktiviert werden kann.

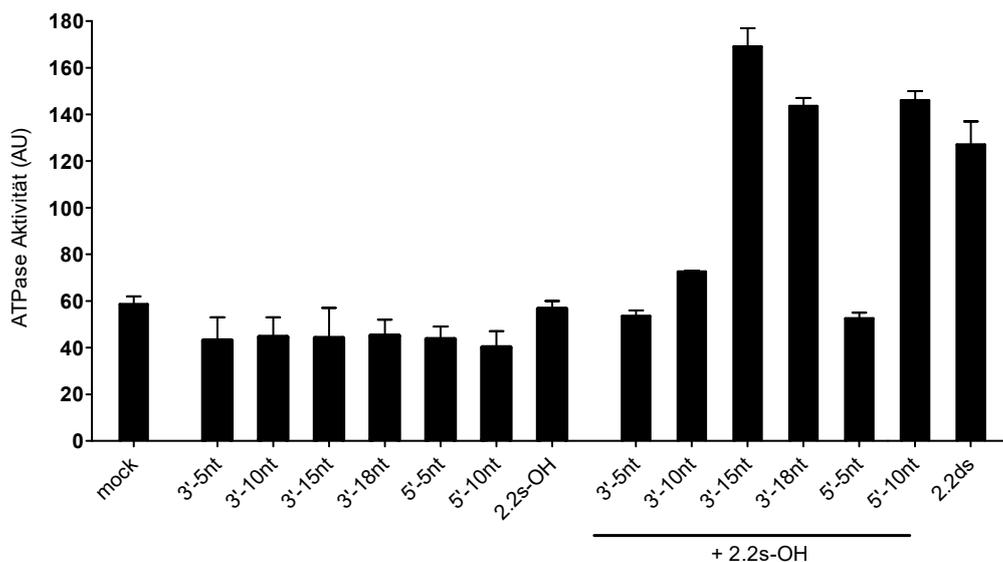


Abbildung 3.3.3 10 Basenpaarungen sind ausreichend zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2

2.2s-OH RNA wurde mit komplementären Oligonukleotiden verschiedener Länge, die entweder vom 5'- (5'-5nt, 5'-15nt) oder 3'-Ende (3'-5nt, 3'-10nt, 3'-15nt, 3'-18nt) her komplementär sind, hybridisiert. Dabei entstehen doppelsträngige Abschnitte definierter Länge relativ zum 5'- und 3'-Ende der 2.2s-OH RNA. Diese Paarungsprodukte wurden mit LGP2 und ATP inkubiert und die Menge an produziertem ADP mittels des *ADP Quest Assays* gemessen. Zusätzlich wurden die komplementären Oligonukleotide sowie 2.2s-OH RNA jeweils alleine ohne komplementären Gegenstrang als Ligand verwendet. 2.2ds-OH RNA diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle (mock) wurde das Signal von LGP2 ohne Anwesenheit von RNA gemessen. Als Einheit wurden willkürliche *arbitrary units* (AU) gewählt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=2$.

3.3.4 Doppelstrang-RNA ab etwa 100 Basenpaaren aktiviert die ATPase Domäne von MDA5

Während von anderen Autoren die ATPase Domäne von RIG-I bereits charakterisiert worden ist, liegen zum Zeitpunkt der Experimente für diese Arbeit noch keine umfassenden Daten zur ATPase-Aktivität von MDA5 vor [48,121]. Bekannt ist jedoch, dass MDA5 im Zellsystem lange RNA jenseits der 300 Basenpaare erkennt und dass die ATPase-Aktivität von MDA5 essenziell für die Regulation der Filamentbildung ist. Somit stellt diese eine wichtige Stellschraube bei der MDA5-vermittelten antiviralen Signalkaskade dar [65]. Im Anbetracht des engen Synergismus mit LGP2, der aus den Experimenten mit den LGP2 *knockout* Mäusen vermutet werden kann, sollte auch die Aktivierung der ATPase Domäne von MDA5 genauer charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurde rekombinantes murines MDA5 mit RNA Liganden inkubiert und mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* auf die Hydrolyse von ATP untersucht.

Wie aus Vorversuchen bekannt ist, genügt zur Aktivierung der ATPase-Aktivität von LGP2 und RIG-I kurze, doppelsträngige RNA von zehn Basenpaarungen unabhängig von einer Phosphorylierung des 5'-Endes [48]. Zur Bestimmung der minimalen Ligandenlänge, die zur Aktivierung von MDA5 notwendig ist, wurde rekombinantes MDA5 mit verschiedenen, synthetisch hergestellten Einzelstrang- und Doppelstrang-RNAs inkubiert (siehe Abb. 3.3.4.1). Die 19 Nukleotide umfassende RNA 2.2s induziert weder als Einzelstrang, noch als doppelsträngiger Ligand mit einer 5'-OH Modifikation die Hydrolyse von ATP. Auch nach Inkubation mit einzel- oder doppelsträngiger, 70 Basen umfassender 70s oder 70ds RNA kann keine Produktion von ADP gemessen werden. Erst nach der Zugabe von pI:C, das laut Hersteller zwischen 1500 und 8000 Basenpaare umfasst (pI:C HMW), lässt sich die Hydrolyse von ATP beobachten. Auch durch Inkubation mit niedermolekularem pI:C (pI:C LMW), laut Hersteller zwischen 200 bis 1000 Basenpaare, kann die ATPase Domäne von MDA5 aktiviert werden.

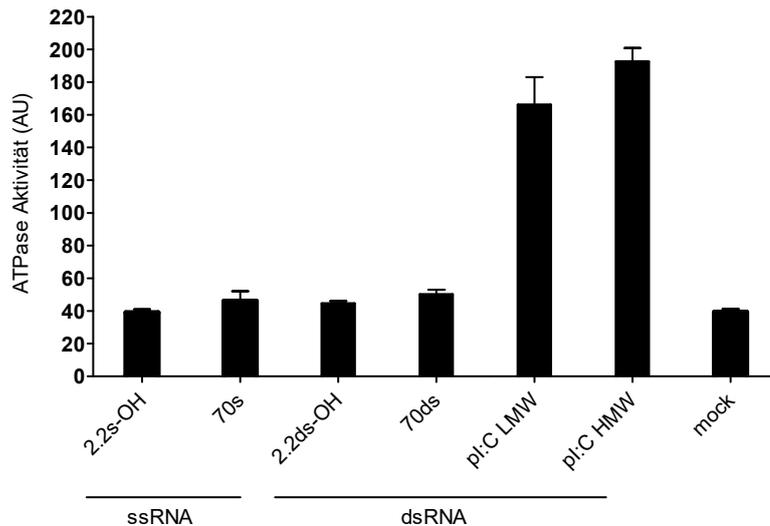


Abbildung 3.3.4.1 Zur Aktivierung der ATPase-Aktivität von MDA5 ist lange dsRNA notwendig

Rekombinantes MDA5 wurde mit ATP und einzelsträngiger (ssRNA) oder doppelsträngiger (dsRNA) RNA oder RNA-Analoga wie angegebenen inkubiert. Hochmolekulares pI:C (pI:C HMW) umfasst eine Länge von 1500 bis 8000 Basenpaaren, niedermolekulares pI:C (pI:C LMW) 200 bis 1000 Basenpaare. Synthetische RNA Liganden wurden wie angegeben verwendet. Die Hydrolyse von ATP wurde durch Messung von ADP mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* bestimmt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Ligand (mock). Das Signal ist in Form von willkürlichen *arbitrary units* (AU) angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4, für 70s, 70ds, 2.2s-OH und 2.2ds-OH n=2.

Um die Anzahl der Basenpaarungen, die zur Induktion von ATP Hydrolyse durch MDA notwendig sind, genauer bestimmen zu können, wurde pI:C mit der Endoribonuklease RNase III in kleinere Oligonukleotide verdaut. Laut Herstellerangabe resultiert ein kompletter Verdau durch RNase III in doppelsträngigen RNA Fragmenten mit einer Länge von 12 bis 15 Basenpaaren. Der Verdau erfolgte für je 1, 5, 10, 30 und 60 Minuten. Anschließend wurde das verdaute pI:C in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Wie in Abb. 3.3.4.2 gezeigt, wurden Banden definierter Größe aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene RNA mit Hilfe des JETQUICK Plasmid Spin Kits isoliert. Bereits ab einer Verdauzeit von 1 Minute ist der Großteil des eingesetzten pI:C auf eine Größe zwischen etwa 100 und 150 Basenpaaren verdaut. Ab 5 Minuten Verdauzeit ist eine Größe von weniger als etwa 20 Basenpaaren erreicht (Abb. 3.3.4.2).

Die verdaute und isolierte RNA wurde anschließend als Ligand für rekombinantes MDA5 und LGP2 verwendet und die Produktion von ADP im ATPase Assay gemessen. Dabei zeigt die RNA aus dem einminütigen Verdau (etwa 100 bis 150 Basenpaare) für MDA5 eine ATPase-Aktivität, die vergleichbar zu unverdaulichem pI:C ist. Die etwa maximal 20 Basenpaare lange RNA der längeren Verdauzeiten induziert keine ATPase-Aktivität. Im Vergleich dazu können alle verdaulichen RNA Spezies verschiedener Länge die ATP-Hydrolyse durch LGP2 auslösen. Auch kann *in vitro* transkribierte, mit RNase III verdaute IVT 2.2ds RNA die ATPase Domäne von LGP2 unverändert aktivieren.

In diesen Experimenten wird gezeigt, dass zur Aktivierung der ATPase von MDA5 *in vitro* RNA Liganden von etwa 100 bis 150 Basenpaaren ausreichend sind, wobei eine definierte doppelsträngige RNA von genau 70 Basenpaaren noch keine Aktivität auslösen kann. Die zur Aktivierung der ATPase Domäne von MDA5 mindestens notwendige Doppelsträngigkeit liegt also im Bereich von etwa 70 bis 150 Basenpaaren. Dieser Ligand ist damit deutlich kürzer, als die von Kato et al. bestimmte RNA Länge zur Aktivierung der MDA5-abhängigen Signalkaskade im Zellsystem, welche mindestens 300 Basenpaare beträgt [57]. Damit reichen Liganden, welche die ATPase Domäne *in vitro* aktivieren können, nicht unbedingt zur Aktivierung der Signalkaskade *in vivo* aus. Einzelsträngige RNA bindet wie von Takahasi et al. berichtet nicht an die MDA5-RD und genügt somit auch nicht den höheren Anforderungen als Aktivator der ATPase Domäne oder Ligand *in vivo* [122]. Wie in 3.3.3 gezeigt, stellt für LGP2 jedoch auch das 12 bis 15 Basenpaare lange Verdauprodukt einen unverändert guten Liganden für die ATPase Domäne dar.

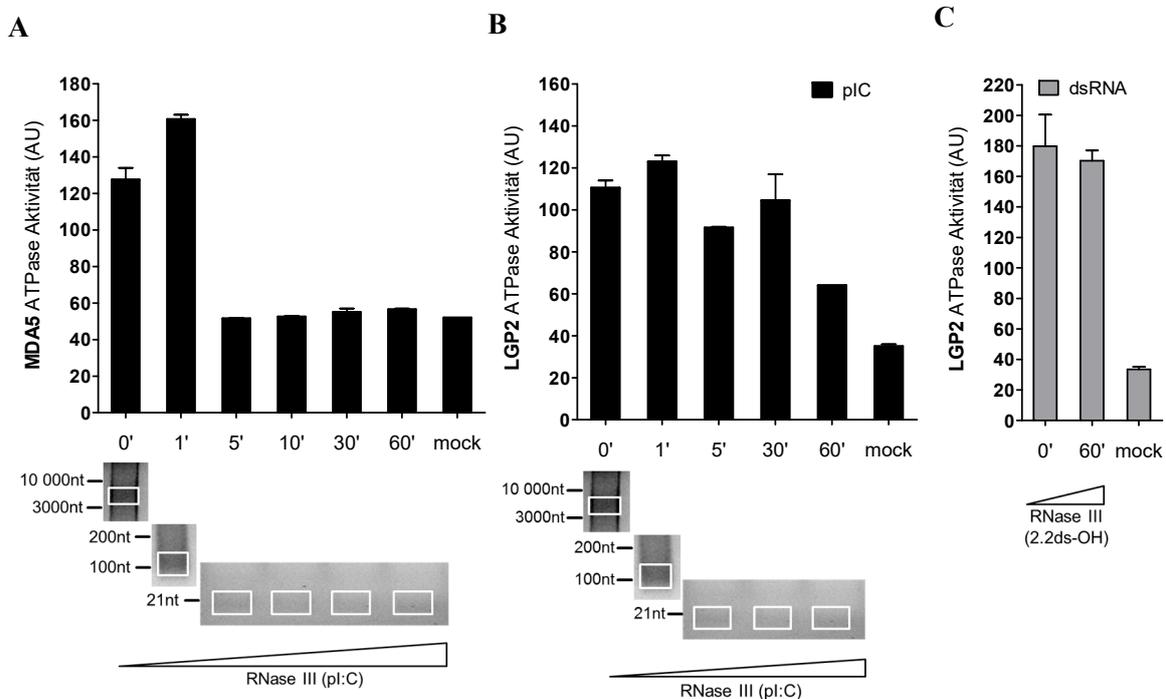


Abbildung 3.3.4.2 Zur Aktivierung der ATPase Domäne von MDA5 sind etwa 100 bis 150 Basenpaare ausreichend, während Doppelstrang-RNA, die durch RNase III komplett verdaut wurde, die ATPase Domäne von LGP2 aktiviert.

Verdau von pI:C durch RNase III, jeweils unterer Abschnitt von A) und B). Zunächst wurde wie gezeigt poly I:C für 1, 5, 10, 30 und 60 Minuten (0' 1', 5', 10', 30', 60') mit RNase III verdaut. Die verdauten RNA wurde auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenvergleich wurde ein Marker mit Nukleotiden bekannter Länge wie dargestellt verwendet. Die aufgetrennten Nukleotide wurden, wie auf dem Gel markiert, ausgeschnitten und isoliert. Als Vergleichsbedingung wurde unverdautes pI:C (0') aufgetrennt und wie markiert isoliert. Die so erhaltenen Oligonukleotide wurden mit rekombinantem Protein und ATP inkubiert und anschließend die ATPase-Aktivität mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* gemessen. Unverdautes pI:C (0', A und B) oder 2.2ds-OH (0', C) diente als Positivkontrolle, ein Ansatz ohne RNA (mock) als Negativkontrolle. Die Ergebnisse sind in Form von *arbitrary units* (AU) aufgetragen.

A) Rekombinantes MDA5 wurde mit dem wie dargestellt verdauten pI:C inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2.

B) Rekombinantes LGP2 wurde mit dem wie dargestellt verdauten pI:C inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2.

C) Rekombinantes LGP2 wurde mit der wie dargestellt verdauten 2.2ds-OH RNA inkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4.

3.3.5 Die ATP-Hydrolyse von MDA5 ist unabhängig von einer 5'-Phosphorylierung des RNA Liganden

Während RIG-I eine Triphosphatmodifikation am 5'-Ende von doppelsträngiger RNA als Erkennungsmerkmal für fremde RNA benutzt, ist das Muster, das MDA5 zur Unterscheidung zwischen zelleigener und zellfremder RNA nutzt, weniger klar definiert. So scheint *in vivo* für MDA5 die Länge von doppelsträngiger RNA das entscheidende Muster zur Erkennung fremder Strukturen darzustellen, wohingegen Phosphatmodifikationen am 5'-Terminus keine Rolle spielen, wie Hornung und Pichlmair et al. berichten [46,47]. Bei der Aktivierung der ATPase Domäne und der Aktivierung der MDA5-abhängigen Signalkaskade gibt es wie in 3.3.4 gezeigt Diskrepanzen in Bezug auf die Länge des notwendigen Liganden. Daher sollte untersucht werden, ob sich ähnliche Unterschiede auch für eine 5'-Triphosphat-Modifikation zeigen lassen.

Eine mögliche Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von MDA5 von einer 5'-Phosphatmodifikation wurde durch den Verdau von pI:C mit Phosphatasen untersucht. Poly I:C liegt nativ als 5'-Diphosphat vor. Zur Entfernung des 5'- β -Phosphats wurde die Phosphatase 5'-Polyphosphatase verwendet, wodurch 5'-Monophosphat-pI:C produziert wird. Um die komplette 5'-Diphosphatmodifikation zu entfernen, wurde pI:C mit CIAP (*calf intestinal alkaline phosphatase*) verdaut, wodurch ein 5'-OH-Rest übrig bleibt [46]. Die so verdaute RNA, sowie synthetische doppelsträngige syn 2.2ds RNA mit einem 5'-Triphosphatrest wurden mit rekombinantem MDA5 inkubiert und im ATPase Assay die Produktion von ADP gemessen. Das mit den Phosphatasen behandelte pI:C induziert unvermindert die ATPase-Aktivität von MDA5. Synthetische, doppelsträngige 2.2ds RNA mit 5'-Triphosphat-Modifikation kann keine ATP-Hydrolyse hervorrufen (siehe Abb. 3.3.5).

Wie in Abb. 3.3.5 ersichtlich, ist zur Aktivierung der ATPase Domäne von MDA5 lediglich die Länge der doppelsträngigen RNA Liganden entscheidend. Eine 5'-Diphosphat, 5'-Monophosphat oder 5'-OH Modifikation an pI:C macht im Hinblick auf die Aktivierung der ATPase Domäne keinen Unterschied. Somit bestätigen sich die Ergebnisse von Hornung und Pichlmair et al., wonach MDA5 RNA unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation erkennt, auch in Bezug auf die ATPase Domäne [46,47].

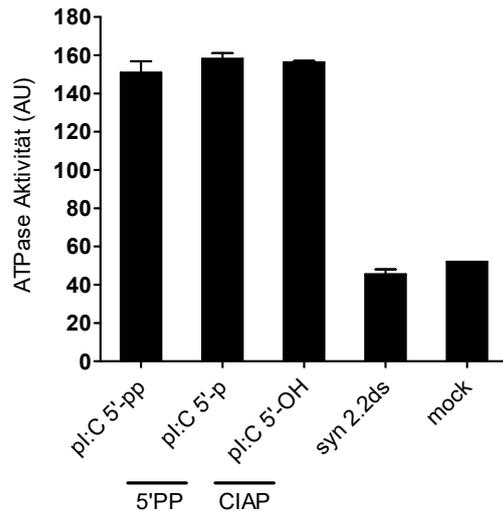


Abbildung 3.3.5 Die Aktivierung der ATP-Hydrolyse von MDA5 ist unabhängig von einer 5'-Modifikation des RNA Liganden

pl:C wurde mit *calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) oder 5'Polyphosphatase (5'PP) für 60 Minuten verdaut, wodurch am 5'-Ende eine Monophosphat (5'-p) oder 5'-OH Modifikation übrigbleibt. Das verdaute pl:C wurde neben unverdaulichem pl:C (5'-pp) mit rekombinantem MDA5 inkubiert. Außerdem wurde synthetische syn 2.2ds RNA mit einer 5'-Triphosphat-Modifikation als Ligand verwendet. Die ATPase-Aktivität wurde mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* gemessen. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU), angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von n=4, für syn 2.2ds n=2.

3.4 LGP2 bildet stimulusabhängig hochmolekulare Oligomere *in vitro*

Nach der Beobachtung aus 3.3.1, dass LGP2 ligandenabhängig ATP hydrolysiert und wie in 3.2 gezeigt in einem Komplex mit RIG-I vorkommt, sollte untersucht werden, ob LGP2 nach Stimulation als Monomer vorliegt oder zur Bildung von Oligomeren befähigt ist. Es ist bekannt, dass RIG-I nach Bindung eines Liganden ATPase-abhängig entlang der RNA oligomerisieren kann [37,39,123]. Außerdem zeigten Schmidt et al., dass rekombinantes RIG-I *in vitro* in Anwesenheit von RNA Dimere bildet [48]. Auch für MDA5 ist die Bildung hochmolekularer, kooperativer Filamente mechanistisch und zur Signaltransduktion essenziell [38,65].

Um diese Frage zu beantworten, wurde ein *in vitro* Ansatz mit rekombinantem Protein gewählt. Analog zur Untersuchung der ATPase-Aktivität wurde rekombinantes LGP2 mit pl:C oder doppelsträngiger IVT 2.2ds RNA als Ligand sowie mit ATP inkubiert. Ansätze ohne ATP oder Ligand dienten als Kontrolle. Anschließend wurden die Proben mittels *Native PAGE* in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels *Western blot* auf eine Membran transferiert. Die Detektion von LGP2 erfolgte mit Hilfe eines spezifischen Anti-LGP2 Antikörpers.

Unter nicht-denaturierenden Bedingungen bildet LGP2 ligandenabhängig ein komplexes Bandenmuster. Neben einer Bande, die entsprechend des Molekulargewichts monomeres LGP2 entspricht, werden weitere hochmolekulare Proteinbanden beobachtet. Diese lassen sich

sowohl in Anwesenheit von verhältnismäßig kurzer IVT 2.2ds RNA, als auch nach Zugabe des hochmolekularen pI:C zeigen. Nach Stimulation mit IVT 2.2ds können zwei distinkte Oligomer-Banden beobachtet werden, eine dem Molekulargewicht entsprechende Dimer-Bande und eine Oligomer-Bande. Diese kann hier nicht weiter differenziert werden, da das verwendete Polyacrylamidgel in diesem hochmolekularen Bereich ungenau auflöst und keine exakte Relation zum verwendeten Marker zulässt. Entsprechend der Bandenverteilung im *Western blot* scheint LGP2 in Anwesenheit von pI:C nur eine hochmolekulare Oligomer-Bande zu bilden. Es fällt jedoch auf, dass die Oligomerbildung unabhängig vom Ligand nicht komplett ist und der Großteil des Proteins nach wie vor als Monomer vorliegt. Ohne Ligand bildet LGP2 auch in Anwesenheit von ATP keine hochmolekularen Oligomere. Außerdem wird beobachtet, dass LGP2 ohne RNA Ligand vom verwendeten Antikörper nur sehr schwach detektiert wird. Obwohl in allen Bedingungen gleiche Mengen an Protein zum Einsatz kamen, erkennt der verwendete Antikörper unter nicht-denaturierenden Bedingungen LGP2 erst nach Zugabe von RNA ausreichend gut. Das Signal lässt sich durch die Zugabe von ATP nochmals deutlich steigern.

Die Bandenverteilung deutet somit darauf hin, dass LGP2 nach Stimulation mit RNA Dimere und hochmolekulare Oligomerkomplexe *in vitro* bildet. Auch kann abgeleitet werden, dass LGP2 ligandenabhängig seine Konformation ändert und erst in seiner aktiven Konformation vom verwendeten Antikörper gut erkannt werden kann. Diese Konformationsänderung scheint nach Zugabe von ATP deutlich effizienter abzulaufen. Auch werden nach Zugabe von ATP sowohl die Monomer-, als auch Oligomer-Banden deutlicher. Somit scheint sowohl das als Monomer vorliegende LGP2, als auch die Oligomer-Komplexe ihre Konformation ATP-abhängig zu ändern. Die verwendeten RNA Liganden aktivieren also nicht nur wie in 3.3.1 gezeigt die ATPase Domäne von LGP2, sondern können auch eine Konformationsänderung und Oligomerisierung des Proteins induzieren.

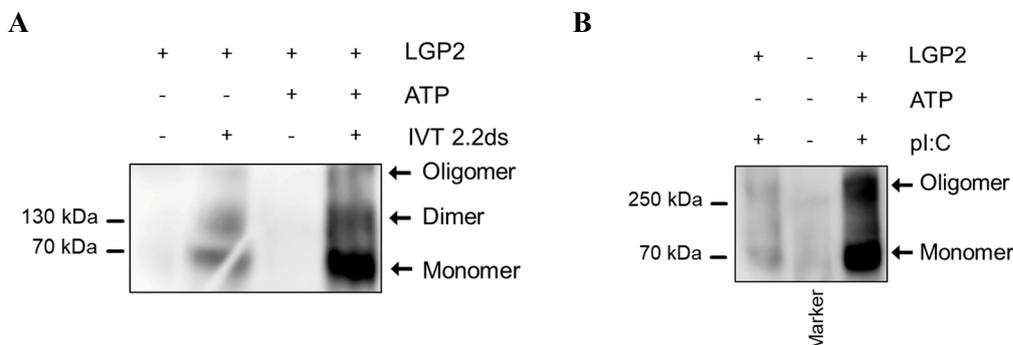


Abbildung 3.4 Rekombinantes LGP2 bildet in Anwesenheit von doppelsträngiger RNA hochmolekulare Oligomere und ändert seine Konformation

Rekombinantes LGP2 wurde wie dargestellt mit ATP, IVT 2.2ds RNA (A) oder pI:C (B) für 90 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben in einem Gel unter nicht-denaturierenden Bedingungen mittels *Native PAGE* aufgetrennt. Nach *Western blotting* auf eine Membran erfolgte die Detektion von LGP2 mit Hilfe eines Anti-LGP2-Antikörpers der Firma Proteintech. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten jeweils für pI:C und IVT 2.2ds RNA.

3.5 Enzymkinetische Charakterisierung von LGP2, MDA5 und RIG-I

Sowohl LGP2, als auch MDA5 und RIG-I haben eine DExD/H-Box Helikase Domäne als integralen Bestandteil ihrer Proteinstruktur und sind damit zur Hydrolyse von ATP befähigt. Aus biochemischer Sicht stellen sie damit biologische Katalysatoren dar, die ATP als Substrat zu ADP umsetzen. Die ATPase-Aktivität der RLHs ist somit den Gesetzen der Enzymkinetik unterworfen und kann durch die Michaelis-Menten Gleichung beschrieben werden.

Zur Bestimmung der Fließgleichgewichtsparameter aus der Michaelis-Menten Gleichung wurde rekombinantes LGP2 und MDA5 mit ATP in aufsteigenden Konzentrationen (5, 10, 50, 100, 500 und 1000 μM) für 90 Minuten inkubiert. Die Messung der Menge an umgesetztem ATP erfolgte danach mit dem *ADP Quest Assay* Kit wie in 2.3.7 beschrieben. Wie in 3.3.1 und 3.3.4 gezeigt wird, ist die ATP-Hydrolyse von LGP2 und MDA5 ein ligandenabhängiger Prozess. Daher wurde jede Versuchsbedingung mit und ohne den Zusatz von pI:C durchgeführt. Mittels einer Eichgeraden, die durch die Messung bekannter ADP Konzentrationen (0, 0,248, 0,783, 2,16, 6,66, 20 und 60 μM) mit Hilfe des *ADP Quest Assay* Kits erstellt wurde, kann den gemessenen *arbitrary units* (AU) genaue ADP Konzentrationen zugeordnet werden. Wie in Abb. 2.3 gezeigt, läuft die ATP-Hydrolyse durch LGP2 nach 90 Minuten Inkubationszeit im linearen Bereich des Fließgleichgewichts ab, wodurch die Voraussetzung für die Analyse entsprechend der Michaelis-Menten Gleichung erfüllt ist.

Die Beziehung zwischen der enzymkatalysierten Umsatzgeschwindigkeit von ADP $d[\text{ADP}]/dt$ und der im Versuch eingesetzten Konzentration des Substrates ATP wird durch die Michaelis-Menten Gleichung beschrieben und stellte sich graphisch als rechtwinklige Hyperbel dar. Diese wurde wie in 2.4 beschrieben für LGP2 und MDA5 durch nicht-lineare Regression aus den einzelnen Messwerten nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit der Software Graph Pad Prism bestimmt (siehe Abb. 3.5.1). Auch konnten auf diese Art mit Graph Pad Prism die enzymkinetischen Fließgleichgewichtsparameter K_m , v_{max} , k_{cat} und k_{cat}/K_m bestimmt werden (siehe Tab. 3.1).

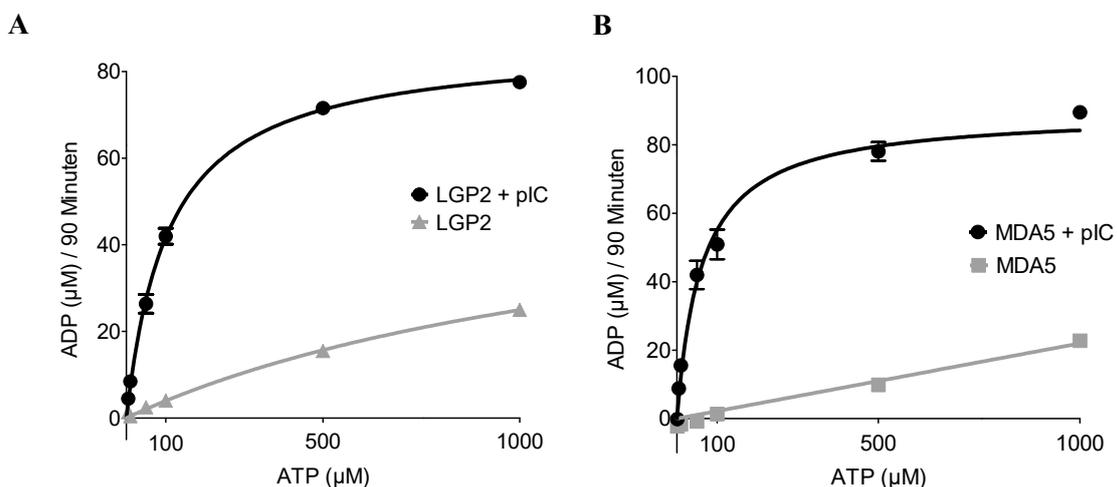


Abbildung 3.5.1 Graphische Darstellung der Michaelis-Menten Kinetik

Rekombinantes LGP2 (A) und MDA5 (B) wurden bei steigenden ATP Konzentrationen von 0, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 und 1000 μM jeweils mit und ohne pI:C als Ligand inkubiert. Nach 90 Minuten wurde das dabei produzierte ADP mit Hilfe des *ADP Quest Assay Kits* gemessen. Das dabei ausgelesene Fluoreszenzsignal wurde durch eine Eichkurve in μM ADP umgerechnet. Dafür wurde das Fluoreszenzsignal von bekannten ADP Konzentrationen (0, 0,248, 0,783, 2,16, 6,66, 20 und 60 μM) mit dem *ADP Quest Assay Kit* gemessen. Im Graph dargestellt ist die nach 90 Minuten erzeugte ADP Konzentration relativ zur eingesetzten ATP Konzentration. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=2$.

3.5.1 Die Fließgleichgewichtsparameter von LGP2 und MDA5

Die Michaelis-Menten Konstante K_m ist in Anwesenheit von pI:C für LGP2 mit $109,6 \pm 12,8$ μM deutlich höher als für MDA5 mit $64,5 \pm 12,6$ μM . Ohne pI:C lässt sich für LGP2 ein K_m -Wert von $1477 \pm 148,7$ μM messen. Der ATP Umsatz von MDA5 ohne pI:C ist insbesondere bei der Verwendung niedriger ATP Konzentrationen sehr gering. Durch die Messschwankungen des verwendeten *ADP Quest Assay Kits* unterliegen die Messwerte in diesem Bereich zusätzlich einem sehr großen relativen Fehler. Daher lässt sich für MDA5 ohne pI:C keiner der Fließgleichgewichtsparameter sinnvoll ohne hohe Schwankungen berechnen.

Diese Unterschiede können bei der maximal erreichbaren Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} nicht beobachtet werden. Mit einer v_{\max} von $0,97 \pm 0,05$ $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ ist die maximale ligandeninduzierte Reaktionsgeschwindigkeit von LGP2 ähnlich wie die von MDA5 mit $1,00 \pm 0,02$ $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Ohne pI:C beträgt v_{\max} für LGP2 lediglich $0,69 \pm 0,04$ $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$.

Die Wechselzahl k_{cat} von LGP2 liegt nach Zugabe von pI:C mit einem Wert von $56,9 \pm 0,3$ min^{-1} deutlich unter MDA5 mit $116,5 \pm 1,94$ min^{-1} . Ohne RNA-Ligand beträgt die Wechselzahl von LGP2 mit $20,2 \pm 1,1$ min^{-1} lediglich knapp ein Drittel des Wertes mit pI:C.

In den experimentell ermittelten Daten vergrößert die Zugabe von pI:C die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m von LGP2 von $0,014 \pm 0,001$ $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ auf $0,526 \pm 0,059$ $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$. Für die gemessene katalytische Effizienz von MDA5 mit pI:C von $1,87 \pm 0,336$ $\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ kann wie oben beschrieben kein Vergleichswert ohne pI:C bestimmt werden.

Im Anbetracht der ermittelten K_m -Werte lässt sich folgern, dass in Anwesenheit von pI:C MDA5 eine größere Affinität zum Substrat ATP hat als LGP2. Auch die maximal erreichbare Reaktionsgeschwindigkeit v_{\max} , sowie die Wechselzahl k_{cat} von MDA5 übersteigt die Werte von LGP2 deutlich. Für die Erkennung viraler Liganden und der anschließenden Aktivierung der Signalkaskade durch MDA5 scheint eine hocheffizient und schnell ablaufende ATP-Hydrolyse essenzieller zu sein, als für die modifizierende Funktion von LGP2.

Die mehr als zehnfache Reduktion des K_m -Wertes von LGP2 nach Zugabe von pI:C deutet auf eine deutliche Affinitätssteigerung für ATP durch die Aktivierung von LGP2 mit einem RNA

Liganden hin. Auch die katalytische Effizienz von LGP2 zeigt eine deutlich verbesserte Hydrolyse von ATP in Anwesenheit von RNA.

Tabelle 3.1 Fließgleichgewichtsparameter

Protein	Ligand	K_m [μM]	v_{max} [$\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$]	k_{cat} [min^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{min}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$]
LGP2	-	$1477 \pm 148,7$	$0,69 \pm 0,04$	$20,2 \pm 1,1$	$0,014 \pm 0,001$
LGP2	pI:C	$109,6 \pm 12,8$	$0,97 \pm 0,05$	$56,9 \pm 0,3$	$0,526 \pm 0,059$
MDA5	-	n/a	n/a	n/a	n/a
MDA5	pI:C	$64,5 \pm 12,6$	$1,00 \pm 0,02$	$116,5 \pm 1,94$	$1,87 \pm 0,336$

Tabelle 3.1 Fließgleichgewichtsparameter

Die Fließgleichgewichtsparameter von LGP2 und MDA5 wurden jeweils mit und ohne pI:C als Ligand mit Hilfe der Software Graph Pad Prism berechnet (siehe 2.4 für genaues Vorgehen). K_m = Michaelis-Menten Konstante; v_{max} = maximal erreichbare Umsatzgeschwindigkeit; k_{cat} = Wechselzahl; k_{cat}/K_m = katalytische Effizienz. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von n=2.

3.5.2 LGP2 zeigt eine hohe basale ATP Hydrolyserate ohne Anwesenheit eines RNA Liganden

Als Mengen-normiertes Maß für den Umsatz von ATP pro Zeiteinheit sollte die spezifische ATP-Hydrolyse Aktivität bestimmt werden. Dafür wurde die ATP-Hydrolyse von LGP2, MDA5 und RIG-I mittels Messung von ADP jeweils mit und ohne RNA Ligand bestimmt. Rekombinantes LGP2, MDA5 und RIG-I wurden mit $100 \mu\text{M}$ ATP für einen definierten Zeitraum zwischen 0 und 120 Minuten inkubiert. Die anschließende Messung des dabei produzierten ADP erfolgte in Relation zu einer ADP Standardkurve, die wie in 3.5 beschrieben erstellt wurde. Bei der graphischen Darstellung dieser Daten (siehe Abb. 3.5.2) wird die Annahme gemacht, dass zum Zeitpunkt 0 Minuten in keinem Versuchsansatz relevante Mengen an ADP vorliegen. Das auf diese Art erhaltene, lineare Verhältnis zwischen gemessener ADP Menge und vergangener Zeit seit Zugabe von ATP dient wie in 2.4 beschrieben zur Errechnung der spezifischen ATP-Hydrolyse Aktivität.

Für LGP2 und MDA5 diente pI:C als Ligand, während RIG-I mit doppelsträngiger 2.2ds 5'-Triphosphat-RNA inkubiert wurde. Ziel dabei ist, die Hydrolyserate der jeweiligen Helikase mit einem möglichst optimalen Liganden zu ermitteln. Wie in Versuch 3.3.4 gezeigt und aus der Literatur bekannt, aktiviert lange, doppelsträngige RNA die ATPase Domäne von MDA5, während RIG-I eine höhere Affinität für kurze RNA mit einer 5'-Triphosphat Modifikation besitzt und auch durch kurze dsRNA aktiviert werden kann [57,60]. Im Gegensatz zu 3.5.1 wird für diese Versuchsreihe eine feste ATP Konzentration von $100 \mu\text{M}$ verwendet, während bei der Bestimmung der Fließgleichgewichtsparameter niedrigere ATP Konzentrationen berücksichtigt

werden müssen. Daher lässt sich in diesem Versuch auch für die ATP Hydrolyserate von MDA5 ohne pI:C ein valider Wert berechnen, wenn auch mit hohem relativem Fehler.

Wie in Tab. 3.2 dargestellt, zeigt LGP2 ohne die Zugabe von pI:C bereits eine hohe basale ATP Hydrolyserate von $296,9 \pm 31,1 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Diese erhöht sich durch die Zugabe des Liganden pI:C um knapp das Fünffache auf $1411,0 \pm 65,3 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. MDA5 hat dahingegen eine geringe basale Hydrolyserate von lediglich $79,3 \pm 26,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Diese erhöht sich durch Zugabe von pI:C jedoch um fast das 70-fache auf $5315,7 \pm 339,5 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Die ligandenabhängig durch IVT 2.2ds RNA induzierte ATP Hydrolyserate von RIG-I ist mit $3526,4 \pm 188,4 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ geringer als die Hydrolyserate von MDA5. RIG-I zeigt ohne Ligand deutlich weniger ATP Hydrolyse als MDA5 oder LGP2. Das verwendete *ADP Quest Assay Kit* unterliegt in diesem Bereich kaum messbarer ATP Hydrolyse einem großen Fehler, sodass keine valide Aussage über die tatsächliche ATP Hydrolyserate von RIG-I ohne Ligand gemacht werden kann. Diese ist in jedem Fall deutlich geringer als die von MDA5 ohne Ligand, genaue Werte sind hier aus methodischen Gründen nicht bestimmbar.

Im Vergleich zu MDA5 zeigt LGP2 auch ohne Anwesenheit eines spezifischen Liganden eine hohe intrinsische ATPase-Aktivität. Poly I:C als Ligand erhöht die ATPase-Aktivität von LGP2 zwar um etwa das Fünffache, LGP2 erreicht dabei aber nicht die hohe stimulierte Aktivität von MDA5 oder RIG-I, die sich im Fall von MDA5 im Vergleich zur unstimulierten Bedingung um fast das 70-fache steigern lässt.

Tabelle 3.2 ATP Hydrolyserate

Protein	Ligand	Hydrolyserate [nmol * min ⁻¹ * mg ⁻¹]
LGP2	-	$296,9 \pm 31,1$
LGP2	pI:C	$1411,0 \pm 65,3$
MDA5	-	$79,3 \pm 26,4$
MDA5	pI:C	$5315,7 \pm 339,5$
RIG-I	-	$\ll 79,3 \pm 26,4$ (MDA5)
RIG-I	IVT 2.2ds	$3526,4 \pm 188,4$

Tabelle 3.2 ATP-Hydrolyse Rate von LGP2, MDA5 und RIG-I

Die ATP-Hydrolyse Rate entspricht der Steigung der Geraden aus Abb. 3.5.2. Diese wurde jeweils mit und ohne pI:C (MDA5 und LGP2) oder IVT 2.2ds (RIG-I) bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n=2.

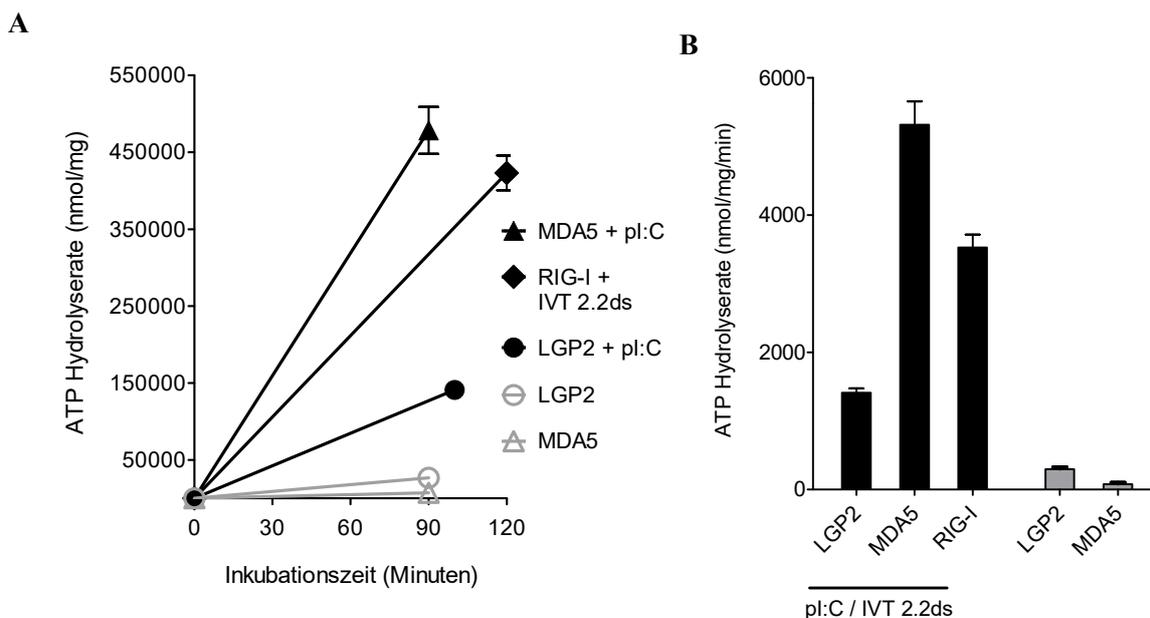


Abbildung 3.5.2 Bestimmung der ATP-Hydrolyse Rate von LGP2, MDA5 und RIG-I

Rekombinantes LGP2, MDA5 und RIG-I wurden mit ATP und jeweils mit und ohne pl:C (MDA5 und LGP2) oder IVT 2.2ds (RIG-I) inkubiert. Das dabei entstandene ADP wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mit dem *ADP Quest Assay Kit* gemessen. Das gemessene Fluoreszenzsignal wurde wie in 2.3.7 beschrieben durch eine Eichkurve in μM ADP umgerechnet (entstandenes ADP entspricht hydrolysiertem ATP).

A) Gezeigt ist das pro Milligramm Protein hydrolysierte ATP relativ zur Inkubationszeit. Dabei liegt die Annahme zugrunde, dass zum Zeitpunkt 0 Minuten keines der eingesetzten Proteine ATP hydrolysiert hat. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=2$.

B) Graphischer Vergleich der ATP-Hydrolyse Rate von LGP2, MDA5 und RIG-I pro Minute jeweils mit und ohne Ligand. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=2$.

Die enzymkinetische Untersuchung zeigt einige wichtige Unterschiede zwischen den Enzymcharakteristika von LGP2 im Vergleich zu MDA5 und RIG-I auf. LGP2 setzt in Anwesenheit eines RNA Liganden das Substrat ATP deutlich langsamer und weniger effizient um als MDA5 und RIG-I. Jedoch hydrolysiert LGP2 auch ohne RNA Ligand ATP mit einer vergleichsweise hohen Rate und zeichnet sich damit durch eine intrinsische ATPase-Aktivität aus, die *in vivo* so vermutlich auch in nicht-infizierten Zellen zu jeder Zeit stattfindet. Mechanistisch scheint die ATPase-Aktivität von MDA5 und RIG-I im Gegensatz zu LGP2 daher mehr nach dem „alles-oder-nichts“-Prinzip zu funktionieren. Einen Interpretationsansatz dafür liefert die Überlegung, dass die ATPase-Aktivität eine fundamentale Rolle sowohl bei der Erkennung viraler RNA, also auch bei der Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade spielt. Für die Integrität einer Zelle hat die Exposition mit antiviralen Zytokinen und Interferonen derart weitreichende Folgen, dass deren Expression sehr genau kontrolliert werden muss. Im Falle einer tatsächlichen Virusinfektion muss die Aktivierung jedoch sehr effizient und schnell stattfinden, sodass die ATP-Hydrolyse in Anwesenheit viraler Liganden auf Hochtouren laufen muss. Die ATP-Hydrolyse von LGP2 scheint jedoch nach einem anderen Prinzip zu funktionieren. Es lässt sich mutmaßen, dass zur Erkennung und Modulation viraler Liganden

durch LGP2 eine ständig ablaufende ATP-Hydrolyse notwendig ist. Durch virale RNA wird diese lediglich mäßig gesteigert.

3.6 VSV RNPs

In den bisher diskutierten Experimenten dieser Arbeit wird LGP2 funktionell als positiver Regulator für RIG-I und MDA5 beschrieben und mit Blick auf seine enzymatischen Eigenschaften charakterisiert. Auf mechanistischer Ebene wird eine Bildung von Homo- und Heterokomplexen mit RIG-I beschrieben. Um diese Ergebnisse funktionell in der Hypothese zu einen, dass LGP2 als Mediator die Erkennung viraler RNPs ermöglicht, sollte ein *in vitro* System etabliert werden, das die Untersuchung einer möglichen Interaktion von LGP2 mit viralen RNPs ermöglicht. Für die folgenden Experimente mit viralen RNPs wurde Wildtyp Vesikulärer Stomatitis Virus (VSV), Stamm Indiana benutzt.

3.6.1 VSV RNPs lassen sich mit 1 % Triton X-100 in großer Reinheit aufreinigen

Zuerst sollten zur experimentellen *in vitro* Verwendung RNPs direkt aus Virionen aufgereinigt werden. Der verwendete Wildtyp Vesikulärer Stomatitis Virus (VSV), Stamm Indiana lässt sich leicht und schnell in der Zellkultur amplifizieren und ist als Prototyp eines negativ-Strang RNA Virus seit vielen Jahren gut erforscht und beschrieben. Als RIG-I-abhängiges Virus sollte so die Rolle von LGP2 speziell bei der Erkennung viraler Liganden durch RIG-I untersucht werden [52].

VSV RNPs wurden wie in 2.3.11 beschrieben direkt aus Virionen aufgereinigt, wobei mit Hilfe eines Detergens die Lipidhülle der VSV Virionen lysiert wurde. Analog zu Mebatsion et al. wurde zur Freisetzung der RNPs das Detergens Triton X-100 in einer Konzentrationen von 0,05 % verwendet [124]. Wie in 2.3.11 beschrieben, erfolgte die Trennung der RNPs von den restlichen Bestandteilen anhand ihres Sedimentationsverhaltens mittels Ultrazentrifugation. In der anschließenden Analyse mittels *Western blot* zeigt sich eine hohe Kontamination mit dem membranständigen Hüllenprotein VSV G-Protein, was auf eine unvollständige Lyse der Virionenhülle hindeutet (siehe Abb. 3.6.1.1). Die Konzentration von Triton X-100 wurde daraufhin schrittweise gesteigert, wobei sich ab 1 % eine fast vollständige Elimination von VSV-G zeigt. Die Lyse der Virionen beeinflusst die Menge an detektierbarem VSV-Nukleoprotein (VSV N-Protein) als Bestandteil des RNP Komplexes nicht relevant (siehe Abb. 3.6.1.1).

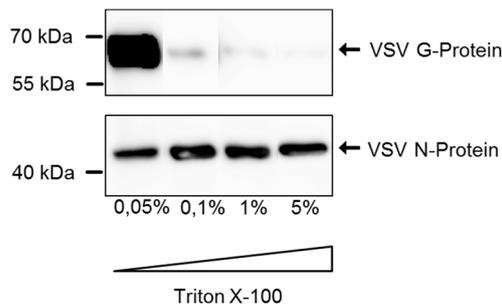


Abbildung 3.6.1.1 1 % Triton X-100 ist optimal zur Lyse von VSV Virionen

Wildtyp VSV RNPs wurden wie in 2.3.11 beschrieben aus VSV Virionen aufgereinigt. Zur Lyse der Virionenmembran wurden 0,05 %, 0,1 %, 1 % oder 5 % des Detergens Triton X-100 verwendet. Nach Auftrennung der so aufgereinigten RNPs mittels SDS-PAGE wurde ein *Western blot* durchgeführt. Der Nachweis des membranständigen VSV G-Proteins und des im RNP inkorporierte VSV N-Proteins erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

Zur Charakterisierung der in den RNP Präparationen enthaltenen Proteine wurden aufgereinigte RNPs mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Brilliant-Blau angefärbt. Dabei zeigt sich neben den erwarteten Bestandteilen VSV L-Protein (242 kDa), P-Protein (31 kDa) und N-Protein (48 kDa) eine Vielzahl unspezifischer Banden (siehe Abb. 3.6.1.2 A). Da die Amplifikation von VSV in BHK Zellen in der Zellkultur erfolgte, lag die Vermutung nahe, dass die Kontaminationen auf das serumhaltige GMEM Vollmedium zurückzuführen sind. Darauf folgend wurden die zur Amplifikation von VSV verwendeten BHK Zellen in serumfreiem Opti-MEM Medium gehalten. Durch Verwendung der so amplifizierten, serumfreien Virionen können jegliche, mit Coomassie-Brilliant-Blau detektierbaren Proteinkontaminationen in den RNP Präparationen eliminiert werden, während lediglich die erwarteten L-, P-, und N-Proteine nachweisbar sind. Kontaminationen mit VSV G-Protein (57 kDa) oder VSV M-Protein (26 kDa) lassen sich nicht nachweisen (siehe Abb. 3.6.1.2 B).

Die Amplifikation der VSV Virionen durch die Verwendung von serumfreiem Opti-MEM Medium verringert den maximal erreichbaren Virustiter signifikant. Folglich verringert sich auch die RNP Konzentration in der fertigen Präparation, da die Rotorgefäße der zur Aufreinigung verwendeten Ultrazentrifuge die maximal einsetzbare Menge an Virionensuspension begrenzen und so die technisch erreichbare Konzentration an RNPs in den Präparationen limitieren. Da für nachfolgende Experimenten mit den RNPs höhere Konzentrationen notwendig waren, sollte der Titer der Virionen vor der Präparation erhöht werden. Die VSV Virionensuspension wurden vor der Lyse mittels Amicon Ultra-4 Zentrifugen-Filtereinheiten mit einer nomineller Molekulargewichtsgrenze von 100 000 Dalton auf 1/10 des Ausgangsvolumens konzentriert und somit der Virustiter erhöht. Anschließend erfolgte die Aufreinigung nach Protokoll. In der anschließenden Coomassie-Färbung der RNPs findet sich im Vergleich zur parallelen Aufreinigung ohne Ultrafiltration bei gleichem

Probevolumen eine erhöhte Menge der RNP Proteine (siehe Abb. 3.6.1.2 B). Die Verwendung von serumfreien, aufkonzentrierten VSV Virionen, die durch 1 % Triton X-100 lysiert wurden, erweist sich damit als ideal zur Produktion kontaminationsarmer RNPs.

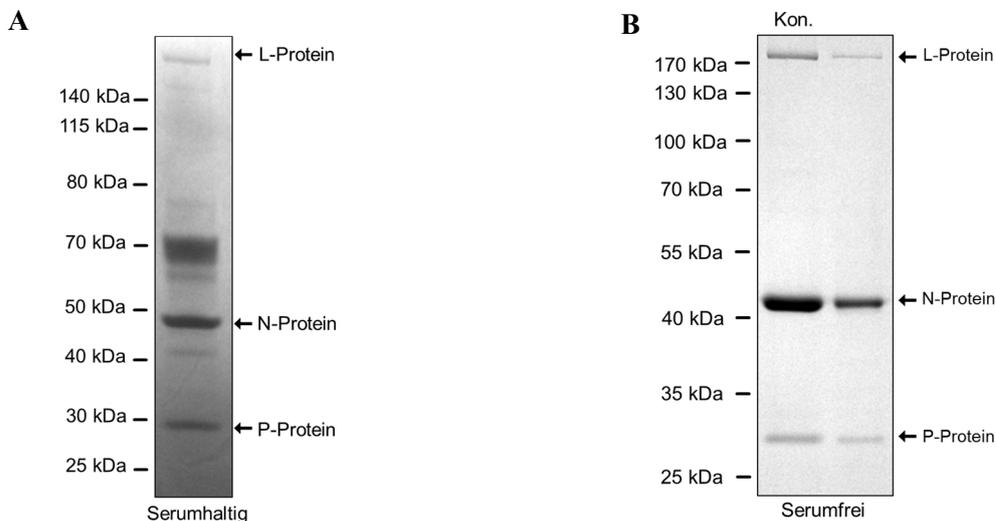


Abbildung 3.6.1.2 VSV RNPs lassen sich aus serumfreien Virionen ohne Proteinkontamination aufreinigen, wobei sich die Ausbeute durch Konzentration der Virionen erhöht

A) Wildtyp VSV RNPs wurden aus in serumhaltiger Zellkultur produzierten Virionen nach Protokoll aufgereinigt. Die Präparationen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten.

B) Wildtyp VSV Virionen wurden in serumfreier Zellkultur produziert und anschließend mit Hilfe einer Zentrifugen-Filtereinheit konzentriert. Danach erfolgte die Aufreinigung der RNPs wie in 2.3.11 beschrieben. Serumfreie RNPs aus konzentrierten (Kon.) und unkonzentrierten Virionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mindestens zwei unabhängigen Experimenten (konzentrierte RNPs: n=2, unkonzentrierte RNPs: n=5).

3.6.2 Aufgereinigte RNPs enthalten VSV Vollängen-Genom und VSV DI-LT Genom

Wie in 3.6.1 gezeigt, lassen sich VSV RNPs mit so großer Reinheit isolieren, dass sich weder mittels Coomassie-Brilliant-Blau Färbung unspezifische, noch durch *Western blot* spezifische Proteinkontaminationen nachweisen lassen. Um zu zeigen, dass es sich bei den mittels Ultrazentrifugation sedimentierten Komplexen um vollständige RNPs handelt, sollte das virale Genom von VSV als integraler Bestandteil der RNPs nachgewiesen werden.

Dafür wurde ein *Northern blot* mit Wildtyp VSV RNP Präparationen und intakten Virionen durchgeführt. Die Extraktion der RNA aus den RNP Präparationen und Virionen erfolgte in Zusammenarbeit mit Maximilian Gradel unter Verwendung von *TRIzol Reagent* nach dem Protokoll des Herstellers. Die so isolierte RNA wurde in einem Agarose Gel aufgetrennt. Anschließend wurde zusammen mit Konstantin Sparrer im Labor von Prof. Conzelmann

(Genzentrum, LMU München) ein *Northern blot* wie in 2.3.6 beschrieben angefertigt. Als Sonde zur Erkennung des VSV Genoms diente ein Oligonukleotid, das zu Abschnitten des Genoms komplementär ist. Dieses ist mit inkorporiertem ^{32}P - α -CTP radioaktiv markiert und hybridisiert komplementär an das Genom, sodass dabei Teile der VSV P-, M- und G-Gene erkannt werden (siehe Tab. 2.4 für zur Amplifikation verwendete Primer). Die Arbeiten zur RNA Präparation und den *Northern blots* erfolgten in Zusammenarbeit mit Maximilian Gradel.

Im *Northern blot* können sowohl in den RNP Präparationen, als auch in nativen Virionen zwei distinkte Banden dargestellt werden (siehe Abb. 3.6.2). Die Bande oberhalb der 10 000 Nukleotid-Marke entspricht dabei dem 11 161 Nukleotide umfassenden, nativen Genom von VSV. Die zweite Bande liegt bei etwa 5500 Nukleotiden und kann vermutlich dem 5312 Nukleotide umfassenden Genom von DI-LT-Partikeln zugeordnet werden. VSV DI (*defective interfering*) Partikel sind Deletionsmutanten des nativen Virus, deren Genom unterschiedliche Längen und Sekundärstrukturen annehmen kann. Sie entstehen auf Grund der Fehleranfälligkeit der viralen RNA-abhängigen-RNA-Polymerase, die während der Replikation des viralen Genoms von diesem spontan abfallen und die genomische RNA Vorlage wechseln kann. Wie das Volllängen-Genom ist auch das DI-Genom von N-Proteinen umhüllt [50]. In der Zellkultur entstehen DI-Partikel vorwiegend bei Infektion mit einer hohen Infektionsmultiplizität (MOI), also einem zahlenmäßigen Überschuss an Viruspartikeln im Verhältnis zu deren Zielzellen [109]. Da Teile des Genoms und insbesondere der viralen Polymerase VSV-L in DI-Partikel fehlen, sind sie zur Replikation auf die Co-Infektion mit dem intakten Volllängen-Virus angewiesen. In der Literatur werden mehrere Klassen von DI-Partikeln beschrieben, darunter *deletion*, *snapback*, *panhandle* und *compound* DI-Partikel [125]. Das DI-LT Genom hat eine Deletion innerhalb des VSV-L Gens. Die Sequenzen der VSV P-, M- und G-Gene, welche von der eingesetzten Sonde erfasst werden, sind jedoch nativ erhalten [125]. Diese Versuche bestätigen, dass die RNP Präparationen neben den RNP Proteinen VSV N, P und L auch die vollständige genomische RNA und Genomteile in Form von DI-Partikeln enthalten.

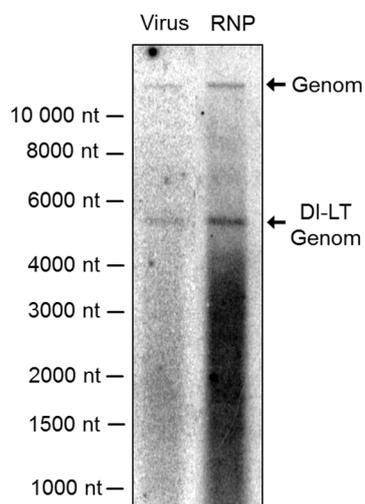


Abbildung 3.6.2 VSV RNPs enthalten Vollängen-Genome und DI-LT Genome

Aus Wildtyp VSV RNPs (RNP) und Virionen (Virus) wurde RNA isoliert. Diese wurde in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend wurde ein *Northern blot* durchgeführt. Zur Detektion genomischer RNA wurde eine 1000 Basen umfassende Sonde benutzt, die Teile der kodierenden Sequenzen der VSV P-, M- und G-Proteine erkennt. Als Größenvergleich dient ein Marker mit Nukleotiden bekannter Länge. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.6.3 Chromatographische Analyse der Reinheit der RNP Präparationen

Zur Etablierung eines aussagekräftigen *in vitro* Systems, um Interaktionen mit RNPs zu untersuchen, mussten zunächst RNPs mit hoher Reinheit isoliert werden und ein Nachweissystem für intakte RNPs etabliert werden. Mit konventionellen Proteinfärbungen können wie in 3.6.1 gezeigt in den Präparationen keine Verunreinigungen mehr detektiert werden. Da es sich bei der SDS-Gelelektrophorese um ein denaturierendes Verfahren handelt, können zwar die im RNP inkorporierten Proteine nachgewiesen werden, damit ist jedoch noch keine Aussage möglich, ob die isolierten RNPs als hochmolekularer Komplex vorliegen, oder ob sich lediglich die RNP Proteine vom viralen Genom abgetrennt in der Präparation befinden. Daher wurden die RNP Präparationen nach dem Prinzip der Größenausschluss-Chromatographie mittels des Laufverhaltens in einer Matrix hinsichtlich ihrer Größe und möglicher weiterer Verunreinigungen charakterisiert.

Zur chromatographischen Analyse wurden RNPs aus serumhaltigen Wildtyp VSV Virionen verwendet, da sich diese leichter und mit einer höheren Konzentration aufreinigen lassen, als serumfreie RNPs. Zur anschließenden analytischen Größenausschluss-Chromatographie erfolgte die Resuspension der RNPs in PBS. Als Säulenmatrix diente eine Sephacryl S500HR 16/60 Säule mit einem Säulenvolumen von 150 ml. Bei der photometrischen Analyse der aufgetrennten Probe zeigen sich vier distinkte Absorptionsmaxima jeweils bei 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) im Chromatogramm (siehe Abb. 3.6.3 A). Das Durchflussvolumen, das den Absorptionsmaxima entspricht, wurde zur weiteren Analyse dementsprechend zu vier Fraktionen zusammengefasst. Bei Betrachtung des Chromatogramms fällt auf, dass drei der Absorptionsmaxima beginnend ab etwa 90 ml Durchflussvolumen direkt aufeinander folgend aus der Matrix eluiert werden. Ein erstes, kleineres Absorptionsmaximum wird bereits nach knapp 50 ml Durchflussvolumen detektiert. Folglich handelt es sich bei der Fraktion, die dem ersten Absorptionsmaximum entspricht, um hochmolekulare Bestandteile, während die zweite bis vierte Fraktion kleinere Bestandteile enthalten. Die Herstellung der zur Gelfiltration verwendeten Wildtyp VSV RNPs und die Analyse der chromatographisch aufgetrennten Proben erfolgte in Zusammenarbeit mit Maximilian Gradel.

Zur unspezifischen Charakterisierung der chromatographisch fraktionierten Proteinbestandteile der RNP Proben wurden die zusammengefassten Fraktionen mittels SDS-PAGE auf einem Gel aufgetrennt und anschließend mittels Coomassie Färbung angefärbt (siehe Abb. 3.6.3 B). Dabei lassen sich lediglich in der ersten und zweiten Fraktion Proteine anfärben. In der ersten Fraktion kann eine distinkte Bande zwischen der 35 und 55 kDa Marke nachgewiesen werden, die, wie in Abb. 3.6.1.2 gezeigt etwa auf der Höhe von VSV N-Protein liegt. Die in der zweiten Fraktion angefärbte Bande liegt knapp unter der 70 kDa Marke und findet in der nativen RNP Probe kein Äquivalent (siehe Abb. 3.6.1.2).

Zur spezifischen Identifikation der viralen Proteine wurde ein *Western blot* angefertigt. Das VSV N-Protein kann dabei nur in der ersten Fraktion detektiert und der in der Coomassie-Färbung gezeigten Bande zugeordnet werden. Das Hüllprotein VSV G lässt sich in keiner der Proben nachweisen. Die in der zweiten Fraktion unspezifisch angefärbte Bande knapp unter der 70 kDa Marke kann im *Western blot* weder als VSV G- noch als VSV N-Protein identifiziert werden (siehe Abb. 3.6.3 C). Vermutlich handelt es sich um Kontaminationen mit Albumin (66,5 kDa) und anderen globulären Proteinen aus dem serumhaltigen Zellmedium, das in diesem Versuch für die Anzucht von VSV verwendet wurde. Darüber hinaus hat sich in Vorversuchen gezeigt, dass bei der chromatographischen Auftrennung von serumfreien RNPs kein Äquivalent zur zweiten Fraktion auftritt. Das N-Protein ist im Vergleich zum P- und L-Protein in sehr viel größerer Zahl im RNP inkorporiert. Es lässt sich mutmaßen, dass in der chromatographischen Aufreinigung der RNPs insgesamt zu wenig Protein für die Anfärbung von P- und L-Protein vorhanden ist.

In Zusammenarbeit mit Maximilian Gradel wurde aus den gewonnenen Fraktionen unter Verwendung von *TRIzol Reagent* nach dem Protokoll des Herstellers RNA isoliert und diese mittels *Northern blot* wie in 2.3.6 beschrieben analysiert. Dabei kann gezeigt werden, dass in den Fraktionen zwei bis vier kein VSV Genom detektierbar ist, jedoch in der ersten Fraktion sowohl das VSV Genom, als auch das vermutete DI-LT Genom nachweisbar ist (diese Daten sind Teil der Forschungsarbeit von M. Gradel und hier nicht gezeigt). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die erste Fraktion hochmolekulare Komplexe aus mindestens VSV N-Protein und VSV Genom enthält, bei denen es sich vermutlich um intakte, native VSV RNPs handelt. Aufgrund des Laufverhaltens der ersten Fraktion im Chromatogramm kann außerdem ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um singuläre N-Proteine handelt. Im Hinblick auf die Trennkapazität der verwendeten Chromatographiesäule von etwa 4 kDa bis 100 000 kDa hätten die verhältnismäßig kleinen, singulären N-Proteine (etwa 48 kDa) die Matrix erst sehr spät und nach der Albuminkontamination durchlaufen. Es kann gefolgert werden, dass die RNPs nach der Sedimentation mittels Ultrazentrifugation intakt sind und die Präparationen bei Verwendung von serumfreien Virionen keine nachweisbaren Proteinkontaminationen enthalten.

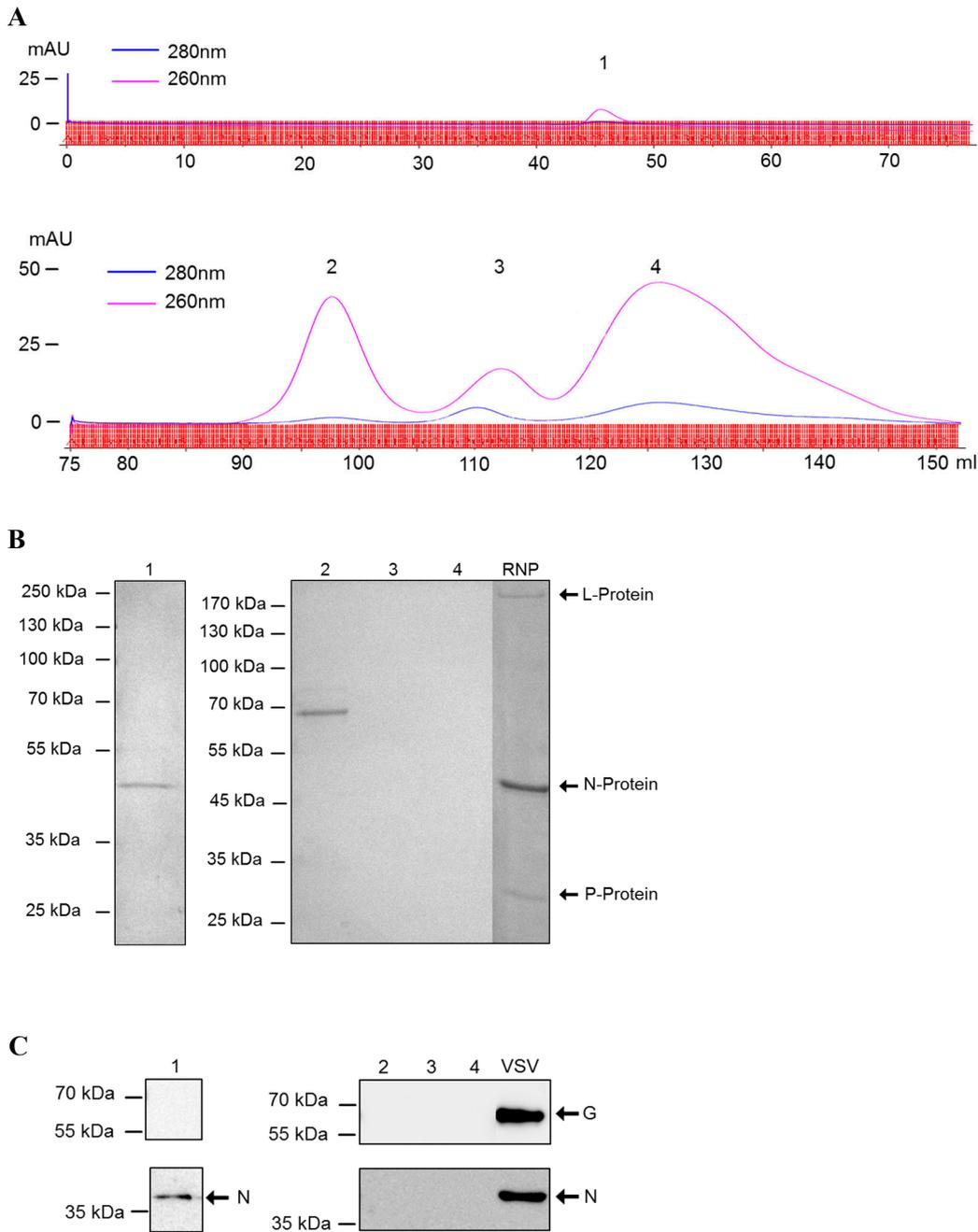


Abbildung 3.6.3 Chromatographische Analyse von VSV RNPs

A) Chromatogramm der Wildtyp VSV RNP Präparationen. VSV RNPs wurden aus serumhaltigen Wildtyp Virionen aufgereinigt und anschließend mittels Größenausschluss-Chromatographie analysiert. Gezeigt sind die Absorptionskurven bei 260 nm und 280 nm wie markiert. Vier messbare Absorptionsmaxima wurden nummeriert.

B) Die den Absorptionsmaxima aus A) entsprechenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend erfolgte eine unspezifische Proteinfärbung mittels Coomassie-Brilliant-Blau. Als Kontrolle wurden native RNPs aus serumfreien Wildtyp Virionen aufgetrennt und angefärbt.

C) Mit den Fraktionen, die den Absorptionsmaxima aus A) entsprechen, wurde ein *Western blot* durchgeführt. Serumfreie Wildtyp VSV Virionen (VSV) dienen als Vergleich. VSV G-Protein (G, obere Reihe) und VSV N-Protein (N, untere Reihe) wurden mittels Antikörper detektiert.

Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Experimenten.

3.7 VSV RNPs aktivieren die ATPase Domäne von LGP2 *in vitro*

Wie oben dargestellt, können in den RNP Präparationen keine relevanten Kontaminationen nachgewiesen werden. Daher eignen sie sich für die direkte Nutzung im ATPase Assay als Ligand für LGP2. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob RNPs *in vitro* Liganden für LGP2 darstellen und analog zu den oben charakterisierten RNA Liganden die ATPase Domäne von LGP2 aktivieren können.

VSV RNPs wurden wie in 2.3.11 beschrieben aus serumfreien Virionen aufgereinigt und als Ligand im ATPase Assay *in vitro* auf die Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 untersucht. Je 10 μ l Ansatz der Versuchsbedingung wurde 1 μ l aus der RNP Präparation verwendet, entsprechend etwa 2 ng RNPs. Als Kontrolle dienten Bedingungen ohne ATP, ohne LGP2 und mit LGP2-Pufferlösung als Negativkontrolle für LGP2. Als Positivkontrolle für die Hydrolyse von ATP wurde pI:C als Ligand verwendet.

Im durchgeführten Versuch zeigt LGP2 spezifisch in Anwesenheit der VSV RNPs eine erhöhte ATP-Hydrolyse Aktivität. Im Vergleich zu den Kontrollbedingungen kann eine ATP-Hydrolyse durch die RNPs selbst ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis erlaubt die Spekulation, dass RNPs als Ligand für LGP2 fungieren und ähnlich wie RNA die ATPase Domäne aktivieren könnten. LGP2 könnte dabei eine spezifische Interaktion mit den RNPs eingehen und unter Verbrauch von energiereichem ATP die Struktur des Partikels modifizieren.

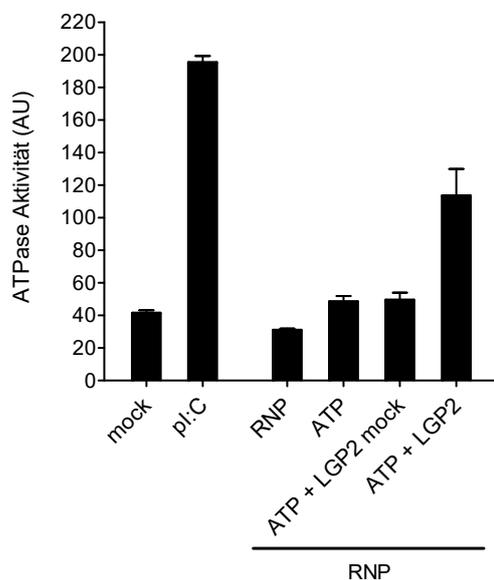


Abbildung 3.7 VSV RNPs aktivieren die ATPase Domäne von LGP2

Aufgereinigte RNPs wurden mit rekombinantem LGP2 sowie ATP inkubiert. Im Vergleich dazu wurden Ansätze ohne ATP, ohne LGP2 und mit LGP2-Verdünnungspuffer (LGP2 mock) inkubiert. Als Positivkontrolle wurde pI:C als Ligand verwendet. Als Negativkontrolle (mock) diente rekombinantes LGP2 mit ATP ohne Zugabe eines Liganden. Das produzierte ADP wurde nach 90 Minuten mit dem *ADP Quest Assay Kit* gemessen. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten, *arbitrary units* (AU), angegeben. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=2$.

4 Diskussion

4.1 Ergebnisübersicht

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Funktion der RIG-I-like-Helikase LGP2 während der viralen Infektion mit dem Ziel, LGP2 funktionell näher zu charakterisieren und eine mögliche Bindung und Modulation von viralen Ribonukleoprotein Komplexen zu untersuchen. Dabei konnte gezeigt werden, dass LGP2 die Erkennung viraler Liganden durch MDA5 und RIG-I im untersuchten Zellsystem positiv reguliert. Darüber hinaus konnten Proteinkomplexe, die LGP2 und RIG-I enthalten beobachtet werden und es wurde gezeigt, dass LGP2 selbst stimulusabhängig hochmolekulare Komplexe bilden kann. *In vitro* wurden synthetische RNA Liganden für LGP2 charakterisiert und enzymkinetische Eigenschaften von LGP2 und MDA5 bestimmt. Nach Etablierung eines Protokolls zur Aufreinigung viraler RNPs konnten diese als Aktivator der ATPase Domäne von LGP2 beschrieben werden.

Im ersten Teil der Arbeit wurden bereits in Studien publizierte Ergebnisse zum *knockout* von LGP2 in einem humanen Zellsystem überprüft. Dazu wurde LGP2 durch Transfektion von siRNA in einer Melanomzelllinie herunter reguliert und diese anschließend mit RIG-I- und MDA5-abhängigen Liganden stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass in Abwesenheit von LGP2 sowohl RIG-I und MDA5 stimulierende Nukleinsäureliganden, als auch RIG-I und MDA5 stimulierende Viren eine verringerte Immunantwort induzieren.

Zum Mechanismus der Interaktion zwischen LGP2 und RIG-I wurde bislang wenig publiziert. Um dies genauer zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Nach Stimulation mit RIG-I-abhängigen Liganden ließ sich LGP2 im Komplex mit RIG-I nachweisen und bildete Dimere und hochmolekulare Oligomere.

Zur weiteren molekularbiologischen Charakterisierung wurde ein zellfreies System gewählt. Dafür wurden humanes Volllängen-LGP2 und die Walker-A-*motif* Mutante LGP2 K30A, die kein ATP hydrolysieren kann, rekombinant hergestellt.

Durch *in vitro* Experimente wurden die minimalen Anforderungen an den RNA Liganden von LGP2 und MDA5 charakterisiert. Zur Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 ist doppelsträngige RNA notwendig, wohingegen die entsprechenden Einzelstränge keine ATP-Hydrolyse auslösen können. Dabei sind zehn Basenpaarungen ausreichend um die ATPase-Aktivität von LGP2 zu induzieren. Synthetische 5'-OH RNA kann ähnlich wie enzymatisch dephosphorylierte RNA ungehindert die ATPase Domäne aktivieren, eine 5'-Triphosphat Modifikation ist dafür keine Voraussetzung. In parallelen Experimenten wurde gezeigt, dass doppelsträngige RNA bis zu etwa 100 Basenpaaren für MDA5 nicht zur Aktivierung der ATP-Hydrolyse ausreicht. Poly I:C aktiviert erst ab einer Länge von etwa 100

Basenpaaren die ATPase-Aktivität von MDA5, dies geschieht dann jedoch unabhängig von Phosphatmodifikationen am 5'-Ende.

Durch ihre ATPase Domäne sind die RLHs Enzyme, die ATP als Substrat zu ADP und Phosphat umsetzen. Unter Berücksichtigung der RNA-abhängigen Aktivierung der ATPase Domäne wurden LGP2, MDA5 und RIG-I auf ihre enzymkinetischen Eigenschaften untersucht. Die in der Literatur beschriebene, basale ATP-Hydrolyse von LGP2 in Abwesenheit von RNA konnte dabei bestätigt werden [75]. Die ATP Hydrolyserate von LGP2 ist ohne RNA Ligand im Vergleich zu MDA5 und RIG-I bereits relativ hoch, lässt sich in Anwesenheit von pI:C jedoch lediglich um etwa den Faktor Vier steigern. Ohne RNA Ligand haben MDA5 und RIG-I eine niedrige basale ATP Hydrolyserate, die sich jedoch in Anwesenheit eines Liganden drastisch steigern lässt und letztendlich um ein Vielfaches höher ist, als die ATP Hydrolyserate von LGP2. Auch bei den Fließgleichgewichtsparametern zeigt LGP2 ohne Ligand verhältnismäßig hohe Werte, während diese für MDA5 ohne pI:C nicht messbar sind.

Der dritte Teil dieser Arbeit untersucht die Frage nach einer möglichen Interaktion von LGP2 mit viralen RNPs. Dafür wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von RNPs aus VSV Virionen ausgearbeitet. Basierend auf Angaben aus bestehenden Studien konnten die Lysebedingungen der Virionen optimiert werden, um eine Freisetzung der RNPs aus den behüllten Virionen zu erreichen. In der anschließenden Charakterisierung der RNP Präparationen gelang sowohl die Darstellung der RNP Proteine N, P, und L, als auch der Nachweis des viralen Genoms. In der Flüssigchromatographie wurde die Reinheit der Präparationen untersucht und gezeigt. Die so aufgereinigten RNPs sind im zellfreien System in der Lage, die ATPase Domäne von LGP2 zu aktivieren.

In unserer Arbeitsgruppe wurden parallel zu dieser Arbeit thematisch ergänzende Versuche von Maximilian Gradel im Rahmen seiner Forschungsarbeit durchgeführt. Einige seiner Versuche werden im Folgenden erwähnt und fließen in die Diskussion mit ein.

4.2 Interpretation der Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

Während die zur Signaltransduktion befähigten Helikasen RIG-I und MDA5 in der Literatur sehr detailliert beschrieben und charakterisiert wurden, hat die dritte Helikase LGP2 bisher nur wenig Aufmerksamkeit erhalten. Daraus ließ sich bisher kein überzeugendes Modell zur Funktion von LGP2 ableiten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich eingehend mit der Funktion von LGP2 und untersucht die Hypothese, dass LGP2 virale RNPs modifiziert und so die Erkennung durch RIG-I oder MDA5 ermöglicht.

4.2.1 LGP2 ist ein positiver Regulator für RIG-I und MDA5 im Zellsystem

Zur Funktion von LGP2 bei der Erkennung viraler RNA und der anschließenden Signalweiterleitung sind bisher widersprüchliche Daten publiziert worden. In frühen Arbeiten von Rothenfusser et al. und Yoneyama et al. wurde LGP2 als negativer Regulator für die RIG-I- und MDA5-vermittelte Induktion von Interferonen beschrieben [56,74]. Dies beruhte auf der Beobachtung, dass durch die plasmidvermittelte Überexpression von LGP2 die MDA5- und RIG-I-abhängige Aktivierung des Interferon Promotors vermindert wird. So wurde die These aufgestellt, dass LGP2 durch seine starke RNA Bindung in hohen Konzentrationen virale RNA sequestriert und so die Erkennung durch RIG-I oder MDA5 verhindert [74]. Einen ähnlichen Effekt hat auch die Überexpression einer RIG-I Mutante ohne CARD-Domänen. Dieses lediglich aus der RD-Domäne und Helikase Domäne bestehende RIG-I Konstrukt blockierte die RIG-I-vermittelte Signalweiterleitung [20]. Saito et al. konnten die LGP2-RD als Inhibitor von RIG-I und MDA5 identifizieren, die beobachtete Inhibition geschah daher unabhängig von der Helikase Domäne und analog wie bei überexprimierter RIG-I-RD Domäne [20]. Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass LGP2 mit MAVS interagiert und so möglicherweise die Signalkaskade nach der Aktivierung der RLHs zusätzlich blockieren könnte [21].

Neuere Daten aus LGP2 *knockout* Mäusen stehen im Kontrast zu der beschriebenen, rein inhibitorischen Funktion. Zum Zeitpunkt der Anfertigung der vorliegenden Arbeit waren drei verschiedene *knockout* Mäuse produziert worden, die sich in gewissen Aspekten ihres Phänotyps unterscheiden. Gemeinsam ist allen, dass nach Stimulation mit MDA5-abhängigen Viren und Liganden die Interferon- und Zytokinexpression deutlich eingeschränkt ist. In der von Venkataraman et al. gezüchteten *knockout* Maus wurde eine vermehrte Widerstandsfähigkeit gegen Infektion mit VSV sowie eine leicht vermehrte Induktion von Typ-I-Interferonen nach Infektion mit VSV im Zellsystem beobachtet. LGP2 *-/-* Makrophagen produzierten nach Infektion mit dem MDA5-abhängigen EMCV jedoch geringere Mengen Interferon, dementsprechend waren auch die Mäuse anfälliger für EMCV Infektionen. Auch beobachteten die Autoren zellspezifische Unterschiede, so wurde EMCV in MEFs LGP2-unabhängig erkannt. Zusammenfassend wurde LGP2 als positiver Regulator für MDA5-abhängige Ligandenerkennung und als negativer Regulator für RIG-I-abhängige Viren beschrieben. Die Erkennung des synthetischen Liganden pI:C war unabhängig von LGP2 [77].

Der Phänotyp einer zweiten *knockout* Maus von Satoh und Kollegen steht im Gegensatz zu dieser ersten Maus. In konventionellen dendritischen Zellen (cDC) konnten nach Infektion mit den RIG-I-abhängig erkannten Viren VSV, Sendai Virus und Japanische Enzephalitis Virus verminderte Spiegel an Interferonen und Interferon-induzierten Zytokinen wie IP10 gemessen werden. Der *knockout* von LGP2 reduzierte auch die Produktion von IFN- β nach Infektion mit

MDA5-abhängig erkannten Liganden wie EMCV und Mengo Virus. Lediglich die Erkennung von synthetischer RNA und Influenza-A-Virus war nicht abhängig von LGP2. Diese Beobachtungen beschreiben LGP2 damit insgesamt als positiven Modulator sowohl für RIG-I als auch für MDA5. Überzeugend für die positiv regulierende Funktion von LGP2 ist auch, dass Satoh et al. parallel eine *knock-in* Maus der LGP2 K30A Defektmutante generiert haben. Diese zeigte den gleichen Phänotyp wie die *knockout* Maus [78]. Die positive Modulation durch LGP2 ist also dementsprechend direkt von der ATP-Hydrolyse abhängig und eine spezifische Eigenschaft der enzymatischen Funktion von LGP2. Dahingegen beobachteten andere Autoren eine negative Modulation auch bei Überexpression der Mutante K30A im Zellsystem mit einer defekten ATPase Domäne [21]. Dies lässt schließen, dass es bei der artifiziellen Überexpression im Vergleich zum *knockout* fundamentale Unterschiede gibt, die sich drastisch auf den beobachteten Phänotyp auswirken. Interessanterweise konnte in Zellen aus der *knockout* Maus von Satoh und Kollegen die Überexpression von CARD-Domänen jedoch den LGP2 *-/-* Phänotyp ausgleichen, was darauf schließen lässt, dass die positive Regulation von LGP2 *upstream*, also in der Signalkaskade oberhalb von RIG-I und MDA5 stattfindet [78].

In einer dritten, unabhängig erstellten LGP2 *knockout* Maus zeigte sich ebenfalls eine positiv-regulatorische Funktion sowohl für RIG-I- als auch für MDA5-abhängige Viruserkennung. Nach Infektion mit dem RIG-I-abhängigen Sendai Virus, sowie den von MDA5 und RIG-I gemeinsam erkannten West Nil Virus und Dengue Virus wurde eine verminderte Interferonproduktion, sowie eine erhöhte virale Replikationsrate in dendritischen Zellen und Makrophagen aus der LGP2 *knockout* Maus beobachtet. Darüber hinaus hat diese Arbeitsgruppe beobachtet, dass LGP2 unabhängig von der RLH-abhängigen Signalkaskade eine wichtige Rolle beim Überleben von CD8⁺ T-Zellen spielt [79].

Die regulatorische Funktion von LGP2 auf die Aktivierung der RLH-abhängigen Signalkaskade sollte im gleichen Zellsystem untersucht werden, das auch für die weiteren, zellbasierten Experimente verwendet wurde. Daher wurde ein transienter, siRNA-vermittelter *knockdown* durchgeführt. Anschließend wurden die behandelten Zellen mit viralen und synthetischen Liganden stimuliert. Der *knockdown* erwies sich als effizienter und einfacher Weg, die in der Literatur mit Mäusen durchgeführten Experimente in ein humanes System zu übertragen. Die Ergebnisse zeigen, dass LGP2 sowohl die Erkennung von Viren, die vornehmlich von RIG-I erkannt werden, als auch die Erkennung von MDA5-abhängigen Viren positiv reguliert. Die hier verwendeten RIG-I-abhängigen Viren VSV und Sendai Virus wurden auch von Venkataraman et al., Satoh et al. und teilweise von Suthar et al. verwendet. Damit decken sich die Ergebnisse dieser Arbeit weitgehend mit den von Satoh et al. und Suthar et al. erhobenen Daten. Lediglich die von Satoh und Kollegen beschriebene, LGP2-unabhängige Erkennung von pI:C konnte nicht nachvollzogen werden. In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten war nach dem *knockdown* von LGP2 auch die pI:C-induzierte Immunantwort verringert.

Aktuellere Arbeiten deuten immer mehr auf eine enge Assoziation von LGP2 mit MDA5 hin. So wurde berichtet, dass LGP2 im Sinne eines positiven Regulators die Fibrillenbildung von MDA5 modifiziert, wodurch mit höherer Geschwindigkeit kürzere Fibrillen gebildet werden, die stärkere Aktivoren für MAVS darstellen [83]. Diese Experimente wurden allesamt mit synthetischer RNA durchgeführt. Daher scheint es überzeugend, dass im Gegenzug nach *knockdown* von LGP2 synthetische, MDA5-abhängige RNA wie pI:C den Interferon-Signalweg weniger stark aktiviert. Dies entspricht auch den Ergebnissen dieser Arbeit. Darüber hinaus konnten mehrere Autoren zeigen, dass sogar überexprimiertes LGP2 bis zu einem bestimmten Punkt die Aktivierung der MDA5-abhängigen Signalkaskade nach Stimulation mit pI:C verstärkt [73,82].

Einige Autoren schlagen vor, dass LGP2 durch unspezifische Sequestrierung von RNA als negativer Regulator wirkt. Daher scheint die von Venkataraman et al. beschriebene, RIG-I-spezifische negative Regulation durch LGP2 mechanistisch nicht einleuchtend. Aus strukturellen Daten ist bekannt, dass bestimmte Sequenzen, die in der RIG-I-RD essenziell zur Erkennung von 5'-Triphosphat RNA sind, in der LGP2-RD nicht vorhanden sind und die LGP2-RD RNA daher unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation bindet [61,73]. Außerdem wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die ATPase Domäne von LGP2 5'-Triphosphat-unabhängig aktiviert wird. Somit ist ein spezifisches Erkennen und Sequestrieren von RIG-I-abhängigen Liganden unter Ausschluss von MDA5-abhängigen Liganden durch LGP2 unwahrscheinlich.

Um die in der Literatur beschriebene, positive und negative regulatorische Funktion von LGP2 in einem funktionellen Modell zu einen, wurde in der Literatur die Hypothese aufgestellt, dass LGP2 wie ein konzentrationsabhängiger biphasischer Schalter funktioniert. Bei niedrigen, basalen Konzentrationen fördert LGP2 die Erkennung viraler RNA in positiver Weise. Sobald LGP2 Interferon-abhängig induziert wurde und in höheren Konzentrationen vorliegt, soll die hemmende Wirkung im Sinne einer auto-inhibitorischen Rückkopplungsschleife greifen [65]. Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass die beschriebene negative Regulation von LGP2 größtenteils auf der exogenen, artifiziellen Überexpression von LGP2 basiert. Dabei kann es durch die Plasmid-vermittelte Proteinexpression zu unphysiologisch hohen Proteinkonzentrationen kommen. Die negative Regulation lässt sich durch Überexpression mit HEK293 Zellen zuverlässig reproduzieren und wurde auch von den Erstellern einer der *knockout* Mäuse beobachtet [78]. Fraglich ist, ob ähnlich hohe LGP2 Konzentrationen durch die Interferon-abhängige Induktion auf natürliche Weise überhaupt erreicht werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Produktion des Zytokins IP10 über 12 Stunden nach Zellstimulation beobachtet. Bei Betrachtung der IP10-Konzentrationen der CO4 Kontrollbedingungen fällt auf, dass diese zumindest während des beobachteten Zeitraums

keiner negativen Regulation durch vermehrte LGP2 Induktion unterworfen sind, wie durch Bruns et al. vorgeschlagen [65]. Die Frage, ob nach längerer Zellstimulation Interferon-abhängig genug LGP2 induziert werden kann, um einen negativ regulatorischen Effekt zu bewirken, bleibt bisher unbeantwortet. Yoneyama et al. haben im murinen Zellsystem nach siRNA-vermitteltem *knockdown* von LGP2 und anschließender Infektion mit dem RIG-I-abhängig erkannten Newcastle *disease* Virus bereits 12 Stunden nach Virusinfektion eine gesteigerte Interferon- β Promotoraktivität beobachtet. Dieser Versuch steht im Kontrast zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, wurde jedoch auch im murinen Zellsystem und mit Hilfe der zusätzlichen artifiziellen Transfektion von Luciferase-Reportergenen durchgeführt [26,56,69].

Die vorliegende Arbeit beschreibt LGP2 also als positiven Regulator sowohl für MDA5 als auch für RIG-I. Die in dieser Arbeit im humanen Zellsystem für MDA5-abhängige Viren erhobenen Daten stimmen mit allen drei *knockout* Mäusen überein. Die Datenlage zu RIG-I-abhängigen Viren und pI:C ist in der Literatur sehr inhomogen. Die im humanen Zellsystem für den MDA5-abhängigen Liganden pI:C berichtete, positiv regulatorische Funktion von LGP2 wurde auch in dieser Arbeit bestätigt [73,82]. Zu RIG-I-abhängigen Viren wurde in den *knockout* Mäusen Unterschiedliches berichtet, die Ergebnisse dieser Arbeit entsprechend weitgehend dem von Satoh et al. und Suthar et al. beobachteten Phänotyp mit LGP2 als positiven Regulator für RIG-I. Im Detail könnten die hier gezeigten Unterschiede zu den *knockout* Mäusen auch Unterschiede zwischen dem murinen und humanen Immunsystem widerspiegeln. Auch stellt ein siRNA-vermittelter *knockdown* in der Zellkultur ein von Grund auf anderes System als ein *knockout* in der Maus dar. Allen *knockout* Mäusen gemeinsam ist ein zelltypspezifischer LGP2 *-/-* Phänotyp. Die Experimente von Satoh et al. wurden in embryonalen Fibroblasten (*mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) und *bone marrow-derived dendritic cells* (BMDCs) durchgeführt. Der berichtete Phänotyp konnte beispielsweise in konventionellen dendritischen Zellen (cDC), jedoch nicht in plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) beobachtet werden [78]. So könnten auch im humanen Zellsystem je nach verwendeter Zelllinie unterschiedliche Phänotypen vorkommen.

4.2.2 LGP2 interagiert mit RIG-I und bildet Oligomere

Wie in der vorliegenden Arbeit herausgearbeitet wurde, scheint LGP2 stimulusabhängig in einem Komplex mit RIG-I vorzuliegen. Dabei wurde überexprimiertes LGP2 mit endogenem RIG-I co-präzipitiert. Maximilian Gradel konnte ähnliche Ergebnisse bei der Verwendung von rekombinantem LGP2 im Zelllysate beobachten.

Auch konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass rekombinantes LGP2 zur Selbstassoziation befähigt ist. In Anwesenheit von RNA werden Dimere und Oligomere verschiedener Größe beobachtet. Hinweise darauf zeigen Komuro et al. auch mit überexprimiertem LGP2 im Zellsystem [21]. Murali et al. zeigen ebenfalls, dass LGP2 in Anwesenheit von RNA Dimere und höhermolekulare Oligomere geringerer Zahl bilden kann. Während Murali et al. jedoch verhältnismäßig kurze RNA verwendeten, konnte in dieser Arbeit auch die Bildung hochmolekularer Komplexe durch das lange RNA Analogon pI:C gezeigt werden [126]. Interessanterweise ist die hier beobachtete Oligomerisierung jedoch inkomplett, da der Großteil des eingesetzten Proteins weiterhin als Monomer vorliegt. Ein interessanter Folgeversuch wäre die Verwendung eines nicht-hydrolysierbaren ATP Analogons. Womöglich könnte dieses durch die Bindung an LGP2 die Oligomere stabilisieren, wodurch mehr Protein als Oligomer vorliegen würde. Dies würde auf einen Prozess hindeuten, der mechanistisch ähnlich der Fibrillenbildung von MDA5 funktioniert. Die Hydrolyse von ATP könnte die Dissoziation der Oligomere induzieren, so könnte ein kinetisches Gleichgewicht zwischen oligomerisiertem und monomerem LGP2 entstehen. Bruns et al. konnten bisher durch humanes LGP2 an sich keine MDA5-ähnlichen Fibrillen beobachten. Die Autoren berichten aber von LGP2-Aggregaten, die sich weiträumig entlang von RNA verteilen [83]. LGP2 aus Hühnern bildet hingegen ähnlich wie MDA5 in Anwesenheit von RNA Fibrillen. Funktionell bestehen beim Huhn jedoch gewisse Unterschiede zu den humanen RIG-I-like-Helikasen, da Hühner kein Analog zu RIG-I besitzen [127]. Die Oligomerisierung von LGP2 scheint also nicht auf kooperative Fibrillenbildung zurück zu gehen. Eine Oligomerisierung kann darüber hinaus sowohl nach Stimulation mit pI:C, als auch mit kurzer, doppelsträngiger RNA beobachtet werden, die für die Bildung von hochmolekularen, kooperativen Fibrillen entlang der RNA nicht ausreichend Platz bieten würde.

Unter nativen Bedingungen lässt sich auch eine ligandenabhängige Konformationsänderung von LGP2 beobachten, welche die Erkennung mittels Antikörper verbessert. Da zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine hochauflösende Kristallstruktur von humanem LGP2 existiert, kann bisher keine strukturelle Aussage zu dieser ligandenabhängigen Konformationsänderung gemacht werden. Die hier im nativen Gel beobachtete Konformationsänderung wurde in parallel von Maximilian Gradel durchgeführten Experimenten zum gleichen Thema ebenfalls beobachtet (Daten hier nicht gezeigt). So bildet LGP2 beim Verdau mit Trypsin in Anwesenheit von doppelsträngiger RNA ein Trypsin-resistentes Fragment, was ebenfalls auf eine ligandenabhängige Konformationsänderung hindeutet.

Im Gegensatz zur Modifikation der Fibrillenbildung von MDA5 findet sich in der Literatur jedoch zur Interaktion von LGP2 und RIG-I im Hinblick auf eine positive Regulierung bisher kein mechanistisches Modell. Die erwähnte, von anderen Autoren beobachtete Assoziation mit MAVS und der RD von RIG-I wurde zunächst als Manifestation einer negativen Regulation

durch LGP2 interpretiert [20]. Moresco et al. schlagen jedoch vor, dass diese Interaktion auch einer Rekrutierung von RIG-I an den von LGP2 modifizierten Liganden entsprechen könnte. Weiter könnte die Assoziation von LGP2 mit RIG-I, MDA5 und MAVS dazu dienen, die RNA Rezeptoren mit der Signalplattform MAVS zusammen zu bringen [128]. Der Hypothese dieser Arbeit entsprechend, könnte LGP2 in einem Multiproteinkomplex während der Modifikation der viralen Liganden eine direkte Bindung mit dem Liganden und RIG-I eingehen und so eine frühe und effiziente Erkennung freigesetzter viraler RNPs direkt nach der Fusion des Virions mit der Zielzelle ermöglichen. Dadurch könnte die filamentöse Oligomerisierung von RIG-I entlang der RNA ermöglicht oder erleichtert werden.

4.2.3 LGP2 und MDA5 erkennen distinkte RNA Liganden

Aus Bindungsstudien ist bekannt, dass LGP2 doppelsträngige RNA bindet, wobei die RD-Domäne analog zu MDA5 keine Präferenz für Triphosphat-RNA zeigt [20,43,73,74,126]. Funktionell scheint es vor allem bei LGP2 jedoch essenzielle Unterschiede zwischen bloßer RNA Bindung und RNA-abhängiger Aktivierung der ATP-Hydrolyse zu geben. Während die postulierte, negativ-regulatorische Funktion von LGP2 ATPase-unabhängig abläuft, ist zur positiven Regulation sowohl in der Maus, als auch im Zellsystem eine funktionell intakte Helikase Domäne notwendig [20,74,75,78]. Daher wurde für diese Arbeit nicht die Bindung von RNA an LGP2 analysiert, sondern die Fähigkeit, ATP-Hydrolyse auszulösen untersucht. Analog zu den Bindungsstudien aus der Literatur bestätigt sich dabei, dass doppelsträngige RNA unabhängig von einer 5'-Triphosphat-Modifikation zur Aktivierung der Helikase Domäne von LGP2 befähigt ist. Einzelsträngige RNA kann im Kontrast zu den Bindungsstudien die Helikase Domäne jedoch nicht aktivieren [61]. Die ATP-Hydrolyse von murinem MDA5 wird wie hier gezeigt in ähnlicher Weise durch das doppelsträngige RNA Analogon pI:C unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation aktiviert. Wie Berke et al. berichten, ist die Hydrolyse von ATP durch MDA5 jedoch keine zwingende Voraussetzung für die Signaltransduktion, sondern dient eher der Regulation der Filamentbildung und bestimmt damit die Spezifität von MDA5 für lange RNA [38,129]. Die ATPase-Aktivität von MDA5 korreliert jedoch mit der Induktion von Interferon, die durch den jeweiligen Liganden ausgelöst wird [57].

Interessante Ergebnisse ergaben sich bei der Untersuchung, wie lange doppelsträngige RNA Abschnitte mindestens sein müssen, um LGP2 und MDA5 aktivieren zu können. Für RIG-I ist bekannt, dass 10 Basenpaare zur Aktivierung der ATPase Domäne genügen [28,48]. Für LGP2 zeigen sich pI:C und 2.2ds 5'-Triphosphat RNA, die mit RNase III zu zwölf bis 15 Basenpaare umfassende Nukleotide verdaut wurden, zunächst als ausreichend zur Aktivierung der Helikase Domäne. Anschließend wurden kurze Nukleotide von fünf bis 18 Basen an einzelsträngige, synthetische 2.2s RNA hybridisiert. Dabei zeigen sich zehn Basenpaarungen als ausreichend zur

Aktivierung von LGP2. Ob die Entfernung der Hybridisierung zum 3'- oder 5'-Terminus des Gegenstranges dabei eine Rolle spielt, ist nicht eindeutig. Wenn davon ausgegangen wird, dass es sich bei den beobachteten Signalschwankungen um Artefakte handelt, sind die minimalen Anforderungen zur Aktivierung der ATP-Hydrolyse von LGP2 dieselben wie für RIG-I. Schmidt und Kollegen beobachteten ähnliche Schwankungen in einem analogen Experiment mit RIG-I und gehen davon aus, dass RIG-I durch das 3'- und 5'-Terminus Hybridisierungsprodukt gleichermaßen aktiviert wird [48]. Doppelsträngige RNA von zehn Nukleotiden reicht damit unabhängig von einer 5'-Triphosphat Modifikation aus, um die ATPase Domänen von LGP2 und RIG-I zu aktivieren. Obwohl die ATPase Domäne von RIG-I *in vitro* auch durch 5'-OH RNA aktiviert werden kann, sind zur Aktivierung der RIG-I-abhängigen Signalkaskade und Auslösung einer Immunantwort im Zellsystem neben der Doppelsträngigkeit weitere Modifikationen wie eine 5'-Triphosphatmodifikation notwendig [45,48,130]. Zu den biochemischen Eigenschaften des RNA Liganden von LGP2 *in vivo* kann bisher keine eindeutige Aussage gemacht werden.

Anders verhält es sich bei MDA5. Keiner der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen RNA Liganden definierter Länge kann die ATPase Domäne aktivieren. Der längste Ligand umfasste dabei 70 Nukleotide. Durch den Verdau von pI:C konnte ein Ligand produziert werden, der etwa 100 bis 150 Basenpaare umfasst und ATP-Hydrolyse durch MDA5 induzieren kann. Kato et al. haben mit einem ähnlichen Verdau ein etwa 300 Basenpaare umfassendes pI:C Fragment produziert, das sich in RIG-I *knockout* MEFs als minimale Ligandenlänge für die Aktivierung der MDA5-abhängigen Signalkaskade gezeigt hat [57]. Auch produzieren Viren, die hauptsächlich von MDA5 erkannt werden, in infizierten Zellen überwiegend lange, doppelsträngige RNA. RIG-I-abhängige Viren synthetisieren eher kürzere dsRNA. Daraus wurde ein striktes, längenspezifisches Erkennungsverhalten für MDA5 und RIG-I postuliert, wobei MDA5 präferentiell RNA zwischen etwa 500 und 7000 Basenpaaren detektiert, während kurze RNA mit weniger als 300 Basenpaaren von RIG-I erkannt werden soll [57,60]. Diese Experimente wurden jedoch ausschließlich mit synthetischer oder aus Zellen isolierter RNA durchgeführt und erlauben keine Aussage über den physiologischen Liganden während einer viralen Infektion *in vivo*. Eine ebenfalls von Kato et al. durchgeführte *in vitro* Messung der ATPase-Aktivität zeigte ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit, dass die ATP-Hydrolyse von RIG-I durch kurzes pI:C ausgelöst wird, während die ATPase Domäne von MDA5 lediglich durch langes pI:C aktiviert werden kann. Die exakte Länge des verwendeten pI:C wird nicht näher spezifiziert [57]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität von MDA5 bereits durch deutlich kürzere Liganden aktiviert wird, als zur MDA5-abhängigen Aktivierung der Signalkaskade in der Arbeit von Kato et al. notwendig ist. Analog zu RIG-I bestätigt sich, dass zwischen der Fähigkeit eines RNA Liganden *in vitro* die ATPase Domäne zu aktivieren und *in vivo* die spezifische Signalkaskade zu stimulieren, eine gewisse

Diskrepanz besteht. In diesem Sinne ist bei der Interpretation sämtlicher auf ATP Hydrolyse basierender Experimente wichtig, dass eine Aktivierung der ATPase Domäne nicht notwendigerweise mit einer tatsächlichen Aktivierung der RLH *in vivo* gleichgesetzt werden kann. In Analogie zu MDA5 und RIG-I kann auch für LGP2 nicht ausgeschlossen werden, dass bestimmte Liganden zwar die ATPase Domäne aktivieren können, jedoch *in vivo* keine physiologischen Aktivatoren darstellen könnten.

Für RIG-I konnte in jüngerer Zeit durch strukturbiochemische Analysen ein mechanistischer Erklärungsansatz für diese Diskrepanz geliefert werden. Strukturell kann RIG-I nur dann in eine aktive Konformation übergehen, wenn die Helikase Domäne einen RNA Liganden gebunden hat und gleichzeitig die regulatorische Domäne eine feste Bindung zu einem RNA Terminus mit einer Triphosphat-Modifikation eingehen kann. Die regulatorische Domäne von RIG-I wird daher als *end-capper* bezeichnet [32,45]. Doppelsträngige RNA ohne Triphosphat-Modifikation kann zwar an die Helikase Domäne binden, jedoch keine feste Bindung mit der RD eingehen [130]. So wird zwar die ATPase Domäne aktiviert, RIG-I kann aber nicht in die aktive Konformation übergehen, da eine Exposition der CARD-Domänen durch die schwach gebundene RD blockiert wird [45]. Funktionell wurde gezeigt, dass für die Aktivierung der RIG-I-abhängigen Signalkaskade lediglich die Bindung von ATP notwendig ist. Die Hydrolyse von ATP soll dabei hauptsächlich die Dissoziation von der gebundenen RNA auslösen und als Korrekturmechanismus ähnlich wie bei MDA5 für die Ligandenspezifität sorgen [45]. Ob zwischen dem physiologischen Liganden von LGP2 und Liganden, welche die ATPase Domäne aktivieren können, eine Diskrepanz besteht, kann bisher nicht beantwortet werden. Obwohl LGP2, wie in dieser Arbeit gezeigt, ligandenabhängig seine Konformation ändert, kann ein Blockierungsmechanismus analog zu RIG-I ausgeschlossen werden, da LGP2 keine CARD-Domänen besitzt.

4.2.4 LGP2 zeigt eine konstitutiv aktive, basale ATP Hydrolyserate

Um ihre Aufgabe bei der Erkennung viraler Infektionen im Organismus zu erfüllen, hydrolysieren alle RIG-I-like-Helikasen ATP. Damit unterliegen diese Enzyme auch den Gesetzmäßigkeiten der Enzymkinetik. Da die ATPase Domäne abhängig von der Anwesenheit eines RNA Liganden aktiviert wird, lassen sich die enzymkinetischen Eigenschaften sowohl zum Vergleich der RLHs unter einander, als auch zur Analyse der verschiedenen Liganden heranziehen. Bei Betrachtung der ATP Hydrolyserate fällt auf, dass sich diese bei allen RLHs durch einen RNA Liganden massiv steigern lässt. LGP2 weist im Vergleich zu RIG-I und MDA5 jedoch bereits eine hohe basale Hydrolyserate ohne Ligand auf. Diese lässt sich durch Zugabe eines Liganden zwar steigern, jedoch werden die hohen Werte von RIG-I und MDA5 nicht erreicht. RIG-I und MDA5 zeichnen sich durch sehr niedrige basale Hydrolyseraten aus,

die sich insbesondere bei MDA5 aber massiv steigern lässt. Ähnliches gilt für die Wechselzahl k_{cat} als Maßzahl für die Katalyserate des Umsatzes von ATP [45].

Ähnliche Ergebnisse zu den enzymkinetischen Parametern von LGP2 und RIG-I wurden zwischen den Experimente für diese Arbeit und der Fertigstellung der Dissertation von Bruns et al. veröffentlicht [75]. Die Autoren stimmen mit der hohen basalen ATPase-Aktivität von LGP2 überein, die sich im Vergleich zu RIG-I nur wenig steigern lässt. Auch die ermittelten Werte für die Fließgleichgewichtsparameter befinden sich meist in der gleichen Größenordnung wie die Daten in dieser Arbeit. Lediglich die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m für LGP2 ohne Ligand unterscheidet sich deutlicher. In der Arbeit von Bruns et al. unterscheidet sich die katalytische Effizienz von LGP2 ohne, respektive mit pI:C kaum, während in dieser Arbeit ein deutlicher Anstieg durch die Zugabe von pI:C beobachtet wurde. Dies ist vor allem dem von Bruns et al. ermittelten, sehr niedrigen Wert K_m für LGP2 ohne Ligand geschuldet [75]. Die Michaelis-Menten Konstante K_m ist eine Maßzahl für die Affinität des Enzyms zum Substrat, welche sich indirekt proportional zu K_m verhält. So zeigt bei Bruns und Kollegen LGP2 ohne pI:C eine deutlich größere Affinität zu ATP als mit, während in dieser Arbeit ein fast 15-fach höherer K_m -Wert ohne pI:C ermittelt wurde. Mechanistisch scheint es nicht überzeugend, dass LGP2 ohne Anwesenheit eines Liganden eine höhere Affinität zu ATP hat, als nach Zugabe eines Liganden, der die ATP-Hydrolyse aktiviert. Auch die von Bruns et al. ermittelte Hydrolyserate von RIG-I erreicht nur etwa ein Drittel des hier gefundenen Wertes. Bruns et al. benutzten jedoch pI:C als Ligand, wohingegen für diese Arbeit kurze doppelsträngige RNA mit einem 5'-Triphosphat verwendet wurde, welche ein effektiverer Ligand für die Aktivierung von RIG-I ist [45]. Peisley et al. haben die enzymkinetischen Eigenschaften von MDA5 benutzt, um die längenabhängige Affinität zu RNA Liganden von MDA5 zu zeigen. Dabei konnte RNA mit einer Länge von mehreren Tausend Basenpaaren ATP Hydrolyseraten erreichen, die in einer ähnlichen Größenordnung wie die hier ermittelten Daten liegen [60].

In Anbetracht der vermuteten Funktion der ATPase von RIG-I und MDA5 scheint die massive Steigerung der Hydrolyse in Anwesenheit eines geeigneten Liganden einleuchtend. Da die ATP-Hydrolyse entsprechend eines Modells zur Dissoziation der gebundenen RNA dient und im Falle von RIG-I eine fehlerhafte Erkennung zelleigener RNA verhindern soll, ist klar, dass die Spaltung von ATP in Anwesenheit von RNA sehr effektiv ablaufen muss [38,45,65,129]. Dieses „alles oder nichts“-Prinzip spiegelt auch die grundsätzlichen Anforderungen an die Erkennung viraler RNA und die anschließende Aktivierung des Interferon-Systems wider. Ohne eine virale Infektion muss die Aktivierung der Signalkaskade sicher verhindert werden, während eine virale Infektion die Expression von Interferonen analog zur Hydrolyse von ATP effektiv und schnell induzieren soll.

Die ATPase Domänen von RIG-I und MDA5 werden sowohl funktionell und strukturell, als auch mechanistisch immer genauer analysiert. Die Domänen von LGP2 sind bisher deutlich weniger genau charakterisiert und zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit kann keine mechanistische Aussage zu Interaktionen zwischen der Helikase Domäne und der RD gemacht werden. Neben der Tatsache, dass die ATPase Domäne von LGP2 für seine positiv-regulatorische Eigenschaft mitverantwortlich ist, ist bekannt, dass die *in vitro* Modifikation der Fibrillenbildung von MDA5 durch LGP2 die Hydrolyse von ATP voraussetzt. Bruns et al. demonstrieren aufbauend auf der beobachteten basalen ATP-Hydrolyse, dass die basale ATPase-Aktivität von LGP2 die Erkennung eines breiteren Ligandenspektrums ermöglicht und die Affinität zu RNA weiter erhöht. Dabei konnten teilweise komplementäre RNA Stränge nur von jenen LGP2 Mutanten gebunden werden, die auch zur ligandenunabhängigen Spaltung von ATP befähigt sind [75].

Die bisher diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit sind konsistent mit der Hypothese, dass LGP2 als positiver Regulator für RIG-I und MDA5 fungieren könnte, indem virale Liganden modifiziert werden und die Erkennung erleichtert wird. Diese Hypothese wird auch von vielen weiteren der hier genannten Ergebnisse aus der Literatur bestärkt. Aus der enzymkinetischen Charakterisierung wird klar, dass sich LGP2 in der mechanistischen Funktion seiner ATPase Domäne deutlich unterscheidet und nach einem anderen Prinzip arbeitet als RIG-I und MDA5. Dem „alles oder nichts“-Prinzip der ligandenabhängigen ATP-Hydrolyse von RIG-I und MDA5 steht dabei die kontinuierliche Aktivität von LGP2 gegenüber. Auffällig ist außerdem, dass die ATP-Hydrolyse von LGP2 wie hier gezeigt durch ein sehr breites Ligandenspektrum ausgelöst werden kann. Sowohl lange, als auch sehr kurze RNA kann unabhängig jeglicher Triphosphat-Modifikation erkannt werden. Wie von Satoh et al. gezeigt, wirkt LGP2 in der RLH-abhängigen Signalkaskade *upstream* von RIG-I und MDA5 [78]. RIG-I und MDA5 benutzen Korrekturmechanismen um sehr spezifische, definierte RNA Muster zu erkennen. LGP2 hingegen bindet an verschiedenste, teilweise auch imperfekte Liganden, zeichnet sich durch die höchste RNA-Affinität unter den RLHs aus und verfügt über eine kontinuierliche, basal aktive ATPase Domäne. Es scheint daher naheliegend, dass LGP2 eine entscheidende Rolle beim ersten Schritt der Erkennung viraler Infektionen spielen muss. Als Gegenstück zu den verschiedenen viralen Mechanismen zur Antagonisierung der RLH-Signalkaskade, die im Falle von Paramyxoviridae auch die Helikase von LGP2 direkt betreffen [80,81,131], könnte LGP2 die versteckten viralen Liganden mit Hilfe seiner hohen Affinität durch Entfernung viraler Proteine und Konformationsänderungen der Nukleinsäuren für die eigentliche Erkennung nach dem „alles oder nichts“-Prinzip durch RIG-I und MDA5 zugänglich machen. Die regulatorische Domäne von LGP2 bindet ähnlich wie RIG-I an den Terminus der RNA *in vitro*. Mechanistisch ist dabei denkbar, dass LGP2 den Terminus von verpackten RNA Liganden bindet und exponiert [132]. Dabei könnte die kontinuierliche, basale ATP-Hydrolyse die notwendige

Energie bereitstellen, um das durch N-Proteine geschützte virale Genom der RNP Komplexe erkennen zu können. Die anschließende, ligandenabhängig gesteigerte ATP-Hydrolyse könnte ein Ausdruck des Verdrängens der viralen Proteine vom Genom und Komplexbildung mit RIG-I oder MDA5 sein.

4.2.5 RNPs lassen sich aus Virionen aufreinigen und aktivieren die ATPase Domäne von LGP2

Um die Frage zu beantworten, welche Strukturen physiologische Liganden der RLHs darstellen, muss auch der Lebenszyklus von RNA Viren genauer betrachtet werden. Die große Gruppe der negativ-Strang RNA Viren, zu welcher unter anderem VSV und Sendai Virus gehören, hat gemeinsam, dass ihr nacktes Genom ohne virale Proteine nicht zur Replikation befähigt ist. Erst das mit viralem N-Protein verpackte Genom ist in Form des Ribonukleoprotein Komplexes biologisch aktiv. Das RNP des negativ-Strang Virus VSV besteht lediglich aus den viralen N-, P-, und L-Proteinen und ist damit vergleichsweise einfach aufgebaut. Nach Infektion einer Zelle mit einem negativ-Strang RNA Virus ist damit das RNP das erste infektiöse Korrelat, dem die Zelle exponiert wird und somit die erste Möglichkeit, die virale Infektion zu erkennen. Zur Untersuchung der Hypothese dieser Arbeit wurden daher Ribonukleoprotein Partikel des Vesikulären Stomatitis Virus aufgereinigt.

Die ersten Versuche, RNPs aus VSV Virionen mittels physikalischer Methoden aufzureinigen, wurden bereits in den 1970er Jahren unternommen. Bekannt war, dass Virionen von behüllten negativ-Strang Viren durch Auflösen der Lipidhülle mit Hilfe eines Detergens in ihre Bestandteile zerlegt werden können [133]. Seitdem haben mehrere Autoren verschiedene Detergenzien und Lysebedingungen zur Freisetzung des RNP verwendet [124,134,135]. Für diese Arbeit wurde ein an Mebatsion et al. angelehntes Protokoll zur Aufreinigung von VSV RNPs aus Virionen verwendet [124]. Mebatsion et al. beobachten bei der Lyse von Tollwut Virus Virionen bereits bei der Verwendung von 0,05 % des Detergens Triton X-100 eine ausreichende Lyse der Virionenmembran [124]. VSV Virionen dahingegen konnten in dieser Arbeit erst ab etwa 1 % Triton X-100 ohne größere Verunreinigungen mit dem membranständigen VSV G-Protein aufgereinigt werden. Wie Pal et al. beschreiben, kann bei der Verwendung von 1 % Triton X-100 von vernachlässigbaren Verunreinigungen mit dem VSV M-Protein in der RNP Präparation ausgegangen werden. Das VSV M-Protein stellt die Verbindung zwischen der Virionenmembran und dem RNP her [135,136].

Obwohl RNP Komplexe außerordentlich resistent gegenüber physikalischen und chemischen Einflüssen sind, wurden sie vor der Verwendung für *in vitro* Experimente auf ihre Integrität untersucht [137]. In der chromatographischen Analyse zeigen sich reproduzierbar drei,

beziehungsweise bei Verwendung von Virionen aus serumhaltiger Kultur vier Absorptionsmaxima. Das zusätzliche Absorptionsmaximum ist dabei auf Serumbestandteile wie Albumin zurückzuführen. Die intakten RNPs können dabei reproduzierbar in der Fraktion unter dem ersten Absorptionsmaximum identifiziert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dieser ersten Fraktion um weitgehend intakte RNPs handelt, da diese die Matrix entsprechend des Laufverhaltens von Makromolekülen während der Größenausschlusschromatographie deutlich schneller durchlaufen, als die wesentlich kleineren Serumbestandteile in der zweiten Fraktion.

Während sich die viralen RNP Proteine in der Coomassie-Färbung anfärben lassen, gelang wegen der Größe des viralen Genoms keine zuverlässige Auftrennung und direkte Darstellung der viralen RNA mittels klassischer Gelelektrophorese. Im *Northern blot* kann das virale Genom jedoch sowohl im Virion selbst, als auch in den RNP Präparationen nachgewiesen werden. Zu berücksichtigen ist, dass die verwendete Sonde Teile der VSV P-, M- und G-Gene erkennt. Neben dem Vollängen-Genom können so DI-Genome erfasst werden, die diese Sequenzen enthalten. So lässt sich eine zweite detektierte Bande vermutlich als *deletion* DI-LT-Genom identifizieren [125]. Über mögliche weitere DI-Genomklassen in der RNP Präparation kann keine Aussage gemacht werden, da dieser von der verwendeten Sonde nicht erfasst werden. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass in den Fraktionen zwei bis vier keine viralen Sequenzabschnitte vorhanden sind, die von der eingesetzten Sonde erkannt werden konnten. Maximilian Gradel konnte außerdem zeigen, dass die erste Fraktion ein ähnliches Bandenmuster wie die native RNP Präparation aufweist und sowohl virales Vollängen-Genom als auch vermutlich *deletion* DI-LT Genom enthält.

Die so charakterisierten RNPs stellten sich als Liganden für LGP2 *in vitro* heraus und können die ATPase Domäne von LGP2 aktivieren. LGP2 scheint native RNPs trotz der von N-Proteinen geschützten RNA erkennen zu können. Die Frage nach der genauen Funktion der ATP-Hydrolyse und einer möglichen Modifikation der viralen RNPs bleibt jedoch unbeantwortet. In einem weiterführenden Versuch von Maximilian Gradel konnte durch den Einsatz der ATPase-defizienten Mutante K30A bestätigt werden, dass das umgesetzte ATP durch LGP2 und nicht durch das eingesetzte RNP an sich umgesetzt wird.

Bereits in den 1980er Jahren, lange vor der Entdeckung der RIG-I-like-Helikasen und der TLRs wurde doppelsträngige RNA in Verbindung mit der Induktion von Interferonen gebracht und gezeigt, dass das VSV N-Protein eine wichtige Rolle bei der Bildung von Interferon-induzierenden Partikeln spielt [107,138,139]. Marcus et al. stellten bereits lange vor der Erstbeschreibung von LGP2 die Hypothese auf, dass einzelne N-Proteine vom Ribonukleoprotein Komplex dissoziieren könnten und es somit an Teilen des Genoms zu internen Basenpaarungen oder Paarung mit komplementären Transkripten kommen könnte

[138]. Der Autor konnte auch bereits anhand von DI-Partikeln beobachten, dass doppelsträngige, selbst-komplementäre RNA Abschnitte effektive Interferon Induktoren darstellen [139]. Bei der von Marcus et al. vorgeschlagenen Polymerase-abhängigen Dissoziation könnte es sich vielmehr um einen aktiven, LGP2-vermittelten Prozess handeln, wodurch nach Modifikation der N-Proteine doppelsträngige Liganden für RIG-I und MDA5 entstehen.

TenOever et al. konnten schließlich nachweisen, dass VSV RNPs über die Aktivierung der Kinase TBK1 und Phosphorylierung von IRF-3 die Produktion von Interferonen und Interferon-abhängigen Faktoren direkt induzieren können. Die Autoren zeigen, dass aus Virionen aufgereinigte RNPs die Phosphorylierung von IRF-3 genau so effektiv und mit der gleichen Kinetik induzieren können, wie die Infektion mit VSV an sich. Die transfizierten RNPs zeigen dabei keine transkriptionelle Aktivität und auch eine Verunreinigung der Präparation mit funktionsfähigen Viren wurde ausgeschlossen. Um zu zeigen, dass VSV RNPs IRF-3 unabhängig von der viralen RNA-abhängigen RNA Polymerase aktivieren, wurden zusätzlich auf Basis von cDNA intrazellulär generierte RNPs verwendet, welche die Signalkaskade ebenfalls aktivieren konnten. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass intrazellulär akkumulierende RNP Komplexe durch einen unbekanntem Mechanismus zur Aktivierung von IRF-3 führten [112]. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der zitierten Arbeit war die Funktion der RLHs noch nicht beschrieben.

TenOever und Kollegen stellten darüber hinaus die Hypothese auf, dass virale N-Proteine des Masern Virus IRF-3 direkt aktivieren können. Dies wurde für das Masern Virus und Sendai Virus durch Überexpression des jeweiligen N-Proteins gezeigt [107,140]. Gleichzeitig wird jedoch erwähnt, dass bei Überexpression viraler N-Proteine diese bei hohen Konzentrationen im Zellkern akkumulieren und dort mit zellulärer RNA RNP-ähnliche Strukturen bilden können [107,141,142]. Der beobachtete Effekt könnte also auf die Akkumulation RNP-ähnlicher Strukturen als Ligand für LGP2 und darauf folgend für RIG-I oder MDA5 zurückgehen.

Schon früh wurde gezeigt, dass das virale Genom einen möglichen Liganden für RIG-I darstellt. Leppert et al. demonstrierten bereits 1978, dass sowohl das native Genom, als auch DI-Genome von Sendai Virus eine 5'-Triphosphat Modifikation besitzen [103]. Auch sind das virale Genom und Antigenom von negativ-Strang RNA Viren aufgrund Transkriptions- und Replikationspromotoren an beiden Enden partiell komplementär. Deshalb sind Basenpaarungen innerhalb des Genoms grundsätzlich möglich, wegen der starken Bindung an N-Proteine vom Virus jedoch nicht vorgesehen und gewollt [50,100]. Das nackte, einzelsträngige Genom von Viren wie Tollwut Virus, Parainfluenzavirus oder Respiratorisches Synzytial-Virus würde an sich ohne virale Proteine verschiedene Sekundärstrukturen bilden. Darunter kurze doppelsträngige, pfannenstilartige Strukturen mit Fehlpaarungen, Ringstrukturen und

Ausbuchtungen. Ohne die Bindung an N-Proteine wären diese imperfekten RNA Strukturen trotz der Fehlpaarungen gute Liganden für RIG-I, wie anhand der Kristallstruktur von RIG-I gezeigt werden konnte [45,143].

Interessant ist, dass in der Arbeit von Satoh und Kollegen das durch RIG-I erkannte Influenza-A-Virus als einziges Virus unabhängig von LGP2 erkannt wurde [78]. Eine Besonderheit von Influenza-A-Virus ist jedoch, dass die viruseigenen Proteine im Gegensatz zu anderen negativ-Strang RNA Viren nur vergleichsweise locker an das virale Genom binden [144]. Das N-Protein von VSV bildet beispielsweise eine ringartige Struktur um das Genom, welche die Basen der RNA verdeckt und so das Genom gegen Verdau durch Nukleasen schützt. Das Influenza-A-Virus N-Protein bindet lediglich das Phosphatgerüst der RNA und schützt diese nicht vor Nukleasen [99,145,146]. Auch werden Influenza-A-Stämme, deren virale Polymerase mit schwächerer Affinität an den RNP Komplex bindet, besser von RIG-I erkannt, als Wildtyp Viren [144,147]. Darüber hinaus ist das 5'-Triphosphat-Ende des Influenza Genoms relativ ungeschützt und kann durch Phosphatasen entfernt werden. Dadurch wird die RIG-I-abhängige Interferon Induktion verhindert, woraus sich schließen lässt, dass das genomische 5'-Ende von RIG-I ohne Triphosphat-Modifikation nicht erkannt werden kann [47,78]. Mechanistisch ist es daher schlüssig, dass Influenza-A-Virus eine Ausnahme als LGP2-unabhängiges Virus darstellt.

Weber et al. bekräftigten diese Hypothese durch Demonstration, dass Ribonukleoprotein Komplexe von VSV, Influenza-A-Virus und anderen negativ-Strang Viren ohne intakte Transkription RIG-I aktivieren können [102]. Diese Experimente fanden im humanen Zellsystem statt, daher könnte die beobachtete Aktivierung von RIG-I durch LGP2 vermittelt worden sein. Dabei wurde beobachtet, dass RIG-I hochmolekulare Oligomere bildet und intrazellulär mit dem N-Protein von LaCrosse Virus kolokalisiert. Um zu zeigen, dass RNPs RIG-I auch unabhängig von Kofaktoren direkt aktivieren können, wurden Experimente mit überexprimiertem RIG-I in einem *Drosophila melanogaster* Zellsystem durchgeführt. Aufgrund des verwendeten Insektenzellsystems wurde dabei jedoch nicht die eigentliche Aktivierung der RIG-I-abhängigen Signalkaskade, sondern lediglich eine Konformationsänderung und Oligomerisierung von RIG-I ausgelesen. Dabei diskutieren die Autoren auch, dass das teilweise von RIG-I erkannte Semliki forest Virus zwar eine Konformationsänderung, jedoch keine Oligomerisierung von RIG-I induziert [68,102]. Es bleibt fragwürdig, welche der beobachteten Vorgänge tatsächlich einer Aktivierung der Signalkaskade entsprechen und welche Relevanz diese Prozesse *in vivo* haben. Analog zur Aktivierung der ATPase Domäne von RIG-I durch doppelsträngige RNA ohne 5'-Triphosphat-Modifikation könnten diese Strukturen im isolierten Insektenzellsystem „stumme“ Liganden sein, die zwar einen Effekt auf RIG-I haben, jedoch die Signalkaskade nicht aktivieren können [48]. Für die Experimente im Insektenzellsystem verwendeten Weber und Kollegen fast ausschließlich das segmentierte negativ-Strang RNA

Virus Rift Tal Fieber Virus [102]. Dieses könnte ähnlich wie das segmentierte Influenza-A-Virus aufgrund seiner Nukleoproteine LGP2-unabhängig erkannt werden. Das Rift Tal Fieber Virus befällt *in vivo* hauptsächlich Wiederkäuer. *Drosophila melanogaster* Zellen werden im Vergleich zu Säugerzellen deutlich schlechter infiziert, was die Frage rechtfertigt, ob sich das Virus in Insektenzellen gleich wie in höheren Organismen verhält [148]. Während für Influenza-B-Virus schon in früheren Arbeiten eine direkte Aktivierung von RIG-I durch das RNP gezeigt wurde, schlagen Weber und Kollegen diesen Mechanismus auch für das Influenza-A-Virus vor [147,149]. Andere Autoren kamen jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen und berichten, dass eine intakte virale Transkription die Voraussetzung für die Erkennung von Influenza-A-Virus durch RIG-I ist [150]. Die von Weber und Kollegen demonstrierte, direkte Aktivierung von RIG-I durch Influenza RNPs entspricht der von Satoh et al. beobachteten LGP2-unabhängigen Erkennung von Influenza und lässt sich in das Modell der RNP-Modifikation durch LGP2 gut einfügen [78].

Die Experimente dieser Arbeit legen somit den Grundstein zur Untersuchung der Interaktion von LGP2 mit viralen RNPs. Die gezeigte RNP-abhängige ATPase Aktivierung demonstriert, dass LGP2 mit den RNPs interagiert und diese als Ligand erkennt. Die Frage nach dem exakten Mechanismus der Interaktion und einer möglichen Modifikation zur Erleichterung der Erkennung durch die anderen RLHs bleibt jedoch unbeantwortet. Weitere Experimente sind notwendig, um die Lücke zwischen der Aktivierung der ATPase Domäne von LGP2 und der Erkennung der RNPs durch RIG-I oder MDA5 zu schließen. Auch bleibt vorerst ungeklärt, welche Relevanz dieser Prozess für die Erkennung viraler Nukleinsäuren *in vivo* hat. Die oben diskutierte Literatur unterstützt die Hypothese der direkten Erkennung viraler RNPs durch die RLHs und liefert zusammen mit dieser Arbeit Hinweise auf eine Modifikation durch LGP2.

In vitro und *in vivo* Experimente haben gezeigt, dass die RLHs eine große Bandbreite verschiedener RNA Liganden erkennen und auch die strukturelle Analyse der RNA-bindenden Domänen lässt auf eine große Plastizität bei der Erkennung viraler Strukturen schließen [50]. Darauf folgend wurde eine Vielzahl viraler Intermediate vorgeschlagen, die möglicherweise Liganden von RIG-I und MDA5 darstellen könnten. Neben dem viralen Genom gehören dazu unter Anderem DI-Genome, virale mRNA, virale *leader* RNA und *leader read through* RNA [50]. Viele Autoren weisen jedoch darauf hin, dass virale RNA innerhalb der Zelle fast ständig im Komplex mit viralen und zellulären Proteinen vorliegt [102,151]. Dabei gibt es auch für andere Mustererkennungsrezeptoren wie TLR 3 Hinweise, dass an Proteine gebundene RNA gleich gut oder besser erkannt werden kann, als nackte RNA [152]. Auch existieren zwischen den durch RIG-I oder MDA5 erkannten viralen Entitäten keine klaren Grenzen, sondern vielmehr großflächige Überlappungen [69-71]. Damit ist die Frage gerechtfertigt, ob ein allgemeingültiger, für alle Viren gleicher Ligand von RIG-I, MDA5 und LGP2 existiert. In Anbetracht der verschiedenen viralen Strategien zur Umgehung der RLHs, könnten je nach

Virus auch unterschiedliche Liganden eine Rolle spielen. Diese könnten sich auch zu verschiedenen Zeitpunkten des viralen Lebenszyklus in der Zelle unterscheiden. Wie in den LGP2 *knockout* Mäusen gezeigt, scheint es auch zellspezifisch große Unterschiede bei der Rolle der einzelnen RLHs zu geben [77-79]. Die Modifikation viraler Liganden durch LGP2 könnte dabei ein wichtiger Baustein dieses komplexen Erkennungssystems sein.

4.3 Ausblick und klinische Relevanz

Diese Arbeit leistet einen Beitrag, um die Rolle der RLHs bei der Erkennung viraler Infektionen besser zu verstehen und macht einen wichtigen Schritt zur Aufklärung der Funktion der Helikase LGP2. Die Klärung der Frage, welche Strukturen physiologische Liganden für RIG-I und MDA5 darstellen, und wie diese durch LGP2 eventuell aufbereitet oder modifiziert werden könnten, ist ein wichtiger Schritt beim Verständnis der Interaktion von Viren mit dem Immunsystem.

Die klinische Relevanz der behandelten Thematik ist im Bereich der Infektiologie nahe liegend. So wird eine Großzahl an medizinisch hoch relevanten Viren wie Hepatitis-C-Virus, Influenza-A-Virus, Masern Virus oder Ebola Virus von den RIG-I-like-Helikasen erkannt [52,53,69]. Als vermuteter Regulator von RIG-I und MDA5 stellt LGP2 dabei eine wichtige Stellschraube dar, die pharmakologisch direkt ausgenutzt werden könnte. Zum Beispiel könnte die Interaktion des Paramyxovirus V-Proteins mit LGP2 ein möglicher Ansatzpunkt sein, die viralen Umgehungsmechanismen der Erkennung durch die RLHs zu unterbinden [82].

Typ-I-Interferone nehmen darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der antitumoralen Immunität, Apoptoseinduktion und Immunmodulation ein [153]. Als effektive Induktoren der Expression von Typ-I-Interferonen eignen sich die Liganden der RLHs damit als Adjuvantien zur Immun- und Tumorthherapie und bieten im Vergleich zu TLRs den Vorteil der fast ubiquitären Expression im Gewebe [154]. Ein interessanter Ansatz ist der Einsatz von siRNA, die am 5'-Terminus über eine Triphosphat-Modifikation verfügt. Durch diesen Synergismus können sowohl einzelne Gene deaktiviert und gleichzeitig RIG-I-abhängige Immunstimulation induziert werden. Poeck et al. konnten für das maligne Melanom zeigen, dass durch eine 5'-Triphosphat-siRNA-vermittelte Deaktivierung des anti-apoptotisch wirkenden Proteins Bcl2 bei gleichzeitiger RIG-I-abhängiger Immunstimulation ein deutlich gesteigerter antitumoraler Effekt eintritt [155]. Neben Bcl2 haben sich mit diesem Ansatz auch andere Zielgene als effektiv bei der Behandlung therapieresistenter Melanome erwiesen [156]. Seitdem hat diese Methode experimentelle Anwendung in der antitumoralen Therapie mehrerer Tumorentitäten gefunden. So kann durch Deaktivierung von TGF- β bei gleichzeitiger RIG-I Stimulation im murinen Pankreaskarzinom-Modell die tumorinduzierte Immunsuppression durchbrochen und

ein effektiverer therapeutischer Effekt erzielt werden [157]. Ähnliche Ergebnisse werden auch im Lungenkarzinom-Modellsystem beobachtet [158]. Interessanterweise könnte dieses System zukünftig auch bei der Therapie von Hepatitis-B-Infektionen Anwendung finden. Im Modellsystem können durch 5'-Triphosphat-siRNA, die gegen verschiedene virale Sequenzen und Transkripte gerichtet sind, vielversprechende antivirale Effekte erreicht werden [159,160].

Einen interessanten Hinweis auf direkte immunmodulatorische Eigenschaften von LGP2 hat die Arbeit von Suthar et al. gegeben [79]. Wie bereits oben erwähnt, wird in der von den Autoren erstellten LGP2 *knockout* Maus nicht nur eine positiv-regulatorische Funktion von LGP2 gezeigt, sondern auch eine wichtige Rolle von LGP2 bei der T-Zell-Regulation herausgearbeitet. So vermittelt LGP2 das Überleben und die Integrität von CD8⁺ T-Zellen und stellt auf diese Weise eine wichtige Verbindung zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem her. Durch gezielte Stimulation von LGP2 könnten so Effektor-Funktionen von T-Zellen zur Therapie viraler Infektionen ausgenutzt werden oder durch Deaktivierung des LGP2-vermittelten Überlebenssignals Autoimmunerkrankungen behandelt werden.

Auch LGP2 selbst könnte eine wichtige Rolle bei der Tumormunität spielen. In einer Arbeit von Widau et al. zeigen die Autoren eine Verknüpfung der Expression von LGP2 in Tumoren mit einer verminderten Apoptoserate nach Bestrahlung [161]. Einige der genannten Ergebnisse beruhen auf der Überexpression von LGP2 in HEK293 Zellen und müssen bezüglich ihrer physiologischen Relevanz *in vivo* hinterfragt werden. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass Tumoren zur Expression unphysiologisch hoher LGP2 Spiegel ähnlich wie nach Überexpression grundsätzlich befähigt sein könnten. Trotzdem könnte LGP2 zukünftig auch ein direktes Ziel der Tumorthherapie darstellen.

Die Aktivierung der RLHs stellt den ersten Schritt bei der Expression der für den Organismus sehr folgenreichen Typ-I-Interferone dar. Es verwundert nicht, dass Mutationen von MDA5 und RIG-I auch mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wurden. So konnten Einzelnukleotid-Polymorphismen (*short nucleotide polymorphism*, SNP) im MDA5-Gen mit einem erhöhten Risiko für Krankheiten aus dem Autoimmunbereich wie Diabetes mellitus Typ I, Systemischer Lupus erythematosus (SLE) oder dilatative Kardiomyopathie korreliert werden [162-168]. Bisher konnten auch drei Autoimmunerkrankungen identifiziert werden, an deren Pathogenese Punktmutationen der RLHs direkt beteiligt sind. Das Aicardi-Goutieres Syndrom geht auf eine erhöht Interferon Aktivität vor allem im Gehirn zurück. Dabei konnten sieben distinkte Mutationen des MDA5-Gens identifiziert werden, die durch konstitutive Aktivität oder Hypersensitivität von MDA5 gegen RNA Liganden zu einer übermäßigen Aktivierung des Interferon-Systems führen [167,169-171]. Zwei Punktmutationen im RIG-I-Gen wurden wiederum bei Patienten mit dem Singleton-Merten Syndrom identifiziert, das sich mit Zahndysplasie, Kalzifikationen der Aorta, Glaukom und Osteoporose präsentiert. Diese RIG-I

Mutanten sind konstitutiv aktiv und für die erhöhte Interferon Expression in diesen Patienten verantwortlich [167,172]. Systemischer Lupus erythematosus ist eine chronische Krankheit, die durch verschiedenartige Symptome wie Gelenkentzündungen, Hautbefall oder Befall der Nieren charakterisiert ist. Bekannt ist, dass bei diesen Patienten die Typ-I-Interferon Spiegel erhöht sind und bei therapierefraktärem Verlauf Antikörper gegen IFN- α Linderung verschaffen [167,173]. Mäuse mit einer G821S Punktmutation im MDA5-Gen zeigen einen Lupus-ähnlichen Phänotyp mit nephritischen Symptomen. Dabei sind die basalen Interferonspiegel durch eine konstitutive Aktivität erhöht, die MDA5 Mutante kann jedoch nur eingeschränkt auf virale Infektionen reagieren [167,174]. Hervorzuheben ist, dass alle beobachteten Mutationen, die mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden, die Helikase Domäne der RLHs betreffen[167]. Für LGP2 wurde bisher keine direkte Verbindung zu Autoimmunerkrankungen berichtet, im Anbetracht seiner vermutlich positiven Regulation von RIG-I und MDA5 ist ein Einfluss von LGP2 jedoch nicht auszuschließen. Außerdem stellt LGP2 durch seine positiv regulierende Wirkung auf MDA5 und RIG-I ein mögliches Ziel bei der Behandlung dieser Erkrankungen dar.

5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem ist ein höchst effektives und komplexes Netzwerk verschiedener Faktoren und ist zur Initiierung einer effektiven Immunantwort und Rekrutierung des adaptiven Immunsystems essenziell. Die Erkennung von pathogenen Strukturen in der angeborenen Immunität erfolgt dabei nach dem Prinzip der Mustererkennung, das wirtsfremde, konservierte Strukturen, sogenannte *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) als Erkennungsmerkmal von pathogenen Mikroorganismen verwendet. Bei viralen Infektionen werden zur Abwehr das Typ-I-Interferon-System sowie pro-inflammatorische Zytokine aktiviert.

Die Familie der RIG-I-like-Helikasen (RLHs) spielt bei der Erkennung viraler RNA im Zytoplasma eine entscheidende Rolle und ist essenziell zur Abwehr von Viren wie Hepatitis-C-Virus, Influenza-A-Virus und Tollwut Virus. Die beiden RLHs RIG-I und MDA5 sind in den letzten Jahren strukturell sowie funktionell eingehend charakterisiert worden. LGP2, das dritte Mitglied der RLH-Familie, weist große Homologie zu MDA5 und RIG-I auf. Im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 verfügt LGP2 jedoch nicht über sogenannte CARD-Domänen, die unabdingbar zur Signaltransduktion sind. Auch ist LGP2 bis dato nur wenig charakterisiert worden und die bisherige Literatur zur Funktion von LGP2 weist widersprüchliche Ergebnisse auf.

Studien mit *knockout* Mäusen haben gezeigt, dass LGP2 ein wichtiger Kofaktor bei der Erkennung von MDA5- und RIG-I-abhängigen Viren wie Vesikuläres Stomatitis Virus (VSV) ist, und in der Signalkaskade *upstream* von RIG-I und MDA5 wirkt. Für Ribonukleoprotein Komplexe (RNPs) von VSV wurde wiederum gezeigt, dass diese nach Transfektion die RLH-abhängige Signalkaskade aktivieren können. Im VSV RNP sind die viralen Erkennungsmuster für RIG-I, insbesondere die 5'-Triphosphatmodifikation, jedoch durch virale N-Proteine verdeckt. LGP2 könnte die an die virale RNA gebundenen viralen Proteine verschieben oder anderweitig modifizieren und so die Mustererkennung durch RIG-I und MDA5 ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit untersuchte nun, welche Funktionen die Helikase LGP2 hat und welche Strukturen von ihr erkannt werden.

Nach Depletierung von LGP2 mittels siRNA konnte im humanen Zellsystem gezeigt werden, dass LGP2 die Erkennung von RIG-I- und MDA5-abhängigen Liganden positiv modifiziert, jedoch zur Erkennung nicht unabdingbar ist. Dabei zeigt sich in Abwesenheit von LGP2 nach Stimulation eine stark verminderte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine. Im gleichen Zellsystem wurde ein stimulationsabhängiger Komplex beobachtet, in welchem sich LGP2 und RIG-I nachweisen lassen. LGP2 durchläuft außerdem Stimulus-abhängig eine

Konformationsänderung und bildet hochmolekulare Homo-Oligomere. Dies lässt vermuten, dass sich die modifizierende Funktion von LGP2 in Form eines Multiproteinkomplexes manifestiert.

Die weitere Charakterisierung des Liganden von LGP2 erfolgte *in vitro*. Ein 10 Basenpaare umfassendes, doppelsträngiges Oligonukleotid ist zur Aktivierung der ATPase Domäne von rekombinantem LGP2 ausreichend. Dabei spielt eine 5'-Triphosphat-Modifikation keine Rolle. Für MDA5 ist zur Aktivierung der ATPase Domäne wiederum eine mindestens 100 bis 150 Basenpaarungen enthaltende RNA notwendig. Analog zu RIG-I bestätigt sich damit, dass die ATPase Domäne von MDA5 zur Aktivierung *in vitro* geringere Anforderungen an den RNA Liganden stellt, konkret ein kürzerer Ligand ausreicht, als zur Aktivierung der MDA5-abhängigen Signalkaskade *in vivo* notwendig ist. Die funktionellen Unterschiede zwischen LGP2, RIG-I und MDA5 verdeutlichen sich beim Blick auf die enzymkinetischen Eigenschaften der einzelnen Helikasen. So lässt sich die ATP Hydrolyse Aktivität von LGP2 durch einen Liganden nur mäßig steigern, ist jedoch basal konstitutiv aktiv. Im Gegensatz dazu zeigen MDA5 und RIG-I kaum basale ATPase Aktivität, ligandenabhängig lässt sich diese jedoch stark induzieren.

Um zu untersuchen, ob virale Ribonukleoprotein Komplexe einen möglichen Liganden für LGP2 darstellen, wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von VSV RNPs etabliert. Dabei wird gezeigt, dass RNPs mit großer Reinheit und strukturell intakt aufgereinigt werden können. Diese RNPs können *in vitro* die ATPase Domäne von LGP2 aktivieren. Damit wird ein erster Anhaltspunkt geschaffen, dass RNPs der LGP2-abhängigen Erkennung unterliegen könnten und die Grundlage zur weiteren Charakterisierung der Interaktion viraler RNPs mit LGP2 gelegt.

In Summe deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit somit darauf hin, dass LGP2 im Sinne einer positiven Regulation die Erkennung viraler RNPs durch RIG-I und MDA5 ermöglicht. Die gewonnenen Erkenntnisse zur Funktion und dem Zusammenspiel der RLHs könnten bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen oder der Entwicklung immuntherapeutischer und antiinfektiöser Therapieansätze genutzt werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Murphy K, Travers P, Walport M, Janeway C. Janeway's immunobiology. 8th Edition ed. New York: Garland Science; 2012.
2. Pichlmair A, Kandasamy K, Alvisi G, Mulhern O, Sacco R, Habjan M, Binder M, Stefanovic A, Eberle CA, Goncalves A, Burckstummer T, Muller AC, Fauster A, Holze C, Lindsten K, Goodbourn S, Kochs G, Weber F, Bartenschlager R, Bowie AG, Bennett KL, Colinge J, Superti-Furga G. Viral immune modulators perturb the human molecular network by common and unique strategies. *Nature* 2012;487:486-90.
3. Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
4. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006;124:783-801.
5. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
6. Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009;85:143-56.
7. Janeway CA, Jr., Goodnow CC, Medzhitov R. Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance. *Current biology : CB* 1996;6:519-22.
8. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
9. Gerlier D, Lyles DS. Interplay between innate immunity and negative-strand RNA viruses: towards a rational model. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011;75:468-90, second page of table of contents.
10. Chan YK, Gack MU. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat Rev Microbiol* 2016;14:360-73.
11. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
12. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-76.
13. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2014;7:a016246.
14. Wen H, Miao EA, Ting JP. Mechanisms of NOD-like receptor-associated inflammasome activation. *Immunity* 2013;39:432-41.
15. Shrivastava G, Leon-Juarez M, Garcia-Cordero J, Meza-Sanchez DE, Cedillo-Barron L. Inflammasomes and its importance in viral infections. *Immunol Res* 2016;64:1101-17.
16. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013;339:786-91.
17. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Rohl I, Hopfner KP, Ludwig J, Hornung V. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013;498:380-4.
18. Ablasser A, Gulen MF. The role of cGAS in innate immunity and beyond. *J Mol Med (Berl)* 2016;94:1085-93.
19. Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 2013;152:276-89.
20. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M, Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:582-7.
21. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *Journal of virology* 2006;80:12332-42.
22. Barral PM, Sarkar D, Su ZZ, Barber GN, DeSalle R, Racaniello VR, Fisher PB. Functions of the cytoplasmic RNA sensors RIG-I and MDA-5: key regulators of innate immunity. *Pharmacol Ther* 2009;124:219-34.

23. Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2015;32:48-53.
24. Schmidt A, Endres S, Rothenfusser S. Pattern recognition of viral nucleic acids by RIG-I-like helicases. *J Mol Med (Berl)* 2011;89:5-12.
25. Sun YW. RIG-I, a Human Homolog Gene of RNA Helicase, is Induced by Retinoic Acid During the Differentiation of Acute Promyelocytic Leukemia Cell. *Shanghai Second Medical University, Shanghai* 1997.
26. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol* 2004;5:730-7.
27. Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, Brzozka K, Lammens A, Lammens K, Fujita T, Conzelmann KK, Krug A, Hopfner KP. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 2008;29:169-79.
28. Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 2011;147:409-22.
29. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo j* 1982;1:945-51.
30. Fujita T, Onoguchi K, Onomoto K, Hirai R, Yoneyama M. Triggering antiviral response by RIG-I-related RNA helicases. *Biochimie* 2007;89:754-60.
31. Kolakofsky D, Kowalinski E, Cusack S. A structure-based model of RIG-I activation. *RNA* 2012;18:2118-27.
32. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, Gerlier D, Cusack S. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 2011;147:423-35.
33. Zheng J, Yong HY, Panutdaporn N, Liu C, Tang K, Luo D. High-resolution HDX-MS reveals distinct mechanisms of RNA recognition and activation by RIG-I and MDA5. *Nucleic acids research* 2015;43:1216-30.
34. Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang GQ, Gale M, Jr., Patel SS, Marcotrigiano J. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* 2011;479:423-7.
35. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005;122:669-82.
36. Myong S, Cui S, Cornish PV, Kirchhofer A, Gack MU, Jung JU, Hopfner KP, Ha T. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science* 2009;323:1070-4.
37. Peisley A, Wu B, Yao H, Walz T, Hur S. RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner. *Mol Cell* 2013;51:573-83.
38. Peisley A, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Liu M, Walz T, Hur S. Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:21010-5.
39. Patel JR, Jain A, Chou YY, Baum A, Ha T, Garcia-Sastre A. ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Rep* 2013;14:780-7.
40. Civril F, Bennett M, Moldt M, Deimling T, Witte G, Schiesser S, Carell T, Hopfner KP. The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep* 2011;12:1127-34.
41. Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007;446:916-20.
42. Kell AM, Gale M, Jr. RIG-I in RNA virus recognition. *Virology* 2015;479-480:110-21.

43. Bamming D, Horvath CM. Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:9700-12.
44. Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, Shi M, Wong LY, Iwai K, Jung JU. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Mol Cell* 2011;41:354-65.
45. Rawling DC, Fitzgerald ME, Pyle AM. Establishing the role of ATP for the function of the RIG-I innate immune sensor. *Elife* 2015;4.
46. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
47. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, Reis e Sousa C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006;314:997-1001.
48. Schmidt A, Schwerd T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009;106:12067-72.
49. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schubert C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014;514:372-5.
50. Barik S. What Really Rigs Up RIG-I? *J Innate Immun* 2016;8:429-36.
51. Schnell G, Loo YM, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I. *PLoS Pathog* 2012;8:e1002839.
52. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
53. Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011;34:680-92.
54. Hei L, Zhong J. LGP2 plays an essential role in HCV infection-induced interferon responses. *Hepatology* 2017.
55. Kang DC, Gopalkrishnan RV, Wu Q, Jankowsky E, Pyle AM, Fisher PB. mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:637-42.
56. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology* 2005;175:2851-8.
57. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, Hiiragi A, Dermody TS, Fujita T, Akira S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* 2008;205:1601-10.
58. Roers A, Hiller B, Hornung V. Recognition of Endogenous Nucleic Acids by the Innate Immune System. *Immunity* 2016;44:739-54.
59. Grunberg-Manago M, Oritz PJ, Ochoa S. Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science* 1955;122:907-10.
60. Peisley A, Jo MH, Lin C, Wu B, Orme-Johnson M, Walz T, Hohng S, Hur S. Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012;109:E3340-9.
61. Takahashi K, Kumeta H, Tsuduki N, Narita R, Shigemoto T, Hirai R, Yoneyama M, Horiuchi M, Ogura K, Fujita T, Inagaki F. Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5

- and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:17465-74.
62. Wu B, Hur S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr Opin Virol* 2015;12:91-8.
63. del Toro Duany Y, Wu B, Hur S. MDA5-filament, dynamics and disease. *Curr Opin Virol* 2015;12:20-5.
64. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Rehwinkel J, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Way M, Schiavo G, Reis e Sousa C. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *Journal of virology* 2009;83:10761-9.
65. Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 2015;74:198-206.
66. Feng Q, Hato SV, Langereis MA, Zoll J, Virgen-Slane R, Peisley A, Hur S, Semler BL, van Rij RP, van Kuppeveld FJ. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. *Cell Rep* 2012;2:1187-96.
67. Gitlin L, Benoit L, Song C, Cella M, Gilfillan S, Holtzman MJ, Colonna M. Melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5) is involved in the innate immune response to Paramyxoviridae infection in vivo. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000734.
68. Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Kaufman RJ, Reis e Sousa C. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* 2010;7:354-61.
69. Loo YM, Fornek J, Crochet N, Bajwa G, Perwitasari O, Martinez-Sobrido L, Akira S, Gill MA, Garcia-Sastre A, Katze MG, Gale M, Jr. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *Journal of virology* 2008;82:335-45.
70. Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M, Jr. Establishment and maintenance of the innate antiviral response to West Nile Virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. *Journal of virology* 2008;82:609-16.
71. Triantafilou K, Vakakis E, Kar S, Richer E, Evans GL, Triantafilou M. Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses. *J Cell Sci* 2012;125:4761-9.
72. Cui Y, Li M, Walton KD, Sun K, Hanover JA, Furth PA, Hennighausen L. The Stat3/5 locus encodes novel endoplasmic reticulum and helicase-like proteins that are preferentially expressed in normal and neoplastic mammary tissue. *Genomics* 2001;78:129-34.
73. Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, Kirchofer A, Lammens K, Lammens A, Schmidt A, Rothenfusser S, Hopfner KP. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic acids research* 2009;37:2014-25.
74. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *Journal of immunology* 2005;175:5260-8.
75. Bruns AM, Pollpeter D, Hadizadeh N, Myong S, Marko JF, Horvath CM. ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2). *The Journal of biological chemistry* 2013;288:938-46.
76. Komuro A, Bamming D, Horvath CM. Negative regulation of cytoplasmic RNA-mediated antiviral signaling. *Cytokine* 2008;43:350-8.
77. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *Journal of immunology* 2007;178:6444-55.
78. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, Tsujimura T, Fujita T, Akira S, Takeuchi O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:1512-7.
79. Suthar MS, Ramos HJ, Brassil MM, Netland J, Chappell CP, Blahnik G, McMillan A, Diamond MS, Clark EA, Bevan MJ, Gale M, Jr. The RIG-I-like receptor LGP2 controls CD8(+) T cell survival and fitness. *Immunity* 2012;37:235-48.

80. Parisien JP, Bamming D, Komuro A, Ramachandran A, Rodriguez JJ, Barber G, Wojahn RD, Horvath CM. A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2. *Journal of virology* 2009;83:7252-60.
81. Childs K, Randall R, Goodbourn S. Paramyxovirus V proteins interact with the RNA Helicase LGP2 to inhibit RIG-I-dependent interferon induction. *Journal of virology* 2012;86:3411-21.
82. Rodriguez KR, Horvath CM. Paramyxovirus V protein interaction with the antiviral sensor LGP2 disrupts MDA5 signaling enhancement but is not relevant to LGP2-mediated RLR signaling inhibition. *Journal of virology* 2014;88:8180-8.
83. Bruns AM, Leser GP, Lamb RA, Horvath CM. The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly. *Mol Cell* 2014;55:771-81.
84. Rodriguez KR, Bruns AM, Horvath CM. MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *Journal of virology* 2014;88:8194-200.
85. Kim N, Now H, Nguyen NT, Yoo JY. Multilayered regulations of RIG-I in the antiviral signaling pathway. *J Microbiol* 2016;54:583-7.
86. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011;146:448-61.
87. Moresco EM, Vine DL, Beutler B. Prion-like behavior of MAVS in RIG-I signaling. *Cell Res* 2011;21:1643-5.
88. Vazquez C, Horner SM. MAVS Coordination of Antiviral Innate Immunity. *Journal of virology* 2015;89:6974-7.
89. Sohn J, Hur S. Filament assemblies in foreign nucleic acid sensors. *Curr Opin Struct Biol* 2016;37:134-44.
90. Sanchez David RY, Combredet C, Sismeiro O, Dillies MA, Jagla B, Coppee JY, Mura M, Guerbois Galla M, Despres P, Tangy F, Komarova AV. Comparative analysis of viral RNA signatures on different RIG-I-like receptors. *Elife* 2016;5:e11275.
91. Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, Sun L, Chen ZJ. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* 2013;2:e00785.
92. Kawai T, Takahashi K, Sato S, Coban C, Kumar H, Kato H, Ishii KJ, Takeuchi O, Akira S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-8.
93. Vilcek J. Novel interferons. *Nat Immunol* 2003;4:8-9.
94. Murira A, Lamarre A. Type-I Interferon Responses: From Friend to Foe in the Battle against Chronic Viral Infection. *Front Immunol* 2016;7:609.
95. Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. *Nat Immunol* 2003;4:69-77.
96. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
97. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010;207:2053-63.
98. Sadler AJ, Williams BRG. Interferon-inducible antiviral effectors. *Nature Reviews Immunology* 2008;8:559-68.
99. Ruigrok RW, Crepin T, Kolakofsky D. Nucleoproteins and nucleocapsids of negative-strand RNA viruses. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:504-10.
100. Banerjee AK, Barik S, De BP. Gene expression of nonsegmented negative strand RNA viruses. *Pharmacol Ther* 1991;51:47-70.
101. Green TJ, Zhang X, Wertz GW, Luo M. Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 2006;313:357-60.
102. Weber M, Gawanbacht A, Habjan M, Rang A, Borner C, Schmidt AM, Veitinger S, Jacob R, Devignot S, Kochs G, Garcia-Sastre A, Weber F. Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling. *Cell Host Microbe* 2013;13:336-46.
103. Leppert M, Kolakofsky D. 5' Terminus of defective and nondefective Sendai viral genomes is ppp Ap. *Journal of virology* 1978;25:427-32.

104. Habjan M, Andersson I, Klingstrom J, Schumann M, Martin A, Zimmermann P, Wagner V, Pichlmair A, Schneider U, Muhlberger E, Mirazimi A, Weber F. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS one* 2008;3:e2032.
105. Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:16303-8.
106. Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, Schulz O, Pichlmair A, Bier K, Robb N, Vreede F, Barclay W, Fodor E, Reis e Sousa C. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell* 2010;140:397-408.
107. tenOever BR, Servant MJ, Grandvaux N, Lin R, Hiscott J. Recognition of the Measles Virus Nucleocapsid as a Mechanism of IRF-3 Activation. *Journal of virology* 2002;76:3659-69.
108. Strahle L, Garcin D, Kolakofsky D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology* 2006;351:101-11.
109. Pattnaik AK, Ball LA, LeGrone A, Wertz GW. The termini of VSV DI particle RNAs are sufficient to signal RNA encapsidation, replication, and budding to generate infectious particles. *Virology* 1995;206:760-4.
110. Sarkar A, Chattopadhyay S, Cox R, Luo M, Banerjee AK. Structural and functional properties of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex as revealed by proteolytic digestion. *Virology* 2010;401:61-9.
111. Stojdl DF, Lichty BD, tenOever BR, Paterson JM, Power AT, Knowles S, Marius R, Reynard J, Poliquin L, Atkins H, Brown EG, Durbin RK, Durbin JE, Hiscott J, Bell JC. VSV strains with defects in their ability to shutdown innate immunity are potent systemic anti-cancer agents. *Cancer Cell* 2003;4:263-75.
112. tenOever BR, Sharma S, Zou W, Sun Q, Grandvaux N, Julkunen I, Hemmi H, Yamamoto M, Akira S, Yeh WC, Lin R, Hiscott J. Activation of TBK1 and IKKvarepsilon kinases by vesicular stomatitis virus infection and the role of viral ribonucleoprotein in the development of interferon antiviral immunity. *Journal of virology* 2004;78:10636-49.
113. Motz C, Schuhmann KM, Kirchhofer A, Moldt M, Witte G, Conzelmann KK, Hopfner KP. Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling. *Science* 2013;339:690-3.
114. Ahmed M, McKenzie MO, Puckett S, Hojnacki M, Poliquin L, Lyles DS. Ability of the Matrix Protein of Vesicular Stomatitis Virus To Suppress Beta Interferon Gene Expression Is Genetically Correlated with the Inhibition of Host RNA and Protein Synthesis. *Journal of virology* 2003;77:4646-57.
115. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem* 2015;59:1-41.
116. Eisenthal R, Danson MJ, Hough DW. Catalytic efficiency and kcat/KM: a useful comparator? *Trends Biotechnol* 2007;25:247-9.
117. De La Cruz EM, Michael Ostap E. Chapter 6 Kinetic and Equilibrium Analysis of the Myosin ATPase. 2009;455:157-92.
118. Nikonov A, Molder T, Sikut R, Kiiver K, Mannik A, Toots U, Lulla A, Lulla V, Utt A, Merits A, Ustav M. RIG-I and MDA-5 detection of viral RNA-dependent RNA polymerase activity restricts positive-strand RNA virus replication. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003610.
119. Sung PS, Hong S-H, Lee J, Park S-H, Yoon SK, Chung WJ, Shin E-C. CXCL10 is produced in hepatitis A virus-infected cells in an IRF3-dependent but IFN-independent manner. *Scientific Reports* 2017;7:6387.
120. Brownell J, Bruckner J, Wagoner J, Thomas E, Loo YM, Gale M, Jr., Liang TJ, Polyak SJ. Direct, interferon-independent activation of the CXCL10 promoter by NF-kappaB and interferon regulatory factor 3 during hepatitis C virus infection. *Journal of virology* 2014;88:1582-90.
121. Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009;31:25-34.

122. Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, Hirai R, Kumeta H, Narita R, Gale M, Jr., Inagaki F, Fujita T. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008;29:428-40.
123. Peisley A, Wu B, Xu H, Chen ZJ, Hur S. Structural basis for ubiquitin-mediated antiviral signal activation by RIG-I. *Nature* 2014;509:110-4.
124. Mebatsion T, Weiland F, Conzelmann KK. Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Journal of virology* 1999;73:242-50.
125. Meier E, Harmison GG, Keene JD, Schubert M. Sites of copy choice replication involved in generation of vesicular stomatitis virus defective-interfering particle RNAs. *Journal of virology* 1984;51:515-21.
126. Murali A, Li X, Ranjith-Kumar CT, Bhardwaj K, Holzenburg A, Li P, Kao CC. Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:15825-33.
127. Uchikawa E, Lethier M, Malet H, Brunel J, Gerlier D, Cusack S. Structural Analysis of dsRNA Binding to Anti-viral Pattern Recognition Receptors LGP2 and MDA5. *Mol Cell* 2016;62:586-602.
128. Moresco EM, Beutler B. LGP2: positive about viral sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:1261-2.
129. Berke IC, Modis Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J* 2012;31:1714-26.
130. Kohlway A, Luo D, Rawling DC, Ding SC, Pyle AM. Defining the functional determinants for RNA surveillance by RIG-I. *EMBO Rep* 2013;14:772-9.
131. Rodriguez KR, Horvath CM. Amino acid requirements for MDA5 and LGP2 recognition by paramyxovirus V proteins: a single arginine distinguishes MDA5 from RIG-I. *Journal of virology* 2013;87:2974-8.
132. Li X, Ranjith-Kumar CT, Brooks MT, Dharmaiah S, Herr AB, Kao C, Li P. The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:13881-91.
133. Cartwright B, Smale CJ, Brown F. Dissection of vesicular stomatitis virus into the infective ribonucleoprotein and immunizing components. *J Gen Virol* 1970;7:19-32.
134. Moyer SA, Smallwood-Kentro S, Haddad A, Prevec L. Assembly and transcription of synthetic vesicular stomatitis virus nucleocapsids. *Journal of virology* 1991;65:2170-8.
135. Pal R, Grinnell BW, Snyder RM, Wagner RR. Regulation of viral transcription by the matrix protein of vesicular stomatitis virus probed by monoclonal antibodies and temperature-sensitive mutants. *Journal of virology* 1985;56:386-94.
136. Newcomb WW, Brown JC. Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions. *Journal of virology* 1981;39:295-9.
137. Conzelmann KK. Nonsegmented negative-strand RNA viruses: genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 1998;32:123-62.
138. Marcus PI, Sekellick MJ. Interferon induction by viruses. III. Vesicular stomatitis virus: interferon-inducing particle activity requires partial transcription of gene N. *J Gen Virol* 1980;47:89-96.
139. Marcus PI, Sekellick MJ. Defective interfering particles with covalently linked [+/-]RNA induce interferon. *Nature* 1977;266:815-9.
140. Servant MJ, Grandvaux N, tenOever BR, Duguay D, Lin R, Hiscott J. Identification of the minimal phosphoacceptor site required for in vivo activation of interferon regulatory factor 3 in response to virus and double-stranded RNA. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:9441-7.
141. Fooks AR, Schadeck E, Liebert UG, Dowsett AB, Rima BK, Steward M, Stephenson JR, Wilkinson GW. High-level expression of the measles virus nucleocapsid protein by using a replication-deficient adenovirus vector: induction of an MHC-I-restricted CTL response and protection in a murine model. *Virology* 1995;210:456-65.
142. Spohner D, Drillien R, Howley PM. The assembly of the measles virus nucleoprotein into nucleocapsid-like particles is modulated by the phosphoprotein. *Virology* 1997;232:260-8.

143. Luo D, Kohlway A, Vela A, Pyle AM. Visualizing the determinants of viral RNA recognition by innate immune sensor RIG-I. *Structure* 2012;20:1983-8.
144. Weber F. The catcher in the RIG-I. *Cytokine* 2015;76:38-41.
145. Portela A, Digard P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* 2002;83:723-34.
146. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RW. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo j* 1994;13:3158-65.
147. Weber M, Sediri H, Felgenhauer U, Binzen I, Banfer S, Jacob R, Brunotte L, Garcia-Sastre A, Schmid-Burgk JL, Schmidt T, Hornung V, Kochs G, Schwemmler M, Klenk HD, Weber F. Influenza virus adaptation PB2-627K modulates nucleocapsid inhibition by the pathogen sensor RIG-I. *Cell Host Microbe* 2015;17:309-19.
148. Kortekaas J, Oreshkova N, Cobos-Jimenez V, Vloet RP, Potgieter CA, Moormann RJ. Creation of a nonspreading Rift Valley fever virus. *Journal of virology* 2011;85:12622-30.
149. Osterlund P, Strengell M, Sarin LP, Poranen MM, Fagerlund R, Melen K, Julkunen I. Incoming influenza A virus evades early host recognition, while influenza B virus induces interferon expression directly upon entry. *Journal of virology* 2012;86:11183-93.
150. Killip MJ, Smith M, Jackson D, Randall RE. Activation of the interferon induction cascade by influenza A viruses requires viral RNA synthesis and nuclear export. *Journal of virology* 2014;88:3942-52.
151. Baum A, Garcia-Sastre A. Differential recognition of viral RNA by RIG-I. *Virulence* 2011;2:166-9.
152. Lai Y, Yi G, Chen A, Bhardwaj K, Tragesser BJ, Rodrigo AV, Zlotnick A, Mukhopadhyay S, Ranjith-Kumar CT, Kao CC. Viral double-strand RNA-binding proteins can enhance innate immune signaling by toll-like Receptor 3. *PloS one* 2011;6:e25837.
153. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, Diamond MS, Koebel CM, Arthur C, White JM, Schreiber RD. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol* 2005;6:722-9.
154. Schnurr M, Duewell P. Breaking tumor-induced immunosuppression with 5' - triphosphate siRNA silencing TGF β and activating RIG-I. *Oncology* 2013;2:e24170.
155. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, et al. 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and RIG-I activation against melanoma. *Nat Med* 2008;14:1256-63.
156. Matheis F, Heppt MV, Graf SA, Düwell P, Kammerbauer C, Aigner A, Besch R, Berking C. A Bifunctional Approach of Immunostimulation and uPAR Inhibition Shows Potent Antitumor Activity in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 2016;136:2475-84.
157. Ellermeier J, Wei J, Duewell P, Hoves S, Stieg MR, Adunka T, Noerenberg D, Anders HJ, Mayr D, Poeck H, Hartmann G, Endres S, Schnurr M. Therapeutic efficacy of bifunctional siRNA combining TGF-beta1 silencing with RIG-I activation in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2013;73:1709-20.
158. Wang K, Chen X, Yan F, Xing Y, Yang X, Tu J, Chen Z. 5'-triphosphate-siRNA against survivin gene induces interferon production and inhibits proliferation of lung cancer cells in vitro. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)* 2013;36:294-304.
159. Ebert G, Poeck H, Lucifora J, Baschuk N, Esser K, Esposito I, Hartmann G, Protzer U. 5' Triphosphorylated small interfering RNAs control replication of hepatitis B virus and induce an interferon response in human liver cells and mice. *Gastroenterology* 2011;141:696-706. ,e1-3.
160. Chen X, Qian Y, Yan F, Tu J, Yang X, Xing Y, Chen Z. 5'-triphosphate-siRNA activates RIG-I-dependent type I interferon production and enhances inhibition of hepatitis B virus replication in HepG2.2.15 cells. *European journal of pharmacology* 2013;721:86-95.
161. Widau RC, Parekh AD, Ranck MC, Golden DW, Kumar KA, Sood RF, Pitroda SP, Liao Z, Huang X, Darga TE, Xu D, Huang L, Andrade J, Roizman B, Weichselbaum RR, Khodarev NN. RIG-I-like receptor LGP2 protects tumor cells from ionizing radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2014;111:E484-91.

162. Varzari A, Bruch K, Deyneko IV, Chan A, Epplen JT, Hoffjan S. Analysis of polymorphisms in RIG-I-like receptor genes in German multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology* 2014;277:140-4.
163. Dou Q, Peng Y, Zhou B, Lin J, Li Y, Yang H, Xie Q, Li C, Zhang L, Rao L. Association of innate immune IFIH1 gene polymorphisms with dilated cardiomyopathy in a Chinese population. *Immunological Investigations* 2014;43:627-37.
164. Nejentsev S, Walker N, Riches D, Egholm M, Todd JA. Rare Variants of IFIH1, a Gene Implicated in Antiviral Responses, Protect Against Type 1 Diabetes. *Science* 2009;324:387-9.
165. Ferreira RC, Guo H, Coulson RMR, Smyth DJ, Pekalski ML, Burren OS, Cutler AJ, Doecke JD, Flint S, McKinney EF, Lyons PA, Smith KGC, Achenbach P, Beyerlein A, Dunger DB, Clayton DG, Wicker LS, Todd JA, Bonifacio E, Wallace C, Ziegler A-G. A Type I Interferon Transcriptional Signature Precedes Autoimmunity in Children Genetically at Risk for Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2014;63:2538-50.
166. Zouk H, Marchand L, Li Q, Polychronakos C. Functional characterization of the Thr946Ala SNP at the type 1 diabetes IFIH1 locus. *Autoimmunity* 2014;47:40-5.
167. Kato H, Fujita T. RIG-I-like receptors and autoimmune diseases. *Curr Opin Immunol* 2015;37:40-5.
168. Robinson T, Kariuki SN, Franek BS, Kumabe M, Kumar AA, Badaracco M, Mikolaitis RA, Guerrero G, Utset TO, Drevlow BE, Zaacks LS, Grober JS, Cohen LM, Kirou KA, Crow MK, Jolly M, Niewold TB. Autoimmune disease risk variant of IFIH1 is associated with increased sensitivity to IFN-alpha and serologic autoimmunity in lupus patients. *Journal of immunology* 2011;187:1298-303.
169. Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, Nishikomori R, Funatsuka M, Ohshima Y, Sugawara Y, Yasumi T, Kato H, Shirai T, Ohara O, Fujita T, Heike T. Aicardi-Goutieres Syndrome Is Caused by IFIH1 Mutations. *The American Journal of Human Genetics* 2014;95:121-5.
170. Rice GI, del Toro Duany Y, Jenkinson EM, et al. Gain-of-function mutations in IFIH1 cause a spectrum of human disease phenotypes associated with upregulated type I interferon signaling. *Nat Genet* 2014;46:503-9.
171. Crow YJ, Rehwinkel J. Aicardi-Goutières syndrome and related phenotypes: linking nucleic acid metabolism with autoimmunity. *Human Molecular Genetics* 2009;18:R130-R6.
172. Jang M-A, Kim Eun K, Now H, Nguyen Nhung TH, Kim W-J, Yoo J-Y, Lee J, Jeong Y-M, Kim C-H, Kim O-H, Sohn S, Nam S-H, Hong Y, Lee Yong S, Chang S-A, Jang Shin Y, Kim J-W, Lee M-S, Lim So Y, Sung K-S, Park K-T, Kim Byoung J, Lee J-H, Kim D-K, Kee C, Ki C-S. Mutations in DDX58, which Encodes RIG-I, Cause Atypical Singleton-Merten Syndrome. *The American Journal of Human Genetics* 2015;96:266-74.
173. Mohan C, Putterman C. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2015;11:329-41.
174. Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, Minowa O, Yoshida A, Deguchi K, Sato H, Ito S, Shiroishi T, Takeyasu K, Noda T, Fujita T. Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5. *Immunity* 2014;40:199-212.

7 Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
ADP	Adenosin Diphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CpG	Oligonucleotide mit Cytosine-(phosphate)-Guanine Gruppen
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTPs	Desoxyribonukeosidtriphosphate
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMCV	Enzephalomyokarditis Virus
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
GMEM	<i>Glasgow Minimum Essential Medium</i>
GMP-AMP	Guanosin Monophosphat – Adenosin Monophosphat
HA	Hämagglutinin
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK293 Zellen	<i>Human embryonic kidney 293 Zellen</i>
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IGFBP2	<i>Insulin-like growth factor binding protein 2</i>
IL	Interleukin
IP10	<i>Interferon-gamma induced protein 10</i>
IRF-3	<i>IFN regulatory factor 3</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
IVT	<i>in vitro</i> transkribiert

JAK	Janus Kinase
kDa	Kilo Dalton
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology-2</i>
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucin-rich region</i>
MAVS	<i>Mitochondrial-antiviral-signaling Protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblast</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger RNA
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NK Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptor
ns	nicht signifikant
OH	Hydroxylgruppe
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Poly(I:C) / pI:C	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
ppp	Triphosphat-Gruppe
PRR	<i>Pathoge- recognition</i> Rezeptor
qRT-PCR	Quantitative <i>real-time</i> Polymerase Kettenreaktion
RD	Regulatorische Domäne
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene-I</i>
RLH	RIG-I-like-Helikasen
RNA	Ribonukleinsäure
RNPs	Ribonukleoprotein Komplexe
rpm	<i>revolutions per minute</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate</i> -Polyacrylamid Gelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SFV	Semiliki <i>forest</i> Virus
siRNA	<i>Small-interfering</i> RNA
SLE	Systemischer Lupus erythematosus

SNP	<i>short nucleotide polymorphism</i>
ss	einzelsträngig
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
STING	<i>Stimulator of interferon genes</i>
Tab.	Tabelle
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TCID50	<i>50 % tissue culture infective dose</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
% w/v	Gewicht pro Volumen

8 Präsentationen und Poster

8.1 Vorträge

Modulation of virus recognition by the innate RNA receptor LGP-2

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2014, Bonn

Modulation of virus recognition by LGP-2

8th Annual Retreat, Graduiertenkolleg 1202 der DFG, Ohlstadt, Juni 2013

Modulation of virus recognition by the RNA helicase Lgp2

Immunology course engadina „ICE-School“, Bos-Cha, Schweiz, März 2012

8.2 Posterpräsentationen

Raps J., Gradel M., Rädler J., Pandey D., Schmidt A., Rothenfusser S.

Modulation of virus recognition by the innate RNA receptor LGP-2,

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2014, Bonn

Raps J., Gradel M., Rothenfusser S., Schmidt A.

Viral ribonucleoprotein particles are recognized by LGP2,

LMU-Harvard Young Scientists' Forum "From Molecules to Organism V", Juli 2013, München

Raps J., Gradel M., Rädler J., Pandey D., Schmidt A., Rothenfusser S.

Modulation of virus recognition by the innate RNA receptor LGP

First International Symposium "Immunofest", Graduiertenkolleg 1202 der DFG, September 2014, München

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Simon Rothenfusser, der mich mit seiner Begeisterung für die Wissenschaft kontinuierlich auf höchstem Niveau betreut und gefördert hat. Die familiäre und freundliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe hat mich sowohl wissenschaftlich als auch persönlich sehr inspiriert und motiviert. Meinem betreuenden Post-Doc Dr. Andreas Schmidt danke ich für seine Mühe bei der Organisation und Etablierung dieses Projekts. Mit hervorragender Expertise hat er mich wissenschaftlich und methodisch angeleitet und durch zahlreiche Ideen und Hilfestellungen unterstützt.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Stefan Endres für sein hervorragendes Engagement bei der Ausbildung und Förderung von jungen Wissenschaftlern. Die von ihm geschaffenen Rahmenbedingungen haben die Arbeit in der *Abteilung für Klinische Pharmakologie* zu einem prägenden und unvergleichlichen Erlebnis gemacht, von dem ich sehr profitiert habe.

Durch sein wissenschaftliches Rahmenprogramm und finanzielle Förderung hat das Förderprogramm für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU München einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet.

Grundlegend für den Erfolg dieser Arbeit war die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner. Besonders bei Manuela Moldt möchte ich mich für die kontinuierliche Hilfe und geduldige Anleitung bedanken. Außerdem bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann, insbesondere bei Konstantin Sparrer, für die methodische und inhaltliche Unterstützung.

Meinen Mitdoktoranden danke ich für die freundschaftliche und professionelle Zusammenarbeit, sowie für die wissenschaftliche Weiterführung und Vertiefung dieses Projekts.

Von ganzem Herzen möchte ich mich abschließend bei meiner Familie für die bedingungslose Unterstützung, Motivation und Förderung in allen Lebenslagen meines Studiums bedanken.