

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Über die LGP2-vermittelte Signal-Modulation
der Proteine RIG-I und MDA5**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Johannes C. Hellmuth

aus Oxford

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß
Mitberichterstatter	Prof. Dr. med. Anne Krug Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Urusla Zimber-Strobl Prof. Dr. med. Josef Eberle
Mitbeteiligung durch die promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Andreas Schmidt
Dekan	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2014

Eidesstattliche Versicherung

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

„Über die LGP2-vermittelte Signal-Modulation der Proteine RIG-I und MDA5“ 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.

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems	1
1.1.1	Das Prinzip der Antigenerkennung des adaptiven Immunsystems	1
1.1.2	Das Prinzip der Mustererkennung des angeborenen Immunsystems	2
1.2	Mustererkennungsrezeptoren	3
1.2.1	Mustererkennungsrezeptoren der Virus-Abwehr	7
1.2.2	Effektormechanismen anti-viraler Mustererkennungsrezeptoren	8
1.3	Die Familie der <i>RIG-I-like helicases</i>	10
1.3.1	Strukturelle Merkmale der <i>RIG-I-like helicases</i>	10
1.3.2	Virale und synthetische RLH-Liganden	11
1.3.3	Die RLH Signalkaskade	13
1.3.4	Besonderheiten der RLH LGP2	15
1.4	Fragestellungen	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Geräte, Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.1	Geräte	18
2.1.2	Chemikalien und Reagenzien	18
2.1.3	Enzyme und Antikörper	19
2.1.4	Zellkulturmedien	19
2.1.5	Puffer und Lösungen	20
2.1.6	PCR <i>primer</i>	21
2.1.7	Mutagenese <i>primer</i>	21
2.1.8	Plasmide	21
2.1.9	DNA <i>templates</i> und <i>primer</i> für <i>in vitro</i> RNA Transkription	22
2.1.10	Immunstimulatorische RNA	22
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	Klonierungen	23
2.2.2	Transformation	24
2.2.3	Colony-PCR, DNA-Preparation und Sequenzierung	24
2.2.4	<i>Site-directed mutagenesis</i>	25
2.2.5	<i>In-vitro</i> Transkription	25
2.3	Zellkultur	26
2.4	Luciferase Assay	26
2.5	Proteinbiochemische Methoden	27

2.5.1	Co-Immunpräzipitation	27
2.5.2	Western Blot	27
2.6	Bioinformatische Methoden	28
2.6.1	<i>Sequence alignments</i>	28
2.6.2	Software	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Expressionskontrolle der neu klonierten Plasmide	29
3.2	LGP2 inhibiert die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I	30
3.3	LGP2 wirkt synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5	31
3.4	LGP2-N und LGP2-RD inhibieren die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I34	
3.5	Nur Volllängen-LGP2 und nicht LGP2-N oder LGP2-RD wirken synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5	35
3.6	Die regulatorische Domäne des Proteins LGP2 ist durch ein hoch konserviertes Cystein-Cluster gekennzeichnet	36
3.7	Die LGP2-vermittelte RIG-I-Inhibition wird durch die Mutation C615A nur teilweise reduziert	37
3.8	Die Integrität der LGP2-RD ist Voraussetzung für den LGP2-MDA5-Synergismus ..	38
3.9	Die Integrität der LGP2-RD ist Voraussetzung für die Bildung des LGP2-MDA5-Heterokomplex	39
4	Diskussion	41
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde	41
4.2	Mögliche Modelle der LGP2-Funktion	42
4.3	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	46
4.4	Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund struktur-biologischer Daten	48
4.5	Klinische Relevanz der Ergebnisse	52
5	Zusammenfassung	55
6	Abkürzungsverzeichnis	57
7	Literaturverzeichnis	59
8	Danksagung	64

1 Einleitung

1.1 Die zwei Komponenten des humanen Immunsystems

Das humane Immunsystem ist ein außerordentlich vielseitiges Abwehrsystem, das dazu dient, den Organismus vor eindringenden Mikroorganismen oder auch entarteten Zellen zu schützen. Die Komponenten dieses Abwehrsystems lassen sich funktionell wie evolutionsbiologisch in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen. Zentrale Aufgabe beider Systeme ist die Unterscheidung zwischen ‚Fremd‘ und ‚Selbst‘.

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Abwehrbarriere gegen eindringende Mikroorganismen dar und ist in der Lage, auf Krankheitserreger in kürzester Zeit zu reagieren. Die Mechanismen dieses Schutzes sind nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet, sondern ermöglichen die Erkennung weit verbreiteter molekularer Muster, die in Gefahrensituationen oder Mikroben vorkommen. Dabei verlaufen die Reaktionsmechanismen bei wiederholten Kontakten mit einem bereits vormals bekämpften Pathogen immer gleichartig.

Erst wenn es dieser ersten Abwehrbarriere des angeborenen Immunsystems nicht gelingt, eine Infektion zu eliminieren, greifen die Mechanismen des adaptiven Immunsystems. Die Reaktion des adaptiven Immunsystems ist dabei hoch spezifisch für ein bestimmtes Pathogen. Außerdem verfügt das adaptive System über ein ‚immunologisches Gedächtnis‘: Setzt sich das Immunsystem zu einem späteren Zeitpunkt erneut mit dem Pathogen auseinander, wird dieses Pathogen wesentlich schneller und effizienter neutralisiert.

Das wesentliche Unterscheidungsmerkmal dieser beiden Systeme besteht in den grundverschiedenen Strategien, mit denen Pathogene erkannt werden. Dennoch sind angeborenes und adaptives Immunsystem nicht als unabhängige Systeme zu betrachten, sondern funktionell eng miteinander verzahnt.

1.1.1 Das Prinzip der Antigenerkennung des adaptiven Immunsystems

Das adaptive Immunsystem stellt den phylogenetisch jüngeren Teil des Immunsystems dar und tritt erst mit der Evolution der Vertebraten in Erscheinung.¹ Immunerkennung durch das adaptive Immunsystem wird durch zwei verschiedene

Antigen-Rezeptoren vermittelt: den T-Zell-Rezeptoren und den Immunglobulinen (B-Zell-Rezeptoren und Antikörper). Der genetische Bauplan dieser Rezeptoren ist im Gegensatz zu allen anderen Proteinen eines Organismus nicht in der Keimbahn festgelegt.^{2,3} Die entsprechenden Gene werden erst während der Lymphozytenreifung aus verschiedenen konstanten und variablen Fragmenten durch den Vorgang der somatischen Rekombination zusammengesetzt. Diese somatische Rekombination führt zu einer enormen Anzahl verschiedener Rezeptoren, die (im Falle der B-Zellen) durch somatische Hypermutation und Immunglobulin-Klassenwechsel noch weiter gesteigert wird.^{4,5} Die so entstandene enorme Diversität ermöglicht die Erkennung nahezu jedes möglichen Antigens durch einen für das Antigen spezifischen Antigen-Rezeptor.

Die Aktivierung eines Antigen-Rezeptors durch das ‚passende‘ Antigen führt zu der klonalen Expansion und weiteren Differenzierung der entsprechenden T- oder B-Zelle. Diese klonale Expansion und Differenzierung ist notwendig, um eine effiziente adaptive Immunantwort zu generieren und stellt außerdem die Grundlage des ‚immunologischen Gedächtnisses‘ dar. Da diese Prozesse jedoch vor allem bei erstmaligem Antigen-Kontakt relativ viel Zeit benötigen, sind sie für die frühe Abwehr von eindringenden Pathogenen ungeeignet. Diese frühe Abwehr wird von dem angeborenen Immunsystem ausgeübt, welches in der Lage ist, unmittelbar auf Pathogene zu reagieren. Außerdem sind für eine effektive Aktivierung des adaptiven Systems ko-stimulatorische Signale und eine effiziente Antigen-Präsentation Voraussetzung - beides Prozesse, die durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems kontrolliert werden.

1.1.2 Das Prinzip der Mustererkennung des angeborenen Immunsystems

Das angeborene Immunsystem stellt den phylogenetisch älteren Teil der Immunabwehr dar.⁶ In unterschiedlicher Ausprägung ist ein angeborenes Immunsystem wahrscheinlich in allen Metabionta vorhanden.⁷

Die grundlegende Erkennungsstrategie des angeborenen Immunsystems ist die Identifikation fremder molekularer Muster, sogenannter *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Träger dieser Muster-Erkennung sind die sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs; *pattern-recognition receptors*). Sie sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Moleküle zu erkennen, sofern diese ein bestimmtes

molekulares Muster aufweisen.⁸ Diese molekularen Muster bzw. PAMPs sind durch drei entscheidende Merkmale gekennzeichnet:

- PAMPs sind Bestandteil mikrobieller Strukturen oder Bestandteil von Stoffwechselwegen, die im Wirt nicht vorkommen und so die Unterscheidung zwischen ‚Fremd‘ und ‚Selbst‘ erlauben.
- PAMPs sind essentielle Bestandteile mikrobieller Physiologie und können daher trotz Selektionsdruck kaum verändert werden.
- PAMPs sind meist charakteristisch für eine bestimmte Klasse von Mikroorganismen und geben daher Aufschluss über die Art der Infektion.^{8,9}

Im Gegensatz zu den Antigen-Rezeptoren des adaptiven Immunsystems ist die genetische Information der PRRs in der Keimbahn kodiert. Die Zahl der verschiedenen PRR ist daher limitiert. Dennoch ist auf Grund des oben beschriebenen Prinzips der Mustererkennung die Anzahl der Liganden und der dadurch erkannten Pathogene nahezu unbeschränkt. Des Weiteren werden einige PRRs von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert, die nicht primär Immunzellen darstellen müssen.

Typischerweise führt die Aktivierung eines PRR über eine intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren wie z.B. NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), AP-1 (*activator protein 1*) oder IRFs (*interferon regulatory factors*). Diese Transkriptionsfaktoren induzieren unter anderem pro-inflammatorische, anti-virale oder chemotaktische Zytokine und bestimmen so die Effektormechanismen der anschließenden Immunantwort. Außerdem ist die Aktivität von PRRs für eine effiziente Antigen-Präsentation und Expression ko-stimulatorischer Moleküle notwendig.^{8,10-12}

1.2 Mustererkennungsrezeptoren

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) werden anhand struktureller Merkmale in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese Gruppen können entsprechend ihrer intrazellulären Lokalisation weiter unterteilt werden. Die Gruppe der *Toll-like receptors* (TLR) und die Gruppe der *C-type lectin receptors* (CLR) sind in der Plasmamembran oder der endosomalen Membran verankert. Die Gruppe der *RIG-I-like helicases* (RLH, auch *Rig-I-like receptors*), die Gruppe der *nucleotide-binding*

domain leucine-rich repeat Proteine (NLR) und die Komponenten der Inflammasome sind hingegen im Zytoplasma der Zelle lokalisiert.

Die TLRs stellen die am besten charakterisierte Gruppe dar und umfassen im humanen System 10 Rezeptoren. Die TLRs erkennen ein sehr breites Spektrum unterschiedlicher PAMPs (Lipide, Lipoproteine, Nukleinsäuren und Proteine), die einem ebenfalls sehr breiten Spektrum verschiedener Pathogene entstammen (Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten).¹³ Eine Subfamilie bilden die Nukleinsäure-erkennenden TLRs: TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9. Im Gegensatz zu anderen TLRs, die an der Zelloberfläche lokalisiert sind, üben sie ihre Funktion in den intrazellulären Endolysosomen aus. Außerdem kennzeichnet die Gruppe der Nukleinsäure-erkennenden TLRs, dass sie zusätzlich zu der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine, die von allen TLRs hervorgerufen werden kann, über die Aktivierung von *interferon regulatory factors* (IRFs) die Produktion von Typ-I-Interferon (Typ-1-IFN) bewirken.¹⁴

Die ebenfalls in der Zellmembran verankerten CLRn teilen als charakterisierendes Strukturmerkmal eine Kohlenhydrat bindende *c-type lectin*-Domäne. CLRn werden unter anderem von dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen, Monozyten und B-Zellen exprimiert und erkennen verschiedene Pilze, Bakterien, Viren oder auch Bestandteile nekrotischer Zellen.¹⁵

Die zytoplasmatisch lokalisierten NLRs sind charakterisiert durch eine zentrale *nucleotide oligomerization domain* und eine C-terminalen *leucine rich repeat domain*. Anhand der Struktur der N-terminalen Domäne werden fünf verschiedene NLR-Subfamilien unterschieden (NLRA, NLRB, NLRC, NLRP und NLRX).¹⁶ Die Proteine der Subfamilie der NLRCs beispielsweise tragen eine N-terminale CARD-Domäne. Zu dieser Subfamilie zählen unter anderen die Proteine NOD1, NOD2 oder NLRC4 (IPAF). Die Proteine NOD1 und NOD2 erkennen von Peptidoglykan abgeleitete Struktur motive Gram-negativer und Gram-positiver Bakterien und induzieren daraufhin die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine.¹⁷ Die Proteine der Subfamilie der NLRPs tragen eine N-terminale *Pyrin domain*. Die zu dieser Subfamilie zählenden Proteine NLRP1 (NALP1) und NLRP3 (NALP3, Cryopyrin, CIAS1) sowie das Protein NLRC4 sind in der Lage, die Formierung multimerer, zytosolischer Proteinkomplexe, der sogenannten Inflammasome, auszulösen.^{16,17} Neben diesen drei NLRs ist der DNA-Sensor AIM2 ebenfalls in der Lage ein Inflammasom zu aktivieren.¹⁶ Die Aktivität dieser makromolekularen

Proteinkomplexe überführt Procaspase-1 in die biologisch aktive Form Caspase-1, die wiederum IL-1 β und IL-18 proteolytisch aktiviert. Die Gruppe der Inflammasome unterscheidet sich also von anderen PRR dadurch, dass sie bereits synthetisierte Proteine aktivieren und keine direkte transkriptionelle Kontrolle ihrer ‚Ziel‘-Proteine ausüben. Eine weitere Besonderheit stellt die Tatsache dar, dass das NLRP3 Inflammasom neben einigen mikrobiellen Strukturen viele endogene Gefahrensignale, sogenannte *danger-associated molecular patterns* (DAMPs) erkennt.¹⁶

Die Gruppe der RLHs umfasst drei zytoplasmatische Proteine: RIG-I, MDA5 und LGP2. Im Gegensatz zu anderen PRRs werden sie nahezu ubiquitär exprimiert.¹⁸ Die RLHs erkennen virale Nukleinsäuren und induzieren neben pro-inflammatorischen Zytokinen v.a. eine Typ-I-Interferon-Antwort.

Jenseits dieser Gruppen sind einzelne Rezeptoren zytoplasmatischer DNA-Erkennung bekannt. Das DNA-bindende Protein *DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors* (DAI) erkennt zytoplasmatische doppelsträngige DNA (dsDNA) und löst daraufhin eine Typ-I-Interferon-Antwort aus.¹⁹ Die Polymerase III kann zytoplasmatische poly(dA:dT) Moleküle in dsRNA umschreiben, die dann von RIG-I erkannt wird.²⁰⁻²² Eine Art universeller Rezeptor für Nukleinsäuren stellen die *High Mobility Group Box* (HMGB) Proteine dar, die in Bezug auf TLRs, RLHs und die zytosolische DNA Erkennung als Ko-Ligand dienen.²³

Einen Überblick über die verschiedenen humanen PRRs und deren Liganden gibt Tabelle 1.1.

PRR	Lokalisation	Ligand	Ursprung des Liganden
TLR			
TLR1	Zellmembran	Triacyl Lipoprotein	Bakterien
TLR2	Zellmembran	Lipoprotein	Bakterien, Viren, Parasiten, Wirt
TLR3	Endolysosom	dsRNA	Viren
TLR4	Zellmembran	LPS	Bakterien, Viren, Wirt
TLR5	Zellmembran	Flagellin	Bakterien
TLR6	Zellmembran	Diacyl Lipoprotein	Bakterien, Viren
TLR7 / TLR8	Endolysosom	ssRNA	Viren, Bakterien, Wirt
TLR9	Endolysosom	CpG-DNA	Viren, Bakterien, Protozoen, Wirt
TLR10*	Endolysosom	unbekannt	unbekannt
TLR11*	Zellmembran	Profilin-like molecule	Bakterien, Protozoen
RLH			
RIG-I	Zytoplasma	5'-ppp-RNA	RNA und DNA Viren
MDA5	Zytoplasma	längere dsRNA	RNA Viren
LGP2	Zytoplasma	unbekannt	unbekannt
NLR			
NOD1	Zytoplasma	iE-DAP	Bakterien
NOD2	Zytoplasma	MDP	Bakterien
CLR			
Dectin-1	Zellmembran	β -Glucan	Fungi
Dectin-2	Zellmembran	β -Glucan	Fungi
MINCLE	Zellmembran	SAP130	Fungi, Wirt
Inflammasome			
NLRP1	Zytoplasma	Anthrax lethal toxin, MDP	Bakterien
NLRP3	Zytoplasma	Toxine, ATP, kristalline Strukturen, Protein Aggregate **	Bakterien, DAMPs, phagozytiertes Material
NLRC4	Zytoplasma	Flagellin	Bakterien
AIM2	Zytoplasma	dsDNA	DNA Viren, Bakterien
Weitere			
DAI	Zytoplasma	dsDNA	Bakterien, DNA Viren
HMGB1	Zytoplasma	DNA, RNA	Bakterien, Viren
RNA Pol III	Zytoplasma	dsDNA	Bakterien, DNA Viren

Tab. 1.1 Übersicht über die bisher beschriebenen PRRs (adaptiert von Kumar et. al. 2011 und Takeuchi et. al. 2010).^{14,24}

Typ-I-Interferon induzierende, anti-virale PRR sind grau unterlegt; *TLR10 wird nur im humanen, TLR 11 nur im murinen System exprimiert; **detaillierte Auflistung bisher beschriebener Inflammasom-Liganden sind bei Bauernfeind et. al. 2010 besprochen.¹⁶

1.2.1 Mustererkennungsrezeptoren der Virus-Abwehr

Die Detektion einer Virusinfektion stellt das angeborene Immunsystem vor eine besondere Herausforderung: da Viren zur Replikation den Metabolismus des Wirtes benutzen, sind die viralen, molekularen Strukturen denen des Wirtes in hohem Maße ähnlich.²⁵ Dennoch sind bestimmte Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) in der Lage, virale Nukleinsäuren zu erkennen, die sowohl Bestandteil des Virus-Genoms als auch Zwischenprodukte der Virus-Replikation darstellen können. Besonders wichtig ist dabei die Unterscheidung zelleigener von fremden Nukleinsäuren. Diese Unterscheidung wird hauptsächlich durch zwei Strategien erreicht. Bestimmte PRRs (wie z.B. RIG-I, MDA5 oder TLR9) erkennen molekulare Strukturen der viralen RNA bzw. DNA, die bei zelleigenen Nukleinsäuren nicht (oder sehr selten) vorkommen oder aber maskiert sind. Weiterhin sind viele PRRs so lokalisiert, dass sie nur während einer Virusinfektion mit dem jeweiligen Liganden in Kontakt gelangen können - unter physiologischen Bedingungen ist das von ihnen ‚überwachte‘ Zellkompartiment frei von den entsprechenden Nukleinsäuren.²⁵

Die Virus erkennenden PRRs können entsprechend der von ihnen erkannten Nukleinsäure (DNA vs. RNA) und ihrer subzellulären Lokalisation (membrangebunden / endosomal vs. zytoplasmatisch) unterteilt werden.

Virale DNA wird im endosomalen Kompartiment von TLR 9 erkannt. Das dabei entscheidende PAMP sind unmethylierte Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid-Motive (CpG-DNA), welche in bakterieller und viraler DNA im Vergleich zu endogener DNA vermehrt vorkommen.¹³ Im Zytoplasma wird virale DNA von DAI, AIM2 oder über den ‚Polymerase III - Weg‘ erkannt. Die jeweilige Bedeutung dieser Mechanismen in Bezug auf die Aktivierung der adaptiven Immunantwort ist bis dato jedoch unklar.¹¹ Außerdem existieren neben den bisher bekannten PRRs offenbar ein oder mehrere Rezeptoren, die zytosolische DNA erkennen können und eine Verknüpfung mit dem adaptiven System herstellen.^{11,26}

Virale RNA wird im endosomalen Kompartiment als dsRNA von TLR3 und als ssRNA von den TLRs 7 und 8 erkannt.¹³ Im Zytoplasma kann virale RNA von den RLHs RIG-I und MDA5 erkannt werden. Die molekularen Strukturen der RLH-Liganden, die eine Unterscheidung zwischen ‚Fremd‘ und ‚Selbst‘ erlauben, sind Gegenstand aktueller Forschung und werden im Abschnitt 1.7 detailliert erläutert.

Zwischen den TLRs und RLHs bestehen maßgebende Unterschiede: Während die RLHs nahezu ubiquitär exprimiert werden, ist die Expression der TLRs auf bestimmte Zelltypen beschränkt.^{12,25} Die Tatsache, dass die RLHs im Zytoplasma lokalisiert sind legt nahe, dass die Zelle, die mittels dieser Rezeptoren virale RNA erkennt, selber infiziert sein muss.^{12,25} Im Gegensatz dazu müssen Zellen, die virale RNA anhand der endosomal lokalisierten TLRs 3, 7 und 8 erkennen, nicht selber von dem entsprechenden Virus infiziert sein.^{12,25} Diese Überlegung deckt sich mit der Tatsache, dass diese TLRs vor allem von dendritischen Zellen (DCs) exprimiert werden: DCs sind phagozytierende Zellen, die beispielsweise Bestandteile apoptischer Virus-infizierter Zellen aufnehmen. Die viralen Nukleinsäuren, die auf diesem Wege in die Phagosomen dendritischer Zellen gelangen, können dann von diesen TLRs erkannt werden.^{12,25}

1.2.2 Effektormechanismen anti-viraler Mustererkennungsrezeptoren

Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) üben ihre Wirkung vor allem durch die Induktion oder Prozessierung verschiedener Zytokine aus. Im Fall der Detektion viraler Nukleinsäuren führt diese Induktion zur Ausschüttung zahlreicher pro-inflammatorischer und anti-viraler Zytokine. Zentraler Mediator dieser anti-viralen Immunantwort sind die Typ-I-Interferone.

Die im humanen Immunsystem funktionell relevanten Typ-I-Interferone sind die 12 Proteine bzw. Subtypen des Interferon- α , das Interferon- β und das Interferon- ω .²⁷ Typ-I-Interferon kann von fast allen kernhaltigen Zellen gebildet werden und etabliert durch autokrine und parakrine Sekretion einen anti-viralen Zustand in den entsprechenden Zellen. Dieser anti-virale Zustand wird durch die Expression einiger hundert Interferon-induzierbarer Gene (ISGs) erreicht.²⁸ Zu diesen ISGs gehören auch die IRFs und die RLHs, die durch ihre eigene Interferon-induzierende Wirkung als Bestandteil einer positiv verstärkenden Rückkopplung (*positive feedback loop*) gesehen werden können.^{28,29}

Typ-I-Interferon wirkt maßgeblich auf die Funktion verschiedener Zellen des Immunsystems: natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und zytotoxische T-Zellen werden durch Typ-I-Interferon aktiviert.^{30,31} CD8⁺-Zellen reagieren auf Typ-I-Interferon mit klonaler Expansion und Gedächtnis-Formation.³² Auf B-Zellen wirkt Typ-I-Interferon direkt und indirekt (durch die Stimulation dendritischer Zellen) und induziert so die Antikörperproduktion und den Immunglobulin-Klassenwechsel.^{33,34}

Die Bedeutung des Typ-I-Interferons wird am besten verdeutlicht durch murine *knock-out*-Studien, die zeigen, dass ohne den Typ-I-Interferon Rezeptor eine effektive Virusabwehr unmöglich ist.³⁵ In Bezug auf die anti-virale Immunität kann das Typ-I-Interferon also als entscheidendes Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem gesehen werden.²⁹

Neben diesen Zytokin-vermittelten Effekten können v.a. die TLRs durch ihre Lokalisation auf spezialisierten Immunzellen spezifische Aufgaben erfüllen. So führt beispielsweise die Aktivierung von TLR3 auf CD8 α^+ DCs zu effektiver Induktion zytotoxischer T-Zell-Antworten.³⁶ Die TLRs 7, 8 und 9 werden vor allem von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDCs) stark exprimiert. Die Aktivierung dieser TLRs führt dort zur Produktion systemisch wirksamer Mengen des Typ-I-Interferons, die ein besonderes Kennzeichen der pDCs darstellt.³⁷

Trotz dieser und anderer Erkenntnisse über Lokalisation, Liganden und Funktion der RNA-Erkennung durch TLRs vs. RLHs ist die jeweilige Bedeutung dieser PRRs in Bezug auf die Aktivierung des adaptiven Immunsystems schwer abzuschätzen. Für bestimmte Virusinfektionen sind durch murine *knock-out*-Studien *downstream* gelegener Adapter Moleküle der TLR- und RLH-Signalkaskade die entsprechenden Beiträge zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems untersucht worden. Im Falle einer Infektion mit LCMV (*lymphocytic choriomeningitis virus*) wird Typ-I-Interferon sowohl durch TLRs als auch durch RLHs induziert. Die CD8 $^+$ -T-Zell-Antwort ist jedoch abhängig vom TLR-Signal und unabhängig vom RLH-Signal.³⁸ Bei einer Influenza A Virusinfektion hingegen kann die Ausbildung einer CD8 $^+$ -T-Zell-Antwort durch das RLH-Signal vermittelt werden; die Induktion einer CD4 $^+$ -T-Zell-Antwort bzw. Antikörper Produktion benötigt jedoch die TLR-Signalwege.³⁹ Insgesamt ergibt sich ein Bild, in dem die TLRs wichtiger sind für die Aktivierung adaptiver Immunität, die Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und die systemische Typ-I-Interferon-Antwort (durch TLR-Expression auf pDCs). Die RLHs hingegen sind wahrscheinlich eher zuständig für die erste, lokale Virus-Eindämmung durch die Etablierung eines anti-viralen Zustandes in den infizierten und benachbarten Zellen. Zukünftige Untersuchungen werden den jeweiligen Beitrag der TLR- und RLH-vermittelten Virus-Erkennung in Bezug auf die gesamte Immunabwehr einer Virusinfektion genauer klären müssen.^{11,12}

1.3 Die Familie der *RIG-I-like helicases*

Die Familie der *RIG-I-like helicases* (RLHs) umfasst drei zytoplasmatische Proteine: *Retinoid acid-Inducible Gene I* (RIG-I), *Melanoma Differentiation Associated Protein 5* (MDA5) und *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2). Die RLHs werden ubiquitär exprimiert und sind außerdem durch Typ-I-Interferon induzierbar.^{18,29} Die RLHs erkennen virale dsRNA und lösen daraufhin eine Typ-I-Interferon-Antwort aus. Da die RLH Gene nur bei höheren Vertebraten zu finden sind, geht man davon aus, dass sie sich evolutionär als spezialisierte Rezeptoren des Typ-I-Interferon Systems entwickelt haben.^{40,41}

1.3.1 Strukturelle Merkmale der *RIG-I-like helicases*

Alle drei RLHs tragen eine zentrale DExH/D-Box ATPase- bzw. Helikase-Domäne, und eine C-terminale regulatorische Domäne (RD oder auch *repressor domain*). RIG-I und MDA5 besitzen außerdem zwei N-terminale *caspase activation and recruitment domains* (CARDs), die für die Signalauslösung essentiell sind. LGP2 weist im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 keine Signal-Domäne auf.

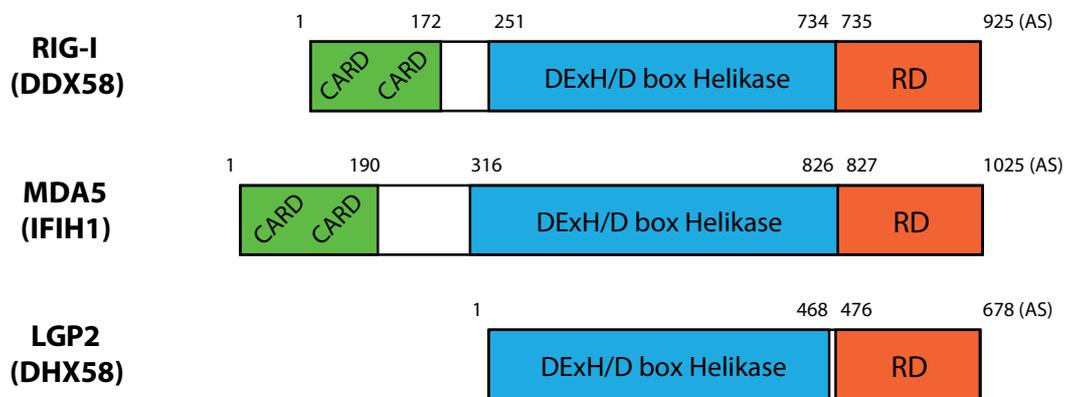


Abb. 1.1 Übersicht über die Domänenarchitektur der RLH.

AS-Positionen der CARDs und Anfang der Helikase-Domäne entsprechend UniProtKB bzw. Swiss-Prot Database. Positionen der RD und Ende der Helikase-Domäne entsprechen den in dieser Arbeit klonierten RD- und N-terminalen Konstrukten.

Die RD wurde ursprünglich als *repressor domain* beschrieben, die als RIG-I-RD in *cis* und als LGP2-RD in *trans* das RIG-I-Signal inhibiert.⁴² Die RIG-I-RD ist vermutlich wichtig für die auto-inhibitorische Konformation, die das inaktive RIG-I einnimmt. Später konnte eine Struktur- und Funktionsanalyse zeigen, dass die RIG-I-RD außerdem als zweite Liganden-Bindungsstelle neben der Helikase-Domäne

fungiert: die Kristall-Struktur der RIG-I-RD-Domäne zeigt eine positiv geladene Tasche, die eine Interaktion mit dem 5'-Triphosphat der RIG-I-Liganden vermittelt.^{43,44} Kürzlich ist auch die Struktur der LGP2-RD mit NMR- und Kristallographie-Studien identifiziert worden.⁴⁵⁻⁴⁷ Gleichzeitig konnte die Struktur der MDA5-RD mittels *small angle X-ray scattering* (Kleinwinkel Röntgenstreuung) und *homology modeling* anhand der RIG-I- und LGP2-RDs vorhergesagt werden.⁴⁶ Die allgemeine Struktur der RIG-I-, LGP2- und MDA5-RD ist ähnlich: Die RLH-RDs komplexieren mit je vier Cystein-Resten ein zentrales Zink-Atom. Außerdem weisen sie eine positiv geladene, konkave Oberfläche auf, die wahrscheinlich die Funktion einer RNA-Bindungsstelle erfüllt.^{46,47} Bestimmte AS-Reste einer mutmaßlich für die Liganden-Spezifität verantwortlichen Stelle unterscheiden sich jedoch zwischen den RLH-RDs und könnten unterschiedliche Bindungsverhalten erklären. In Kooperation mit der Gruppe von Prof. Karl Peter-Hopfner wurden im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Daten umfassende Struktur-Funktionsanalysen der LGP2-RD durchgeführt, die im Rahmen der Diskussion vorgestellt werden (siehe Abschnitt 4.4).

1.3.2 Virale und synthetische RLH-Liganden

Die strukturellen Eigenschaften der RIG-I-Liganden sind von allen RLHs bisher am besten untersucht. Das erste entscheidende PAMP für die Erkennung durch RIG-I ist das 5'-Triphosphat der viralen RNA (5'-ppp-RNA). Zelleigene, zytoplasmatische RNA trägt kein 5'-Triphosphat, da sie üblicherweise dephosphoryliert, mit einer 5'-Kappe versehen oder anderweitig prozessiert wird, bevor sie den Zellkern verläßt.^{48,49} Das 5'-Triphosphat erlaubt also im Zytoplasma eine effektive Unterscheidung viraler von zelleigener RNA. Das zweite PAMP der durch RIG-I erkannten RNAs ist eine zumindest partielle Doppelsträngigkeit oder eine Einzelstrang-interne Basenpaarung.⁵⁰ Dieses zweite Strukturmerkmal stellt beispielsweise in Bezug auf ss(-)RNA-Viren (Einzelstrang-Genom mit negativer Polarität) wie das Influenza A Virus ein sehr effektives PAMP dar. Denn diese Viren sind im Zuge der Replikation auf Basengepaarte *panhandle*-Strukturen angewiesen, die von RIG-I erkannt werden, vom Virus aber nicht modifiziert werden können.¹⁸

Ein weiterer RIG-I Ligand, ist das synthetische dsRNA Analogon polyinosine-polycytidine (poly(I:C)), wenn es in einer Länge unter 1000 bp vorliegt.⁵¹ Zudem ist beschrieben, dass RIG-I homopolyuridine Motive, die z.B. im Genom des Hepatitis C Virus (HCV) vorkommen,⁵² und kleine dsRNAs, die durch RNase L vermittelte

Spaltung zelleigener RNA entstehen, erkennen kann.⁵³ Ein weiterer Mechanismus anti-viraler Nukleinsäure Erkennung ist die Transkription viraler DNA durch die Polymerase III. Die dabei produzierte 5'-Triphosphat-RNA wird wiederum von RIG-I erkannt und kann so eine Typ-I-Interferon-Antwort auslösen.^{20,21}

Die Struktur motive der MDA5-Liganden werden weniger gut verstanden. Man nimmt an, dass RNAs, die von MDA5 erkannt werden, länger als RIG-I-Liganden sind und komplexe Ordnungsstrukturen wie z.B. Verzweigungen aufweisen. Ein sehr gebräuchlicher und potenter MDA5-Ligand ist poly(I:C), der allerdings bei Längen unter 1000 bp auch RIG-I aktivieren kann.^{18,51,54,55}

Ob, und in welcher Form diese von RIG-I und MDA5 erkannten molekularen Strukturen bei der Infektion durch ein bestimmtes Virus im Zytoplasma vorhanden sind, lässt sich schwer vorhersagen. Mit *knock-out*- oder *knock-down*-Studien kann jedoch gut untersucht werden, welches Virus dem RIG-I- und/oder dem MDA5-*pathway* zuzuordnen ist. Viren, bei denen eine Erkennung über RIG-I, MDA5 oder beide Rezeptoren gezeigt werden konnte, sind entsprechend in Abbildung 1.2 dargestellt.

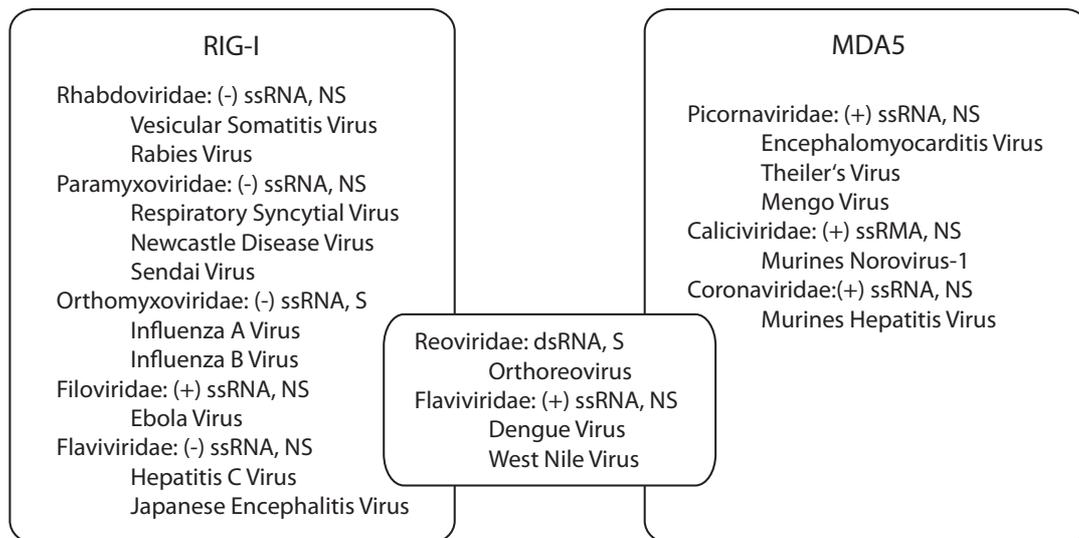


Abb. 1.2 Übersicht über virale RLH-Liganden (adaptiert von Loo et al. 2008 und Yoneyama et. al. 2010).^{40,56}

Die genomische Grundstruktur ist dargestellt als positive (+) vs. negative (-) Polarität, einzelsträngig (ssRNA) vs. doppelsträngig (dsRNA) und segmentiert (S) vs. nicht-segmentiert (NS).

1.3.3 Die RLH Signalkaskade

Durch die Bindung des entsprechenden Liganden ändert RIG-I (und wahrscheinlich auch MDA5) die Konformation, so dass die C-terminalen CARDS zugänglich werden. Die CARDS von RIG-I und MDA5 vermitteln dann via homotypischer Interaktion die Assoziation an den *downstream* gelegenen Adapter MAVS (*Mitochondrial Anti-viral Signaling*, auch IPS-I, CARDIF und VISA genannt).⁵⁷⁻⁶⁰ MAVS ist in der äußeren Mitochondrien-Membran verankert, und diese Lokalisation ist für die Funktion offenbar essentiell. NLRX1 (auch NOD9 genannt) ist ebenfalls in der äußeren Mitochondrien Membran lokalisiert und inhibiert die Signaltransduktion durch MAVS.⁶¹ Die weitere Signalkaskade führt über die E3 Ubiquitin Ligase TRAF3 (*TNF-receptor-associated factor 3*) und die Kinasen TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) und IKK- ϵ (*inducible I κ B kinase epsilon*) zur Aktivierung von IRF3 und IRF7 (*interferon regulatory factor 3 und 7*). Dieser Signalweg wird durch die Proteine TANK (*TRAF family member-associated NF- κ B activator*), NAP1 (*NAK-associated protein 1*) und SINTBAD (*similar to NAP1 TBK1 adaptor*) reguliert. Ein zweiter Arm führt über TRADD (*TNFR-associated death domain protein*), FADD (*Fas-associated death domain-containing protein*), RIP-1 (*receptor-interacting protein 1*), TRAF6 (*TNF-receptor-associated factor 6*), RIP (*receptor interacting protein*) und die

Caspasen 8 und 10 zur Aktivierung von NF- κ B. Die Aktivierung und Translokation dieser Transkriptionsfaktoren in den Nukleus führt schließlich zur Induktion pro-inflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferon.^{14,17,24,40,62}

Diese Signalkaskade wird an verschiedenen Punkten durch den Mechanismus der Ubiquitinierung reguliert: TRIM25 (*tripartite motif-containing protein 25*) und Riplet (RNF135, *RING finger protein 135*) sind E3 Ubiquitin Ligasen, die RIG-I mit K63-verknüpften Ubiquitin-Ketten konjugieren. Diese Poly-Ubiquitinierung ist für die Signal-Aktivität von RIG-I essentiell.^{63,64} RNF125 (*RING finger protein 125*) hingegen konjugiert RIG-I mit K48-verknüpften Ubiquitin-Ketten, wodurch RIG-I der proteosomalen Degradation zugeführt wird. MDA5 und MAVS werden durch RNF125 ebenfalls negativ reguliert.⁶⁵ Das MAVS-Signal wird unter anderem durch die Proteine A20 und DUBA (*deubiquitylating enzyme A*) modifiziert. DUBA inhibiert die Signaltransduktion durch TRAF3, indem es dessen Auto-Ubiquitinierung verhindert. A20 besitzt sowohl E3-Ligase- als auch deubiquitinierende Funktion und reguliert NF- κ B Aktivität negativ.^{66,67}

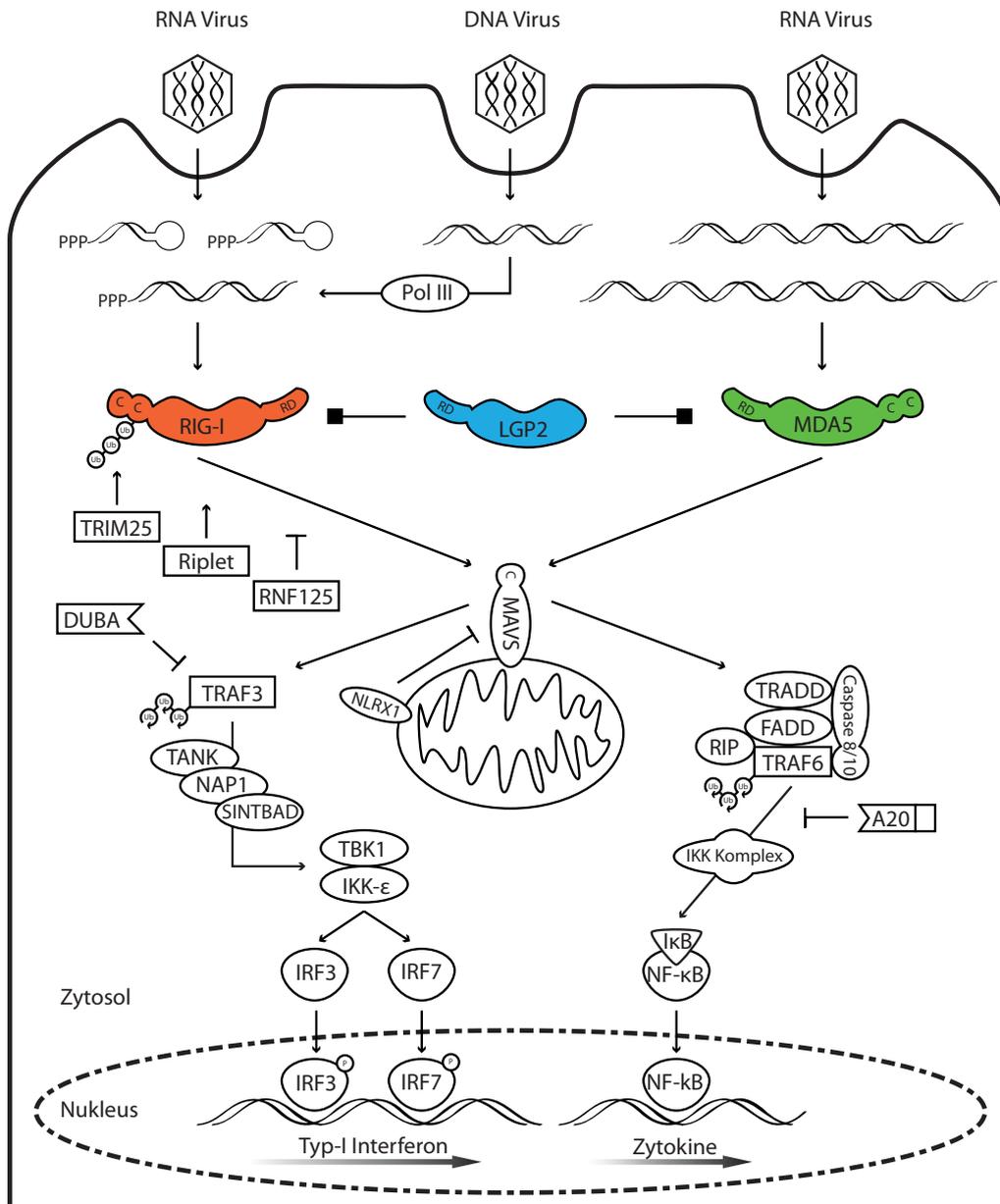


Abb. 1.3 Übersicht über die RLH-Signalwege (adaptiert von Takeuchi et al. 2007).⁶²

1.3.4 Besonderheiten der RLH LGP2

LGP2 unterscheidet sich strukturell von den beiden anderen RLHs RIG-I und MDA5 indem es keine N-terminalen CARDS aufweist. Da diese CARDS die für die Signaltransduktion notwendige Interaktion mit dem Adaptor MAVS vermitteln, handelt es sich bei LGP2 offenbar nicht um einen eigenständigen PRR. Die Sequenzen der LGP2 Helikase- und RD-Domänen weisen eine hohe Übereinstimmung mit den entsprechenden RIG-I- und MDA5-Sequenzen auf. Die

Tatsache, dass diese Domänen Liganden-Bindestellen darstellen, eine Signal-Domäne jedoch fehlt, lässt vermuten, dass LGP2 eine regulatorische Funktion ausüben könnte. Die ersten funktionellen Studien konnten dementsprechend einen inhibierenden Effekt von LGP2 auf das RIG-I-Signal demonstrieren; ihre Autoren vermuteten eine ähnliche Wirkung auf MDA5.^{68,69} Die erste murine *knock-out*-Studie ergab jedoch ein ambivalentes Bild: die Typ-I-Interferon Produktion nach NDV-Infektion (*newcastle disease virus*, einem von RIG-I erkannten Virus) fiel in Abwesenheit von LGP2 stärker aus, während sie nach EMCV-Infektion (*encephalomyocarditis virus*, einem von MDA5 erkannten Virus) durch den LGP2-*knock-out* abgeschwächt wurde.⁷⁰ Das Konzept der LGP2-vermittelten negativen RIG-I- und positiven MDA5-Regulierung wurde jedoch durch eine zweite LGP2-*knock-out*-Studie in Frage gestellt. Nach Infektion mit bestimmten Viren fiel die Typ-I-Interferon-Antwort in Abwesenheit von LGP2 schwächer aus, unabhängig davon, ob diese Viren von RIG-I oder MDA5 erkannt werden. Derselbe Effekt konnte beobachtet werden bei der Mutation LGP2^{K30A/K30A}, die die ATPase-Aktivität der LGP2 Helikase-Domäne unterbricht. Die Auswirkung des LGP2-*knock-outs* und der ATPase-Mutation waren im Falle der über MDA5 erkannten Viren (EMCV und Mengo Virus) schwerwiegender. Allerdings konnten keine Auswirkungen des *knock-outs* auf die Erkennung von poly(I:C), *in vitro* transkribierter RNA (die 5'-Triphosphat trägt) und Influenza Virus festgestellt werden. Die Autoren spekulieren, dass die Aufgabe LGP2s darin besteht, virale Ribonukleoproteine (RNP) von entsprechenden Liganden zu entfernen, um so die dsRNA Erkennung durch RIG-I und MDA5 zu ermöglichen.⁷¹

Darüber hinaus existiert evtl. ein RNA-unabhängiger Mechanismus LGP2 vermittelter RLH-Regulierung. Die Interaktion LGP2s mit der C-terminalen Region von MAVS inhibiert offenbar die Interaktion mit IKK-ε und interferiert so mit der RLH-Signalkaskade.⁷²

Ob LGP2 seine Funktion über die Bindung bestimmter Liganden ausübt und welche strukturellen Merkmale diese Liganden auszeichnen, ist bisher unbekannt. Die Studie von Pippig et. al. konnte zeigen, dass die LGP2-RD dsRNA unabhängig von einem 5'-Triphosphat bindet. Die Tatsache, dass die Affinität der LGP2-RD zu den Duplex RNAs dabei ähnlich hoch oder höher ist als die der RIG-I-RD Interaktion mit 5'-Triphosphat-RNA, könnte auf eine physiologische Bedeutung der RNA-Bindung durch LGP2 hindeuten.⁴⁶

1.4 Fragestellungen

Eine detaillierte Kenntnis der Mechanismen der Virus-Erkennung durch die *RIG-I-like helicases* (RLHs) ist aus medizinischer Sicht aus verschiedenen Gründen ausgesprochen wichtig.

Humanpathogen bedeutsame Viren, wie das Hepatitis C Virus oder das Influenza A Virus, werden über die RLHs erkannt. Entsprechend haben diese Viren Mechanismen entwickelt, die das RLH-Signal unterbrechen.^{73,74} Ein genaues Verständnis der RLH-vermittelten Virus-Erkennung und der viralen Evasionsstrategien könnte also die Grundlage neuer, anti-viraler Therapien bilden. Daneben existieren immuntherapeutische Ansätze, die als Therapeutika Liganden der Rezeptoren des angeborenen Immunsystems einsetzen. So konnte eine erste murine Studie die Immunstimulation einer 5'-Triphosphat-RNA mit dem Effekt der RNA-Interferenz kombinieren und in der Therapie eines malignen Melanoms erfolgreich anwenden.⁷⁵

In den letzten Jahren ist das Verständnis für die Funktion und die Liganden der Helikase RIG-I stetig gewachsen. Die Funktion des Proteins LGP2 hingegen wird nach wie vor nur rudimentär verstanden. Bei Beginn dieser Forschungsarbeit nahm man eine inhibitorische Funktion in Bezug auf die RIG-I- und MDA5-Signalkaskade an.⁶⁸ Erst später zeigte die erste Studie einer LGP2-*knock-out*-Maus eine dichotome Wirkung LGP2s: als Inhibitor von RIG-I und Aktivator von MDA5.⁷⁰ Die zweite, kürzlich erschienene *knock-out*-Studie wiederum impliziert eine positive Regulierung sowohl des RIG-I- als auch des MDA5-Signals.⁷¹ Ebenso unklar wie die Funktion sind die molekularen Mechanismen durch die LGP2 die RIG-I- und MDA5-Aktivität reguliert.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war die Untersuchung der LGP2-vermittelten Modulation der anti-viralen Aktivität von RIG-I und MDA5. Dabei sollte die Rolle der einzelnen Domänen und auch einzelner, strukturell wichtiger AS geklärt werden. In Kombination mit biochemischen und struktur-biologischen Daten des Labors für ‚Structural Biology and DNA Repair‘ von Prof. Karl-Peter Hopfner sollten dadurch Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen der LGP2-vermittelten RLH-Signal-Modulation gezogen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Reagenzien

2.1.1 Geräte

Alphaimager HP	ProteinSimple (Santa Clara, CA, USA)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, D)
Lamin Air Flow HB 2248	Heraeus (Hanau, D)
LAS-4000mini	Fujifilm (Tokyo, Japan)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena, D)
Mithras LB 940 (Multiplate Reader)	Berthold (Bad Wilbad, D)
NanoPhotometer	Implen (München, D)
Power Pac 200 (Power Supply)	Biorad (München, D)
Thermocycler T3	Biometra (Göttingen, D)
Trans-Blot SD Semidry Transfer Cell	Biorad (München, D)
Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell	Biorad (München, D)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, D)

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA (Linz, A)
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom AG (Berlin, D)
L-Glutamin	PAA (Linz, A)
Ciprofloxacin	Bayer Vital GmbH (Leverkusen, D)
Phosphat buffered saline (PBS)	PAA (Linz, A)
Trypsin-EDTA (1×)	PAA (Linz, A)

Transfektion und Stimulation

Genejuice	Merck (Darmstadt, D)
Lipofectamin 2000	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Optimem	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Poly I:C	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)

Luciferase Assay

Coelenterazine	Promega (Mannheim, D)
Passive Lysis Buffer	Promega (Mannheim, D)
Luciferase-Assay Kit	BioThema (Handen, S)

Proteinbiochemie

Nitrocellulosemembranen	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
Nonidet P40	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)

NuPage Bis-Tris Gels	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
NuPage SDS Running Buffer	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Prestained protein molecular weight marker	Fermentas (St. Leon Rot, D)
Protease Inhibitor cocktail tablets	Roche (Mannheim, D)
FLAG Peptide	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Amersham ECL Western Blotting Detection reagent	GE Healthcare (Little Chalfont, GB)
Protein DC Assay	Biorad (München, D)

Molekularbiologie

dNTPs (10mM)	Fermentas (St. Leon Rot, D)
LB-Medium	Carl Roth (Karlsruhe, D)
LE Agarose	Biozym (Oldendorf, D)
Loading Dye (6x)	Fermentas (St. Leon Rot, D)
O'gene ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas (St. Leon Rot, D)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed (Löhne, D)
Jetstar 2.0 Maxi Preparation Kit	Genomed (Löhne, D)
Mini Quick Spin Oligo Column	Roche (Mannheim, D)
MEGAscript T7 Kit	Ambion (Carlsbad, CA, USA)

2.1.3 Enzyme und Antikörper

Enzyme

Pfu Polymerase	Fermentas (St. Leon Rot, D)
EcoRV Restriktionsenzyme	Fermentas (St. Leon Rot, D)
T4 DNA Ligase	Fermentas (St. Leon Rot, D)
Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)	Fermentas (St. Leon Rot, D)
Exo- Klenow Fragment	Fermentas (St. Leon Rot, D)

Antikörper und Beads

Anti-Mouse-Antikörper (HRP-konjugiert)	Promega (Mannheim, D)
Anti-Rabbit-Antikörper (HRP-konjugiert)	Promega (Mannheim, D)
Anti-FLAG M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-FLAG Antikörper (mouse)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-HA Antikörper (rabbit)	Santa-Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-β-actin (HRP-konjugiert)	Santa-Cruz Biotech (Santa Cruz, CA, USA)

2.1.4 Zellkulturmedien

DMEM-Vollmedium

10 Vol% FBS
8 µg/ml Ciprofloxacin
1,5 mM L-Glutamin

In DMEM-Medium

2.1.5 Puffer und Lösungen

Standard-Lysis-Puffer

150 mM NaCl
25mM Tris (pH 7,4)
2 mM EDTA
0,5 %(vol) Nonidet P40
½ Prot. Inh. Tablet pro 10 ml

Laemmli-Puffer

250 mM Tris-HCL (pH 6,8)
40 %(vol) Glycerol
5 %(w/v) SDS
10 %(vol) Mercaptoethanol
0,05% (w/v) Bromphenolblau
in Aqua dest.

Transferbuffer

192 mM Glycerin
25mM Tris-Base
10 %(vol) Methanol
in Aqua dest.

PBS-Tween

0,1 %(vol) Tween20
in PBS

Blocking Puffer

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

Alle in den Lösungen und Puffern enthaltenen Chemikalien, die nicht unter 2.1.2 gelistet sind, wurden von der Firma Carl Roth (Karlsruhe, D) erworben.

2.1.6 PCR primer

Monophosphatreste sind mit einem p- gekennzeichnet.

Amplikon	Position (innerhalb CDS)	Nukleotid-Sequenz
LGP2	1-2034	Forward: GCCACCATGGAGCTTCGGTCCACC Reverse: GTCCAGGGAGAGGTCCGA
LGP2-RD	1426-2034	Forward: GCCACCATGCAGAGTGTATACGCGTTTGT AGC Reverse: GTCCAGGGAGAGGTCCGA
LGP2-N	1-1404	Forward: GCCACCATGGAGCTTCGGTCCACC Reverse: GGCCTGGACCATGGAGATT
RIG-I	1-2775	Forward: p-GCCACCATGACCACCGAGCAGCGA Reverse: p-TTTGGACATTTCTGCTGGATC
MDA5	1-3075	Forward: p-GCCACCATGTCTGAATGGGTATTCCACA Reverse: p-ATCCTCATCACTAAATAAACAGCATTC

2.1.7 Mutagenese primer

Mutation	Nukleotid-Sequenz
LGP2 C615A	Forward: CAGCTGCAGGAACGCTGGGGAGGTCTGG Reverse: CCAGACCTCCCCAGCGTTCCTGCAGCTG

2.1.8 Plasmide

Folgende Plasmide wurden als Vektoren für die unten beschriebenen Klonierungen verwendet:

Name	Labor- interne Nr.	Promotor	Insertion Site	Tag	Resistenz
pSfiExpress-HA	L7	CMV	Eco-RV	HA (C-terminal)	Kanamycin
pSfiExpress-FLAG	L9	CMV	Eco-RV	FLAG (C-terminal)	Kanamycin
GFP	45	CMV	/	/	Kanamycin
Firefly-Luciferase	46	IFN- β	/	/	Ampicillin
Renilla-Luciferase	47	CMV	/	/	Ampicillin

Folgende Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit neu kloniert und finden hier Verwendung:

Name	Labor Interne Nr.	<i>backbone</i>	Insert
RIG-I-HA	1	pSfiExpress-HA	human RIG-I, full length, wt
MDA5-HA	4	pSfiExpress-HA	human MDA5, full length, wt
LGP2-HA	7	pSfiExpress-HA	human LGP2, full length, wt
LGP2-N-HA	8	pSfiExpress-HA	human LGP2, AS 1-468, wt
LGP2-RD-HA	9	pSfiExpress-HA	human LGP2, AS 476-678, wt
LGP2-FLAG	12	pSfiExpress-FLAG	human LGP2, full length, wt
MDA5-FLAG	75	pSfiExpress-FLAG	human MDA5, full length, wt
LGP2-C615A-HA	13	pSfiExpress-HA	human LGP2, full length, C615A

2.1.9 DNA templates und primer für *in vitro* RNA Transkription

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz
T7 promotor primer	TAATACGACTCACTATA
Template 2.2s	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTA
Template 2.2as	GCATGCGACCTCTGTTTACTATAGTGAGTCGTA

2.1.10 Immunstimulatorische RNA

poly(I:C) wurde, wie oben angegeben, von der Firma GE Healthcare erworben.

Doppelsträngige 5'-Triphosphat-RNA wurde mit dem MEGAshortscript™ T7 Kit von Ambion, wie unten angegeben, hergestellt (siehe Abschnitt 2.2.5). Die so generierte, immunstimulatorische RNA ist doppelsträngig und trägt am 5'-Ende ein Triphosphat. Die Sequenz entspricht den oben angegebenen *templates* 2.2s und 2.2as und wird Labor-intern als ‚5'-ppp-2.2ds‘ geführt. Im Folgenden wird diese immunstimulatorische RNA als 5'-Triphosphat-RNA und in Abbildungen als 5'-ppp aufgeführt.

Bezeichnung	Nukleotid-Sequenz des <i>sense</i> Stranges
5'-ppp-2.2ds	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Klonierungen

PCR *primer* Paare (siehe Abschnitt 2.1.6) wurden mit Hilfe des Primer3-Algorithmus konstruiert und von der Firma Metabion (Martinsried, D) synthetisiert. Alle *forward primer* beinhalten eine Kozak-Sequenz und ein Start-Kodon um eine effiziente Expression in eukaryotischen Zellen zu ermöglichen. Monophosphatreste sind mit einem ‚p-‘ gekennzeichnet.

Für die PCR zur Amplifikation der Inserts wurde die Pfu DNA Polymerase mit *proof-reading* Funktion verwendet. Der PCR-Ansatz für die Amplifikation der Inserts mit der Pfu DNA Polymerase setzt sich zusammen aus 10ng *template*, je 10µM forward und *reverse primer*, 10µM dNTPs, 2,5 U Pfu Polymerase und 1fach Pfu-Puffer und H₂O (add. zu 50µl Gesamtvolumen). Das entsprechende PCR-Programm wurde in einem Thermocycler T3 mit folgendem Zyklus-Protokoll ausgeführt:

Temperatur	Dauer	Zykluszahl
98 °C	60s	} 30
95 °C	45s	
50 °C	45s	
72 °C	120-360s*	
72 °C	600s	

*Elongationszeit: 120s pro zu synthetisierenden kbp

Die PCR-Produkte wurden auf einem Ethidiumbromid-haltigen, 1%igen (w/v) Agarose Gel aufgetrennt. Die passenden Banden wurden ausgeschnitten und die DNA mit dem Jetquick Gel Extraction Spin Kit extrahiert.

Für die anschließende Ligationsreaktion ist der Vektor pSfiExpress mit einem Restriktionsverdau geöffnet worden. Folgender Reaktionsansatz wird dafür drei Stunden bei 37°C inkubiert: 30µl H₂O, 5µl Puffer R, 14 µl Plasmid (700ng/µl) und 1µl EcoRV-Enzym. Das geöffnete Plasmid wird ebenfalls per Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend isoliert.

Das PCR-Produkt bzw. Insert und der geöffnete Vektor liegen am Ende der Aufreinigung jeweils in 50µl H₂O gelöst vor und werden wie folgt in die anschließende Ligationsreaktion eingebracht: 2µl aufgereinigter Vektor, 8µl aufgereinigtes Insert, 2µl Ligase Puffer, 1µl T4 DNA Ligase und 7µl H₂O. Der Ansatz wird zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Während der Ligations-Reaktion können die beiden Enden des geöffneten Plasmids miteinander ligiert werden, ohne dass das Insert in das Plasmid aufgenommen worden

ist. Da bei Aufnahme eines Inserts die EcoRV-Schnittstelle unterbrochen wird, können die ‚leeren‘ Plasmide durch einen EcoRV-Nachverdau eliminiert werden. Für diesen ‚Nachverdau‘ werden 5µl aus der Ligationsreaktion auf 65°C erhitzt, um die Ligase zu inaktivieren. Diese 5µl werden mit 1,5µl EcoRV, 1,5µl Puffer R und 12 µl H₂O bei 37°C eine halbe Stunde inkubiert.

Im Falle der Konstrukte für MDA5 und RIG-I besitzen die Inserts eine EcoRV-Schnittstelle. Da hier ein ‚Nachverdau‘ also unmöglich ist, wird ein modifiziertes Protokoll verwendet. Für die PCR zur Amplifikation der Inserts werden phosphorylierte *primer* eingesetzt und das geöffnete Plasmid dephosphoryliert (durch Zugabe von einem µl CIAP zu dem Reaktionsansatz des EcoRV-Verdau). Dadurch kann sich das Plasmid in der Ligationsreaktion nur schließen wenn es das an beiden Enden ein Phosphatrest tragende PCR-Produkt aufnimmt. Ein ‚Nachverdau‘ ist also überflüssig.

2.2.2 Transformation

Nach der Ligation werden mit dem Ansatz chemisch kompetente XL1-Blue-Bakterien transformiert. Dafür werden 100µl Bakterien nach einer halbe Stunde Inkubation auf Eis eine Minute lang in einem Heizblock auf 42°C gebracht. Anschließend wird 1ml Antibiotikum-freies LB-Medium zugegeben und die Bakterien eine halbe Stunde bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien werden auf einer Kanamycin-haltigen Agarplatte ausplattiert.

2.2.3 Colony-PCR, DNA-Preparation und Sequenzierung

Die entstehenden Kolonien werden per *Colony-PCR* getestet. Dabei wird ein im Vektor und ein im Insert bindender *primer* verwendet. Kolonien, die ein passendes PCR-Produkt liefern, werden weiter in Flüssigmedium kultiviert. Die Plasmide wurden mit dem GenElute Plasmid Miniprep Kit isoliert. Die kompletten Inserts inklusive flankierender Sequenzen des Vektors wurden durch die Firma SeqLab (Göttingen, D) sequenziert.

Die für diese Arbeit klonierten oder mutierten Konstrukte sind im Abschnitt 2.1.9 aufgelistet.

2.2.4 *Site-directed mutagenesis*

Die gezielte Mutagenese wurde in Anlehnung an das ‚Quickchange‘ Protokoll von Stratagene (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) vorgenommen. Die anhand des Protokolls konstruierten *primer* sind in der Tabelle 2.1.7 aufgelistet.

Für die PCR-Reaktion wurde jedoch als Polymerase die Pfu-Polymerase mit *proof-reading* Funktion verwendet. Die Zykluszahl wurde im Gegensatz zum Stratagene Protokoll auf 20 erhöht. Die methylierte *template* DNA wurde nach der PCR-Reaktion durch den Zusatz von DpnI eliminiert. 2µl des PCR-Ansatzes wurden verwendet um, wie oben beschrieben, XL1-Blue Bakterien zu transformieren.

2.2.5 *In-vitro* Transkription

Für die *in-vitro* Transkription der Triphosphat-RNA muss zunächst ein geeignetes *template* hergestellt werden. Das *template* besteht aus dem *T7 promotor* und der zu transkribierenden Sequenz. Das *template* wird in zwei Schritten hergestellt: zunächst wurde der *T7 promotor* mit den DNA Oligonukleotiden 2.2s oder 2.2as hybridisiert (Sequenz siehe Abschnitt 2.1.10). Diese Hybridisierung ist möglich, weil die DNA Oligonukleotide 2.2s und 2.2as neben der Zielsequenz einen zu dem *T7 promotor* komplementären Sequenzabschnitt aufweisen. Für die Hybridisierung wurde 2µl *T7 promotor primer*, 2µl 2.2s oder 2.2as Oligonukleotid mit 10µl H₂O fünf Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. In einem zweiten Schritt müssen die hybridisierten Oligonukleotide ‚aufgefüllt‘ werden, um einen vollständigen Doppelstrang herzustellen. Hierfür wurden dem o.g. Ansatz 2µl dNTPs, 2µl *Klenow* Puffer, 1µl *Exo-Klenow Fragment* (DNA Polymerase) und 5µl H₂O zugegeben. Dieser Ansatz wird 30 Minuten bei 37°C inkubiert und zur Denaturierung der Polymerase auf 70°C erhitzt.

Entsprechend der Herstellerangaben wurden diese *templates* verwendet, um mit dem *MEGashortscript T7 Kit* (Ambion) 5'-Triphosphat-RNA zu synthetisieren. Für die Synthese der doppelsträngigen Triphosphat-RNA wurden die beiden Ansätze für 2.2s und 2.2as zusammen pipettiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Ebenfalls entsprechend Herstellerprotokoll des *MEGashortscript T7 Kit* wurde ein DNase Verdau und eine Phenol-Chloroform Fällung durchgeführt. Um verbleibende einzelne Nukleotide und kurze Nebenprodukte zu entfernen, wurde eine Aufreinigung mit *Mini Quick Spin Oligo Columns* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben angeschlossen.

2.3 Zellkultur

Alle Experimente wurden mit Zellen der Hek293 Tumorzelllinie durchgeführt (Ursprung: humane embryonale Nierenzellen, Herkunft: ATCC). Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Als Medium wurde das oben beschriebene DMEM-Vollmedium verwendet. Die Handhabung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer ‚Lamin Air Flow‘-Werkbank. Die Zelllinie wurde durch ein externes Labor mehrfach auf eine Infektion mit Mycoplasmen geprüft. Zur genauen Bestimmung der Zellzahlen wurde Trypanblau verwendet.

2.4 Luciferase Assay

Bei der hier verwendeten Form des Luciferase Assays wird die *firefly*-Luciferase durch den IFN- β -Promotor gesteuert und dient somit als Maß für die IFN- β -Induktion. Die *renilla reniformis*-Luciferase unter der Kontrolle des CMV-Promotors dient der Normalisierung.

Für den Assay wurden 20×10^4 Hek293 Zellen in 96-*well*-Platten mit 100 μ l Medium ausplattiert. Nach Anwachsen wurden je 40ng der *firefly*-Luciferase- und *renilla*-Luciferase-Konstrukte und die in den Experimenten angegebene Menge weiterer Plasmide transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde mit einem Plasmid, das GFP enthält, auf 200ng gebracht. Zur Transfektion wurde 0,5 μ l Genejuice entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Nach 24h wurden die Zellen mit den in den Experimenten angegebenen Nukleinsäuren oder Sendai Virus stimuliert. Bei der Transfektion der immunstimulatorischen RNA wurde Lipofectamin entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet (200ng RNA komplexiert mit 0,5 μ l Lipofectamin pro *well*).

18 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen mit *passive lysis buffer* lysiert. Die Aktivität der *firefly*- und *renilla*-Luciferase wurde entsprechend durch Zusatz des Luciferase Assay Kits oder Coelenterazine mit einem Mithras Multiplate-Reader gemessen. Jede Bedingung wurde in Triplikaten durchgeführt und ausgelesen. Die entsprechende Standardabweichung ist im Ergebnisteil graphisch dargestellt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Co-Immunpräzipitation

Für die Co-Immunpräzipitation wurden 2×10^6 Hek293 Zellen in 6-well Platten ausplattiert. Nach Anwachsen wurden von den entsprechenden Plasmiden je $2,5 \mu\text{g}$ transfiziert. Die Gesamtmenge an transfizierter DNA wurde mit dem GFP-Plasmid auf $5 \mu\text{g}$ gebracht. Zur Transfektion wurde $5 \mu\text{l}$ Genejuice entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

Die Zellen wurden 40h später mit $5 \mu\text{g}$ poly(I:C) und $15 \mu\text{l}$ Lipofectamin transfiziert bzw. stimuliert. 6h nach Stimulation wurden die Zellen abgelöst, mit PBS gewaschen und das Pellet mit $500 \mu\text{l}$ Standard Lysis-Buffer lysiert. $40 \mu\text{l}$ des Lysates wurden mit $20 \mu\text{l}$ Laemmli-Puffer aufgekocht und eingefroren (*input*). Lysate wurden mit $20 \mu\text{l}$ *anti-FLAG-beads*, die zuvor mit PBS gewaschen wurden, bei 4°C eine Stunde lang inkubiert. $40 \mu\text{l}$ des Überstands (*supernatant*) wurden mit $20 \mu\text{l}$ Laemmli-Puffer aufgekocht und weggefroren. Anschließend wurden die *beads* drei mal mit TBS gewaschen. Die *beads* wurden mit $5 \mu\text{l}$ FLAG-Peptid und $20 \mu\text{l}$ TBS für 10 min. bei RT inkubiert. Das abzentrifugierte Eluat wurde wiederum mit $20 \mu\text{l}$ Laemmli-Puffer aufgekocht (IP-Fraktion).

2.5.2 Western Blot

Für Western Blots der Co-Immunpräzipitation wurden die *input*-, *supernatant*- und IP-Fraktion, wie im Abschnitt 2.5.1 beschrieben, zur Gelelektrophorese eingesetzt.

Für die Western Blots der Expressionsanalyse (Abschnitt 3.1) wurden 6×10^5 Hek293 Zellen in 6-well-Platten ausplattiert. Nach Anwachsen wurden die Zellen mit $1 \mu\text{g}$ des entsprechenden Plasmids und $1,5 \mu\text{l}$ Genejuice transfiziert und nach 24h lysiert. Die Protein Konzentration wurde mit dem *Biorad DC ProteinAssay* gemessen und die aufgetragene Menge später dementsprechend standardisiert. Das Lysat wurde mit $50 \mu\text{l}$ Laemmli-Puffer aufgekocht und für die Gelelektrophorese verwendet.

Die Gelelektrophorese wurden bei einer Stromstärke von 30mA mit 10%igen NuPage Bis-Tris Gelen durchgeführt. Der anschließende Blot auf PVDF Membranen wurde wahlweise *semi-dry* oder *wet* mit dem entsprechenden Biorad-System und NuPage Puffern durchgeführt.

Die PVDF Membran wurde mit 5% Trockenmilchpulver in PBS geblockt. Der Primärantikörper (anti-HA oder anti-FLAG) wurde in einer Konzentration von 1:1000

bis 1:2000 aufgetragen und über Nacht inkubiert. Nach mehreren Waschschritten wurde der Sekundärantikörper in einer Konzentration von 1:1000 bis 1:3000 (anti-rabbit oder anti-mouse) aufgetragen. Die Membranen wurden mit dem *Amersham ECL detection reagent* unter einem Alphaimager analysiert. Ggf. wurden die Membranen nach der ersten Analyse mit einem Mercaptopurin-haltigem *stripping*-Puffer behandelt und erneut mit Primär- und Sekundärantikörper inkubiert.

2.6 Bioinformatische Methoden

2.6.1 *Sequence alignments*

Multiple sequence alignments wurde mit Clustal Omega produziert (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).⁷⁶ Für die Visualisierung der *alignments* und der Sekundärstrukturen wurde Jalview benutzt (<http://www.jalview.org/index.html>).⁷⁷

2.6.2 Software

Schmelztemperaturberechnungen für Klonierungs- und Mutagenese-*primer*, *virtual cloning*, und *contig*-Analyse der Sequenzierungsergebnisse wurden mit der Lasergene Software von DNASTar (Madison, USA) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionskontrolle der neu klonierten Plasmide

Um die Funktion der drei RLHs und insbesondere von LGP2 zu untersuchen, wurden die drei Helikasen in ein einheitliches Vektorsystem kloniert. Die Funktion des Proteins LGP2 sollte außerdem im Hinblick auf seine einzelnen Domänen untersucht werden. Daher wurden die zwei Domänen, LGP2-N (AS 1-468) und LGP2-RD (AS 476-678), ebenfalls in dasselbe Vektorsystem kloniert. In der RIG-I-RD stellt das Cystein-*Cluster* ein zentrales Strukturmerkmal dar.⁴³ Um das analoge Cystein-*Cluster* innerhalb der RD von LGP2 untersuchen zu können, wurde die Mutante C615A per *site-directed mutagenesis* hergestellt.

Alle diese Konstrukte wurden inklusive der flankierenden Sequenzen des Vektors vollständig sequenziert. Zusätzlich wurde die Menge des exprimierten Proteins nach Transfektion des entsprechenden Plasmids mittels Western Blot analysiert.

Wie in Abbildung 3.1 gezeigt, werden die Volllängen-Proteine der drei Helikasen deutlich und auf ähnlich hohem Niveau exprimiert. Die Plasmide der LGP2-Domänen wurden analog zu den funktionellen Experimenten in unterschiedlichen Konzentrationen transfiziert. Das Volllängen-Protein, LGP2-N und LGP2-RD erscheinen im Vergleich zu dem hier nicht gezeigten Größen-Marker auf den jeweils passenden Höhen (76 kDA, 53kDA und 23kDA). Eine unspezifische Bande ist mit *gekennzeichnet. Unterhalb der RD-Bande erscheint außerdem ein zusätzliches Abbauprodukt des LGP2-RD-Proteins.

Die Überprüfung der Expression der LGP2-C615A-Mutante ist besonders wichtig, da die Mutation das strukturell wichtige Cystein-*Cluster* unterbricht und ein in der Folge fehlerhaft gefaltetes Protein nur unzureichend exprimiert werden könnte. Die Expression der LGP2-C615A-Mutante entspricht jedoch der des *wild-type* Proteins.

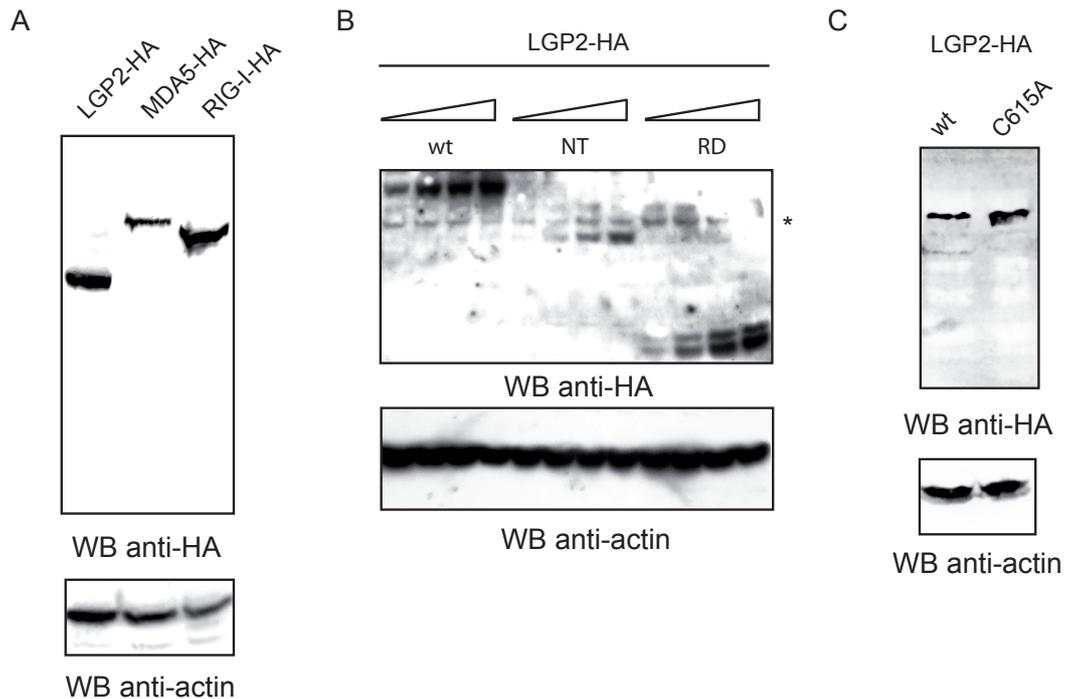


Abb. 3.1 Expressionskontrolle der neu klonierten Plasmide.

(A und C) HEK293 Zellen wurden mit den jeweils gleichen Mengen der Plasmide für Vollängen-RIG-I, -MDA5, -LGP2 und -LGP2-C615A transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen lysiert und der entsprechende Western Blot mit anti-HA und anti- β -actin Antikörpern analysiert. (B) Die Konstrukte der LGP2-Domänen wurden analog zu den funktionellen Experimenten in unterschiedlichen Konzentrationen aufgetragen.

3.2 LGP2 inhibiert die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I

Die Mehrheit der Studien zur Funktion von LGP2 zeigen, dass LGP2 auf RIG-I einen inhibierenden Effekt ausübt.⁶⁸⁻⁷⁰ Die murine *knock-out*-Studie von Satoh et al. stellt dieses Konzept jedoch in Frage und sieht in Bezug auf die Erkennung von 5'-Triphosphat-RNA keinen Unterschied der IFN-Antwort in An- oder Abwesenheit von LGP2.⁷¹

Um die Funktion von LGP2 in Bezug auf die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I zu untersuchen, wurde RIG-I mit einer aufsteigenden Menge von LGP2 in HEK293 Zellen ko-exprimiert und mit 5'-Triphosphat-RNA stimuliert. Wie erwartet zeigt sich in Anwesenheit von LGP2 eine Inhibition der Aktivität des IFN- β -Promotors (siehe Abbildung 3.2.). Diese Inhibition ist offensichtlich konzentrationsabhängig und proportional zur Menge des exprimierten LGP2. Mögliche Erklärungen für diese Konzentrationsabhängigkeit, sind z.B. kompetitive

Mechanismen im Bereich der Liganden-Bindung oder der *downstream*-gelegenen Signalkaskade.

Im Übrigen ist die endogene Expression von RIG-I offenbar so gering, dass bei Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA ohne Überexpression von RIG-I keine Aktivität des IFN- β -Promotors gemessen werden kann.

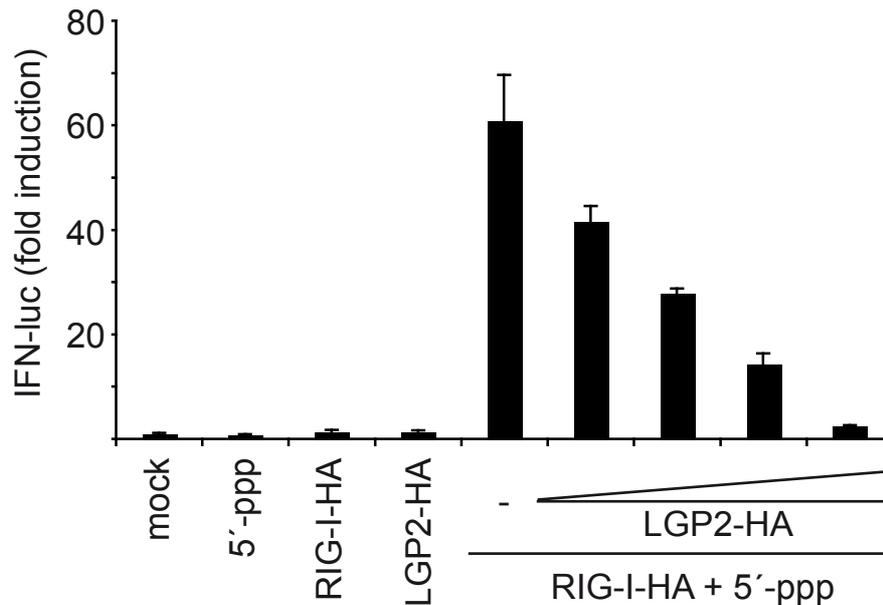


Abb. 3.2 LGP2 inhibiert die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I.

Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für RIG-I (10ng), LGP2 (2ng, 5ng, 10ng, 50ng) und dem Luciferase IFN- β -Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit 5'-Triphosphat-RNA (5'-ppp) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.3 LGP2 wirkt synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5

Während frühere Untersuchungen einen inhibierenden Effekt von LGP2 auf das MDA5-Signal vermuteten, zeigten murine LGP2-*knock-out*-Studien eine reduzierte IFN-Antwort bei Stimulation mit MDA5-abhängigen Liganden.^{40,70,71}

Um die Funktion von LGP2 in Bezug auf die poly-(I:C)-Erkennung durch MDA5 zu untersuchen, wurde MDA5 mit einer aufsteigenden Menge von LGP2 exprimiert und mit poly(I:C) stimuliert (siehe Abbildung 3.3, oberes Panel). Dabei zeigt sich in Anwesenheit von LGP2 eine gesteigerte IFN- β -Promotor-Aktivität. Diese Ko-

Stimulation zeigt (im Ggs. zu der LGP2-vermittelten RIG-I-Inhibition) ein Optimum in dem Bereich, in dem LGP2 und MDA5 in stöchiometrisch ungefähr übereinstimmender Menge exprimiert werden. Die Expression von LGP2 ohne MDA5-Überexpression kann nach Stimulation mit poly(I:C) keine IFN-Antwort induzieren (siehe Abbildung 3.3 unteres Panel). Ebenso wird keine IFN-Induktion beobachtet bei Überexpression von LGP2 und MDA5 ohne Stimulation (siehe Abbildung 3.3 unteres Panel).

Als Mechanismus des LGP2-MDA5-Synergismus könnte eine Heterokomplexbildung vermutet werden, die für die Erkennung des Liganden und der entsprechenden Signaltransduktion notwendig ist. Diese Hypothese wird gestützt durch die Tatsache, dass sowohl die LGP2-RD als auch MDA5 in der Lage sind, dsRNA zu binden und die unter Abschnitt 3.9 demonstrierte direkte Interaktion von MDA5 und LGP2.^{46,68,69}

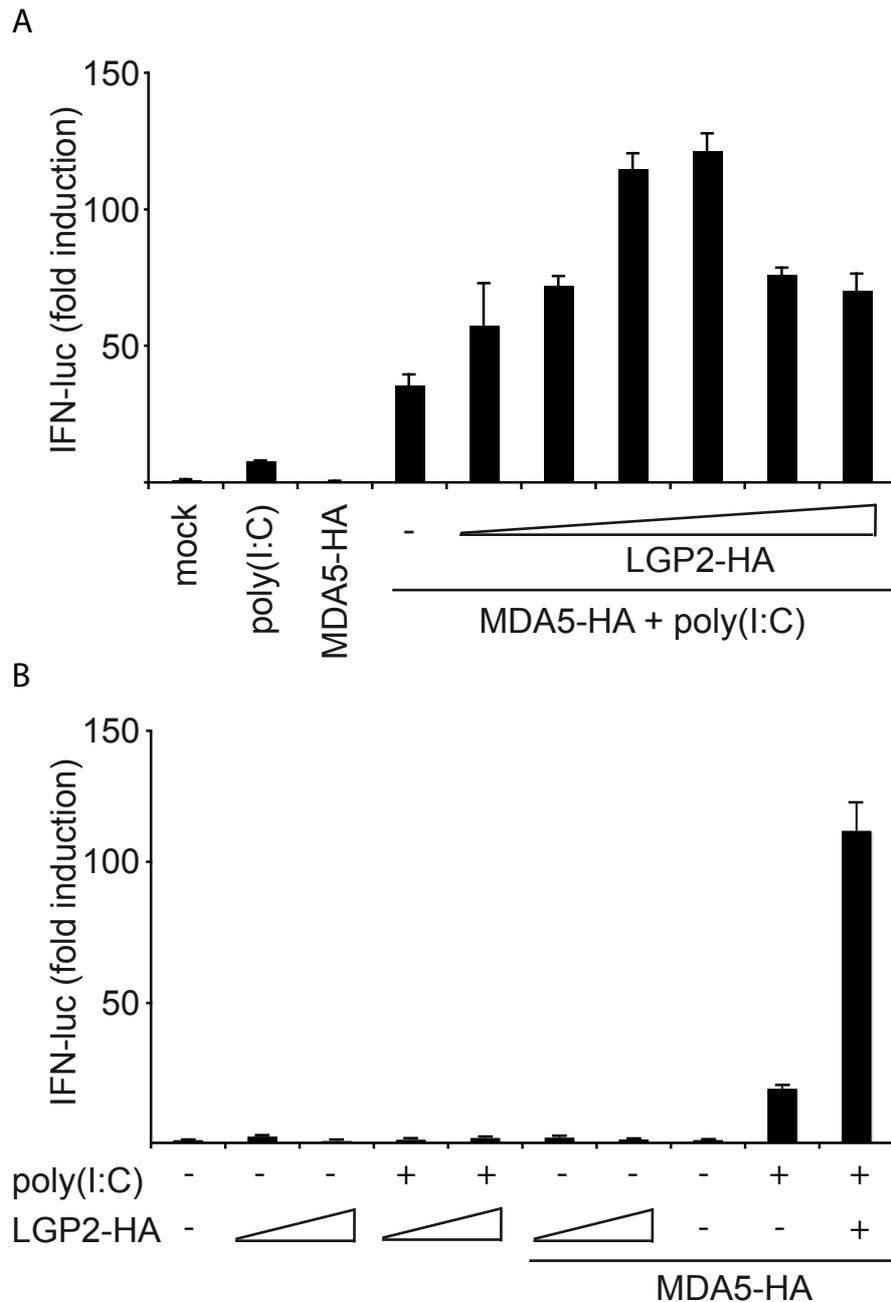


Abb. 3.3 LGP2 wirkt synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5. (A) Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für MDA5 (1ng), LGP2 (0,05ng, 0,1ng, 1ng, 5ng, 50ng, 100ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit poly(I:C) stimuliert. (B) Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für MDA5 (10ng), LGP2 (10ng oder 100ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. In der zehnten Bedingung wurden LGP2 (10ng) und MDA5 (10ng) transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit poly(I:C) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.4 LGP2-N und LGP2-RD inhibieren die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I

Um den jeweiligen Beitrag der beiden LGP2-Domänen an der RIG-I-Inhibition zu untersuchen, wurden neben RIG-I das Volllängen-LGP2-Protein (LGP2 wt), die DExH-Domäne (LGP2-N) und die regulatorische Domäne (LGP2-RD) exprimiert. Die ursprüngliche Charakterisierung der regulatorischen Domäne hatte bereits einen inhibierenden Effekt auf das RIG-I-Signal gezeigt.⁴² Dieser inhibitorische Effekt zeigt sich in unserem experimentellen System allerdings nicht nur für die regulatorische Domäne, sondern auch für die N-terminale DExH-Domäne (siehe Abbildung 3.4). Die Hemmung der IFN-Induktion durch jede einzelne Domäne fällt im Gegensatz zum Volllängen-LGP2-Protein jedoch geringer aus. Diese Beobachtung deckt sich mit einem Struktur-Funktions-Modell, bei dem sowohl die LGP2-RD als auch LGP2-N als Liganden-Bindestelle fungieren und kompetitiv an den RIG-I-Liganden binden könnten.

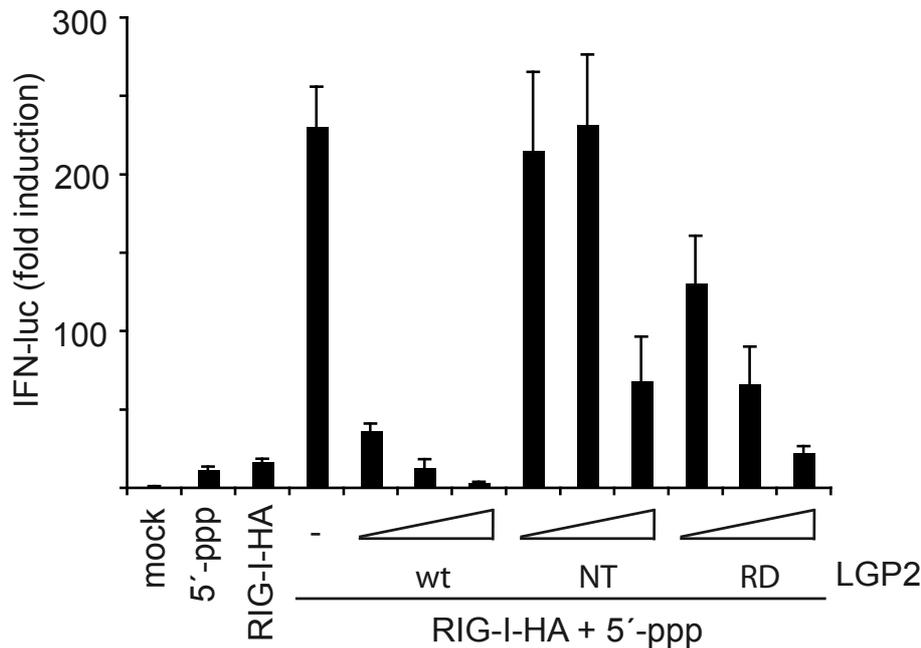


Abb. 3.4 Voll-längen LGP2, LGP2-N und LGP2-RD inhibieren die RIG-I vermittelte 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung.

Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für RIG-I (10ng) LGP2, LGP2-N und LGP2-RD (je 10ng, 25ng, 50ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit 5'-Triphosphat-RNA (5'-ppp) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.5 Nur Voll-längen-LGP2 und nicht LGP2-N oder LGP2-RD wirken synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5

Um den jeweiligen Beitrag der beiden LGP2-Domänen in Bezug auf den LGP2-MDA5-Synergismus zu untersuchen, wurden neben MDA5 das Voll-längen-LGP2-Protein (LGP2 wt), die DExH-Domäne (LGP2-N) und die regulatorische Domäne (LGP2-RD) exprimiert. Wie bereits im Abschnitt 3.2 geschildert, zeigt sich eine klare Ko-Stimulation der MDA5-vermittelten Erkennung von poly(I:C) durch Ko-Expression des Voll-längen-LGP2. Bei der Ko-Expression der LGP2-DExH- und RD-Domäne kann jedoch keine zusätzliche IFN-Induktion beobachtet werden (siehe Abbildung 3.5).

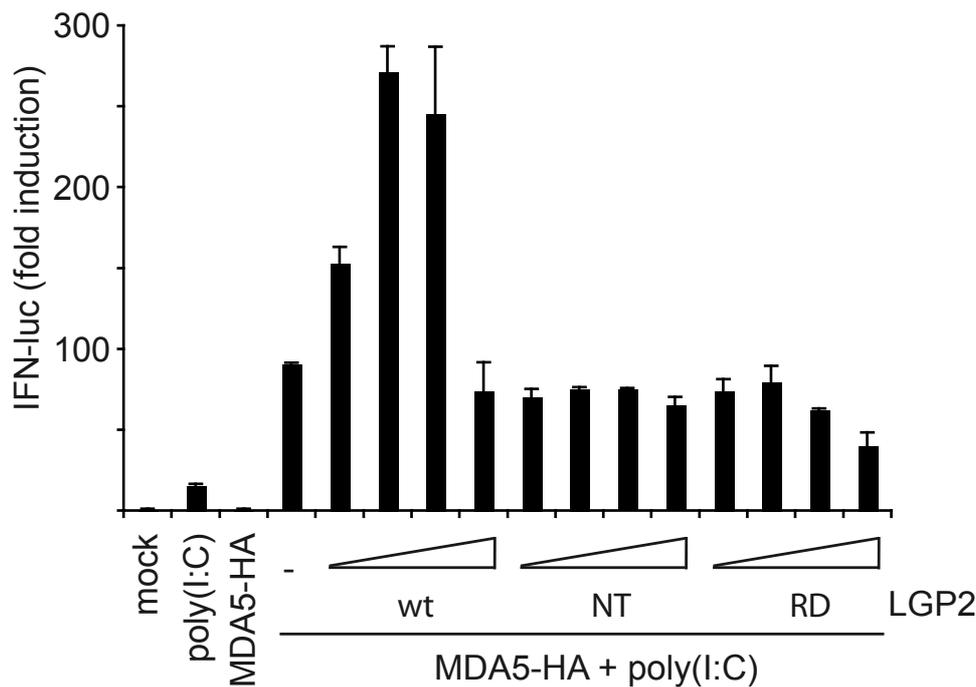


Abb. 3.5 Nur Volllängen-LGP2 wirkt synergistisch auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5.

Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für MDA5 (1ng), LGP2, LGP2-N und LGP2-RD (je 0,1ng, 1ng, 5ng, 10ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit poly(I:C) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.6 Die regulatorische Domäne des Proteins LGP2 ist durch ein hoch konserviertes Cystein-Cluster gekennzeichnet

Die von Cui et al. ermittelte Kristall-Struktur der RIG-I-RD zeigt als wesentliches Strukturmerkmal vier Cystein-Reste, die ein zentrales Zink-Atom binden.⁴³ Dieses Cystein-Cluster konnte in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hopfner ebenso in der Kristallstruktur der LGP2-RD und auch in der per *homology-modeling* ermittelten MDA5-RD-Struktur nachgewiesen werden.⁴⁶

Das Cystein-Cluster zeigt sich zudem streng konserviert, nicht nur innerhalb verschiedener Vertebraten-Spezies, sondern auch innerhalb der *RIG-I-like helicases* (siehe Abbildung 3.6). Neben der aus den Strukturanalysen offenkundigen Bedeutung des Cystein-Clusters für die Tertiärstruktur der RD deutet die strenge Konservierung auf eine zentrale, wenn nicht essentielle Rolle für die Struktur und Funktion der

regulatorischen Domäne hin. Daher wurden LGP2-Plasmide mit den Punktmutationen C615A und C556A hergestellt. Nur die LGP2-C615A-Mutante wurde effizient exprimiert und konnte im Folgenden funktionell untersucht werden (siehe Abbildung 3.1, unzureichende Expression der LGP2-C556A-Mutante nicht gezeigt).

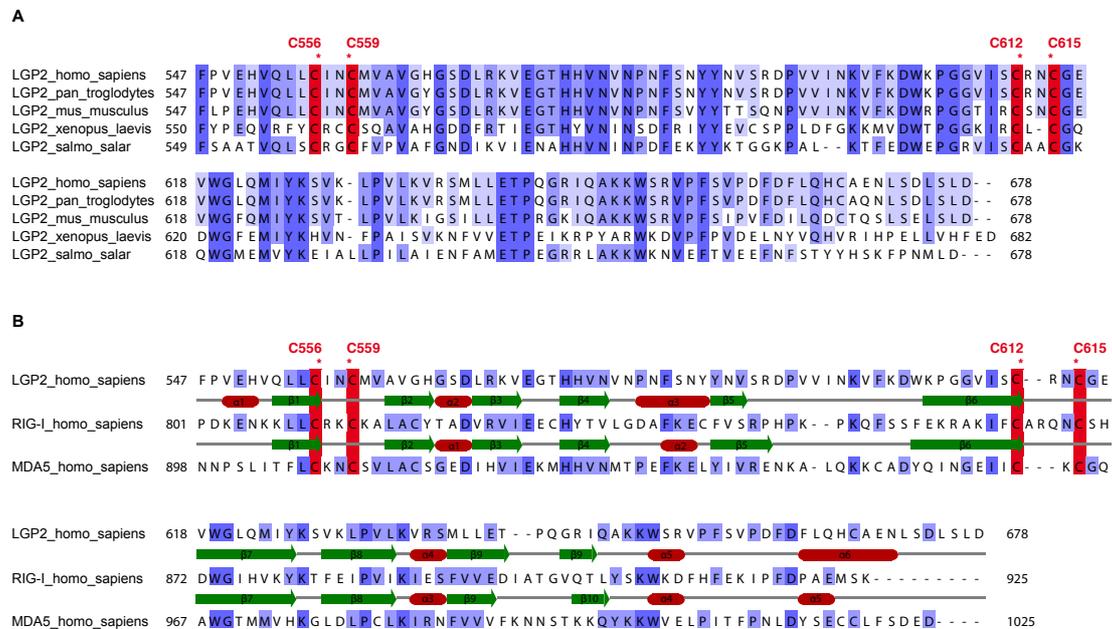


Abb. 3.6 Die LGP2-RD ist durch ein hoch konserviertes Cystein-Cluster gekennzeichnet.

(A) Das *alignment* der LGP2-RD-Sequenzen verschiedener Organismen wurde mit Clustal Omega erstellt. (B) Das *alignment* der LGP2-, RIG-I und MDA5-RD ist zusätzlich mit der von Cui et al. und Pippig et al. kristallographisch ermittelten Sekundärstruktur von LGP2 und RIG-I annotiert (alpha-Helices in rot, beta-Faltblätter in grün). Konservierte Aminosäuren sind violett unterlegt. Die Cystein-Reste des Cystein-Clusters wurden manuell rot unterlegt und mit der entsprechenden Position annotiert.

3.7 Die LGP2-vermittelte RIG-I-Inhibition wird durch die Mutation C615A nur teilweise reduziert

Um die Bedeutung des LGP2 Cystein-Clusters für die RIG-I-inhibitorische Funktion von LGP2 zu untersuchen, wurde Wildtyp-LGP2 und die LGP2-C615A-Mutante mit RIG-I ko-exprimiert. Als Stimulus wurde Sendai Virus verwendet, welches als Ligand für RIG-I gut etabliert ist.^{54,56} Es zeigt sich nach der Sendai Virus Infektion eine RIG-I-abhängige IFN-Induktion, die durch die Ko-Expression von Wildtyp-LGP2 inhibiert werden kann. Im Vergleich verliert die LGP2-C615A-Mutante zwar einen

Teil der inhibitorischen Potenz, kann aber weiterhin die RIG-I-Aktivität deutlich und Dosis-abhängig inhibieren (siehe Abbildung 3.7).

Bei der LGP2-C615A-Mutante ist die Struktur (und mutmaßlich die Funktion) der RD unterbrochen, während die DExH-Domäne vollständig erhalten bleibt. Daher entspricht dieser partielle Funktionsverlust der LGP2-C615A-Mutation der oben geschilderten Beobachtung, dass die einzelnen LGP2-Domänen unabhängig voneinander die RIG-I vermittelte IFN-Induktion supprimieren können.

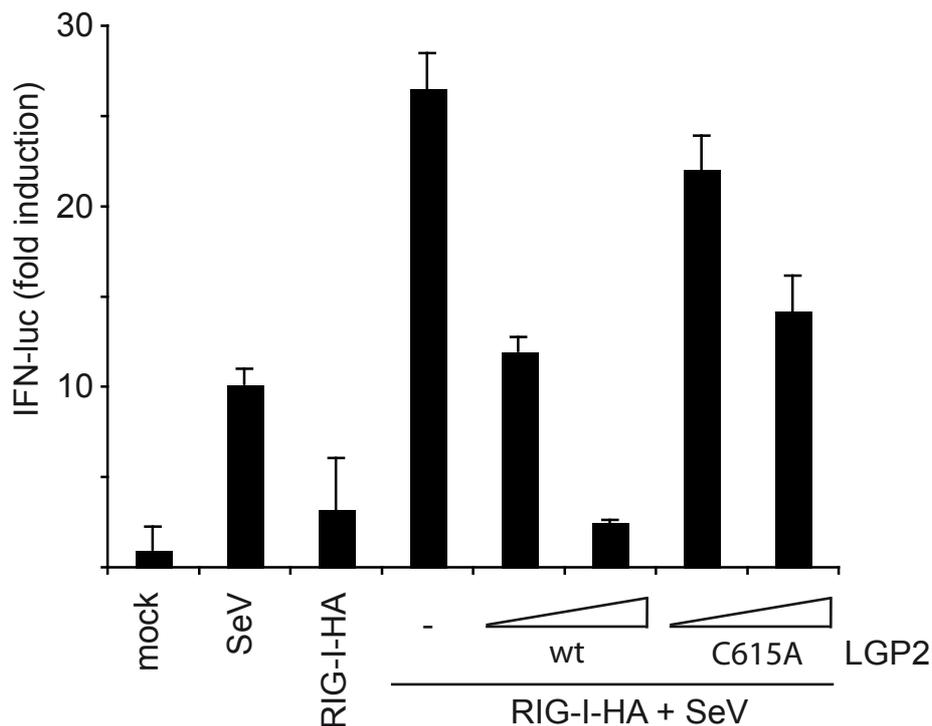


Abb. 3.7 LGP2-C615A inhibiert die Sendai Virus-Erkennung durch RIG-I. Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für RIG-I (1ng), Wildtyp-LGP2 und LGP2-C615A (je 10 und 100ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit 200 U Sendai Virus (SeV) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.8 Die Integrität der LGP2-RD ist Voraussetzung für den LGP2-MDA5-Synergismus

Um die Bedeutung des Cystein-Clusters in Bezug auf den LGP2-MDA5-Synergismus zu untersuchen, wurden neben MDA5 das Wildtyp-LGP2 sowie die LGP2-C615A-Mutante exprimiert. Nach Stimulation mit poly(I:C) zeigt sich, wie bereits im Abschnitt 3.3 geschildert, ein Synergismus zwischen MDA5 und LGP2. Dieser

Synergismus wird durch die LGP2-C615A-Mutation jedoch vollständig unterbrochen (siehe Abbildung 3.8). Für die volle MDA5-Aktivierung muss LGP2 also in voller Länge (siehe Abschnitt 3.5) und mit intakter LGP2-RD exprimiert werden.

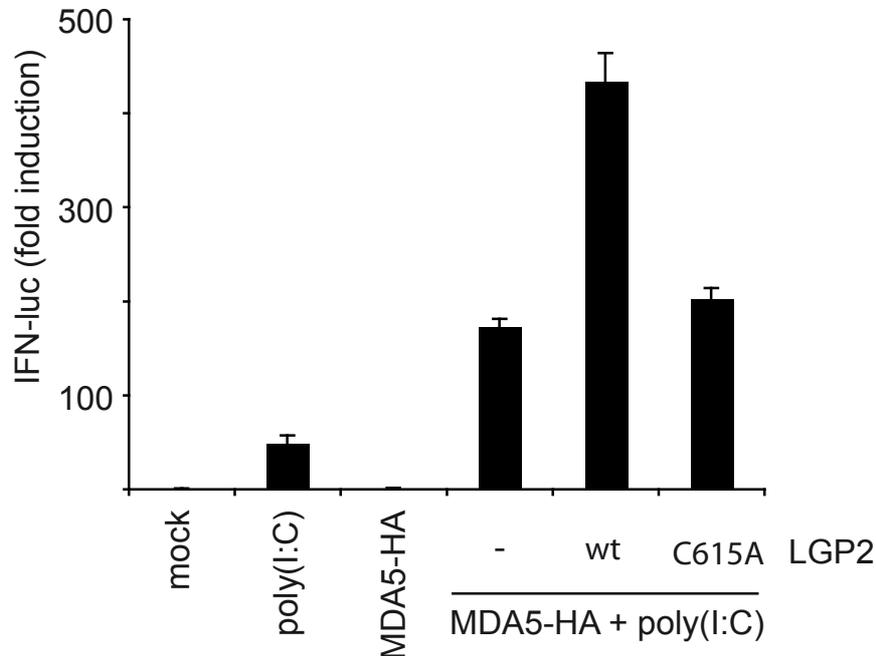


Abb. 3.8 Die LGP2-C615-Mutante wirkt im Gegensatz zu Wildtyp-LGP2 auf die poly(I:C)-Erkennung durch MDA5 nicht synergistisch.

Hek293 Zellen wurden mit den Plasmiden für MDA5 (1ng), Wildtyp-LGP2 und LGP2-C615A (je 1ng) und dem Luciferase-Reporter-System transfiziert. Die entsprechend gekennzeichneten Bedingungen wurden 24h später mit 200ng poly(I:C) stimuliert. Die Aktivität des IFN- β -Promotors wurde, wie im Abschnitt 2.4 beschrieben, bestimmt.

3.9 Die Integrität der LGP2-RD ist Voraussetzung für die Bildung des LGP2-MDA5-Heterokomplex

Ein möglicher Mechanismus des Synergismus zwischen MDA5 und LGP2 ist eine direkte Protein-Protein-Interaktion. Diese Protein-Protein Interaktion könnte beispielweise notwendig sein, um als Komplex einen Liganden binden zu können oder um die Interaktion mit *downstream* gelegenen Adaptorproteinen zu ermöglichen. Um eine mögliche MDA5-LGP2-Interaktion zu untersuchen, wurden Co-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dazu wurde MDA5 mit einem *flag-tag* und LGP2-Wildtyp bzw. die LGP2-C615A-Mutante mit einem *HA-tag* exprimiert. Mit und ohne Stimulation wurde MDA5 mit *anti-flag beads* präzipitiert. Die einzelnen

Fractionen (*input*, *supernatant*, *immunprecipitation*) wurden per Western Blot auf MDA5 und LGP2 untersucht.

In der IP-Fraktion zeigt sich unabhängig von der Stimulation ein deutlicher Nachweis des Wildtyp-LGP2-Proteins. Die LGP2-C615A-Mutante kann in der IP-Fraktion mit und ohne Stimulation jedoch nicht nachgewiesen werden. Für die Bildung des LGP2-MDA5-Heterokomplex muss also eine intakte LGP2-RD vorliegen.

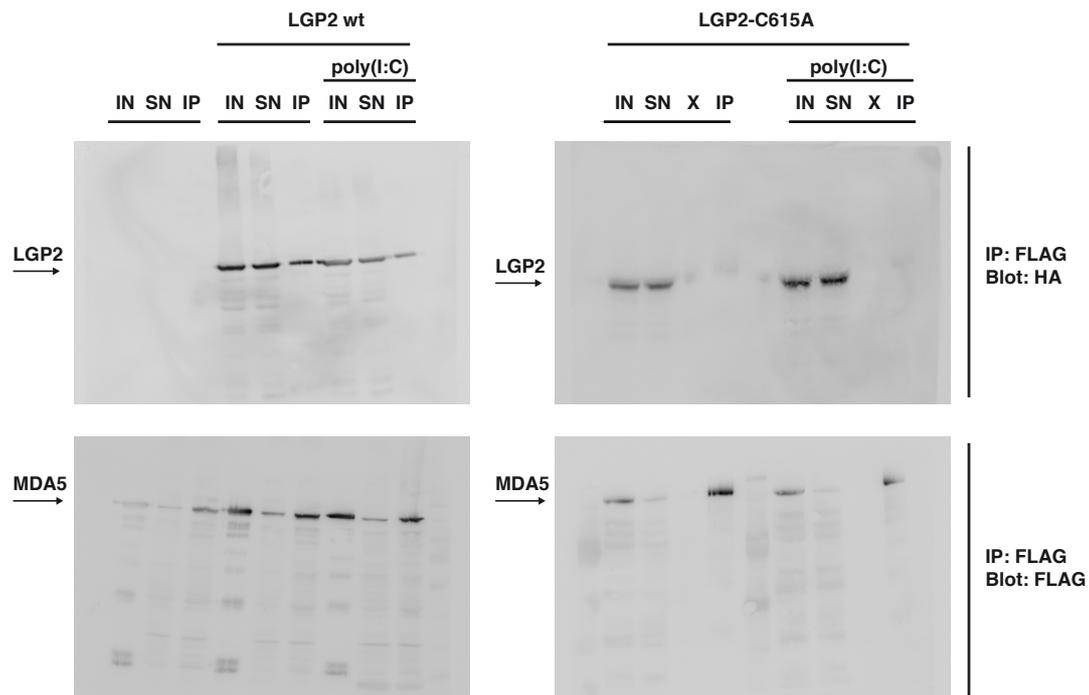


Abb. 3.9 Die LGP2-C615A-Mutante bildet im Gegensatz zu Wildtyp-LGP2 keinen Heterokomplex mit MDA5.

Hek293 Zellen wurden mit MDA5-FLAG, Wildtyp-LGP2-HA und der Mutante LGP2-C615A-HA transfiziert. 40h nach Transfektion wurden die Zellen mit poly(I:C) stimuliert und 6h später lysiert. Für die Immunpräzipitation wurden anti-FLAG *beads* benutzt. *Input*- (IN), *supernatant*- (SN) und *immunprecipitation*- (IP) Fraktionen wurden wie unter 2.5.1 beschrieben hergestellt. Mit "X" markierte Bahnen wurden nicht beladen. Die Membranen wurden mit anti-HA und anti-rabbit Antikörper behandelt (oberes Panel). Nach der ersten Aufnahme wurde die Membran gestrippt und mit anti-FLAG und anti-mouse Antikörper analysiert (unteres Panel).

4 Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der RLH LGP2 in Bezug auf die RIG-I- und MDA5-vermittelte Typ-I-Interferon-Induktion. Dabei wurde neben dem Volllängen-Protein auch die Funktion der einzelnen Domänen (LGP2-N und LGP2-RD) und des Cystein-*Clusters* der LGP2-RD untersucht.

Eine wichtige Voraussetzung für diese Untersuchungen war die Klonierung der entsprechenden Konstrukte in ein einheitliches Vektor-System. Die adäquate Expression auf Protein-Ebene konnte für alle in der Arbeit verwendeten Konstrukte per Western Blot bestätigt werden.

In Bezug auf die RIG-I-Aktivität zeigte die Überexpression von LGP2 die bereits zuvor beschriebene inhibitorische Wirkung. Im Gegensatz dazu führte die Ko-Expression von LGP2 bei der MDA5-vermittelten p(I:C)-Erkennung zu einer gesteigerten Interferonantwort.

Die einzelnen LGP2-Domänen LGP2-N und LGP2-RD sind wie das Volllängen-Protein in der Lage die RIG-I-vermittelte Interferon-Induktion nach 5'-Triphosphat-RNA-Stimulation zu bremsen. Verglichen mit dem Volllängen-Protein weisen sie jedoch eine deutlich geringere inhibitorische Potenz auf. Bei der MDA5-vermittelten Interferon-Induktion nach p(I:C)-Stimulation konnte keine Auswirkung durch die Ko-Expression der einzelnen LGP2-Domänen nachgewiesen werden.

Cui et al. ermittelten 2008 eine Kristall-Struktur der RIG-I-RD und beschrieben als zentrales Strukturmerkmal ein Zink-bindendes Cystein-*Cluster*.⁴³ Die LGP2-RD ist gleichermaßen durch ein Cystein-*Cluster* gekennzeichnet, welches nicht nur zwischen einer breiten Auswahl an Vertebraten, sondern auch innerhalb der *RIG-I-like helicases* streng konserviert ist.

Wird dieses Cystein-*Cluster* durch eine Punktmutation (LGP2-C615A) unterbrochen, bleibt ein Teil der inhibitorischen Wirkung auf die 5'-Triphosphat-RNA-Erkennung durch RIG-I erhalten. Die LGP2-C615A-Mutante zeigt jedoch keinen Einfluss auf die p(I:C)-Erkennung durch MDA5. Im Grunde genommen verhält sich die LGP2-C615A-Mutante also ähnlich der LGP2-N-Domäne. Dies lässt sich am einfachsten

dadurch erklären, dass eine Punktmutation innerhalb des Strukturmotifs zu einem kompletten Funktionsverlust der regulatorischen Domäne führt.

Dieser Funktionsverlust zeigt sich gleichfalls bei der Interaktion mit MDA5: im Gegensatz zum Wildtyp-LGP2-Protein kann die LGP2-C615A-Mutante nicht mit MDA5 co-immunpräzipitiert werden. Ob die beobachtete Co-Immunitäzitation von LGP2 mit MDA5 eine direkte oder indirekte Interaktion darstellt, kann naturgemäß mit dieser Methode nicht beantwortet werden. Die Interaktion ist unter den hier gewählten Bedingungen jedoch unabhängig von der Stimulation mit poly(I:C).

4.2 Mögliche Modelle der LGP2-Funktion

Die bisherigen funktionellen Studien konnten weder eine klare Rolle für LGP2 in Bezug auf die RIG-I- und MDA5-Signalkaskade noch den Mechanismus der jeweiligen LGP2-Funktion etablieren. Ganz im Gegenteil ist eine Vielzahl sehr verschiedener Modelle der LGP2-Funktion vorgeschlagen worden. Die bisherigen Arbeiten zur Funktion von LGP2 werden im Folgenden vor dem Hintergrund dieser Modelle erläutert, um im Anschluss einen Vergleich mit den hier vorliegenden Daten vornehmen zu können. Aus den bisherigen Studien und theoretischen Überlegungen lassen sich insgesamt fünf Modelle der LGP2 Funktion ableiten, die graphisch in der Abbildung 4.1 dargestellt sind.

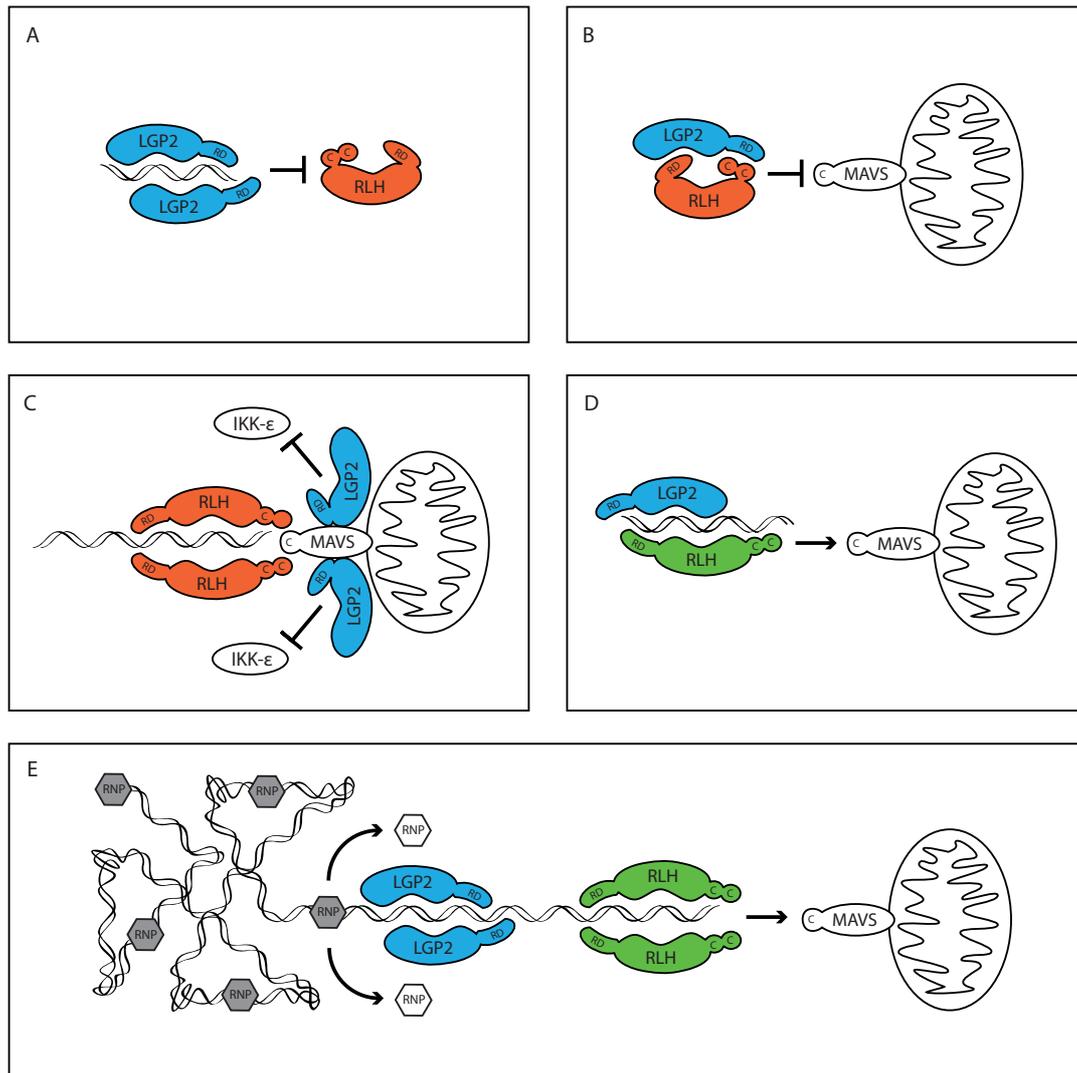


Abb. 4.1. Modelle und Mechanismen der LGP2 Funktion.

Modell A: Sequestrierung. LGP2 bindet RLH-Liganden und verhindert so die Aktivierung von RIG-I oder MDA5. Modell B: inhibitorische Protein-Protein-Interaktion. Durch direkte Interaktion stabilisiert LGP2 die auto-inhibitorische Konformation der anderen RLH. Modell C: *downstream*-Blockierung der Signalkaskade. Die Interaktion von LGP2 mit MAVS an der IKK-ε-Bindestelle führt zu einer Liganden-unabhängigen Hemmung der RLH-Signalkaskade. Modell D: stimulatorische Protein-Protein-Interaktion. Durch Bildung von LGP2-RLH-Heterokomplexen ermöglicht LGP2 die Liganden Bindung und Aktivierung der Signalkaskade. Modell E: *upstream*-RNA-Prozessierung. LGP2 macht komplex strukturierte RNA-Liganden durch Entwinden und Entfernung von Ribonukleoproteinen der Erkennung durch RIG-I und MDA5 zugänglich. Die RLH (RIG-I und/oder MDA5) ist bei stimulatorischer LGP2-Funktion in grün und bei inhibitorischer LGP2-Funktion in rot dargestellt.

Die ersten funktionellen Untersuchungen von Rothenfusser et al. und Yoneyama et al. zeigten, dass LGP2 die RIG-I-vermittelte Typ-I-Interferon-Induktion konzentrationsabhängig inhibiert.^{68,69} Da außerdem demonstriert wurde, dass LGP2

poly(I:C) binden kann, wurde als Mechanismus der LGP2-vermittelten RIG-I-Inhibition eine Sequestrierung der RLH-Liganden durch LGP2 angenommen (entsprechend Modell A: Sequestrierung, Abbildung 4.1). Im Übrigen führte die Überexpression von RIG-I bei Rothenfusser et al. auch ohne zusätzliche Stimulation durch einen passenden exogenen Liganden zu einer Interferon-Induktion. Im Gegensatz zu dem unten beschriebenen Modell C (*downstream*-Blockierung der Signalkaskade) konnte die LGP2 Überexpression diese ‚Liganden-unabhängige‘ Stimulation nicht inhibieren. Yoneyama et al. postulieren in Bezug auf MDA5 ebenfalls eine inhibitorische Funktion von LGP2 ohne hierfür experimentelle Anhaltspunkte aufzuführen.

Auch Saito et al. beobachten eine Inhibition des RIG-I-Signals durch LGP2.⁴² Die Autoren konnten außerdem eine Liganden-induzierte Änderung der RIG-I-Protein-Konformation und eine RIG-I-Dimerisierung demonstrieren. Diese Konformationsänderung und Dimerisierung ist nach Saito et al. Voraussetzung für die Signalauslösung. Die Expression der RIG-I-RD hemmt sowohl die RIG-I-Dimerisierung als auch die Interferon-Induktion. Da die RIG-I-RD außerdem in Co-Immunpräzipitations-Experimenten mit den RIG-I-CARDS und der Helikase-Domäne interagiert, gehen die Autoren davon aus, dass die Funktion der RIG-I-RD in einer Autoregulation der RIG-I-Aktivität besteht. Weil Vollängen-LGP2 und die LGP2-RD ebenfalls mit RIG-I interagiert und die RIG-I-Dimerisierung unterbindet, schließen die Autoren, dass LGP2 durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion die RIG-I-vermittelte Signalauslösung unterbindet (entsprechend Modell B: inhibitorische Protein-Protein-Interaktion, Abbildung 4.1). Am Beispiel von HCV-RNA wird allerdings auch gezeigt, dass LGP2 RIG-I-Liganden binden kann. Daher nennen Saito et al. (wie zuvor Rothenfusser et al. und Yoneyama et al.) als zweiten, möglichen Mechanismus der RIG-I-Inhibition eine kompetitive Bindung der RIG-I-Liganden durch LGP2 (Modell A: Sequestrierung, Abbildung 4.1).^{42,68,69}

Ein weiteres Modell der inhibitorischen LGP2-Aktivität lieferten Komuro et al. 2006.⁷² In der entsprechenden Studie konnte demonstriert werden, dass LGP2 auch *downstream* der RIG-I-Liganden-Interaktion eine inhibierende Funktion erfüllt: die Typ-I-Interferon-Induktion durch die Überexpression von MAVS oder der konstitutiv aktiven, N-terminalen RIG-I Domäne (RIG-I-N) konnten auch in Abwesenheit eines RLH-Stimulus durch LGP2 inhibiert werden. Durch Co-Immunpräzipitations-Experimente konnte außerdem eine Interaktion von LGP2 mit MAVS demonstriert

werden. Diese Interaktion findet im selben Bereich statt, in dem auch IKK- ϵ bindet. Dementsprechend konnte die Bindung von IKK- ϵ an MAVS durch LGP2 verdrängt werden. Hieraus ergibt sich ein Modell bei dem LGP2 das RIG-I-Signal unterhalb der Rezeptor-Liganden-Bindung inhibiert, indem es die IKK- ϵ -Bindestelle an MAVS blockiert (entsprechend Modell C: *downstream*-Blockierung der Signalkaskade, Abbildung 4.1).

Die erste murine *knock-out*-Studie von Venkatarama et al. konnte entsprechend den hier vorliegenden Daten eine dichotome Wirkung von LGP2 etablieren.⁷⁰ Die LGP2-*knock-out*-Mäuse zeigten sich auf Grund einer höheren IFN- β -Antwort widerstandsfähiger gegen VSV (*vesicular stomatitis virus*, einem RIG-I-Ligand) Infektionen. Bei einer Infektion mit EMCV (*encephalomyocarditis virus*, einem MDA5-Ligand) produzierten die *knock-out*-Mäuse jedoch im Gegensatz zu den *wild typ*-Mäusen weniger Typ-I-Interferon und waren entsprechend anfälliger. Auf Ebene einzelner Zellpopulationen zeigt sich ein etwas vielschichtigeres Bild. In MEFs führt der LGP2-*knock-out* zu einer gesteigerten Typ-I-Interferon-Induktion nach Stimulation mit VSV oder poly(I:C). Die Stimulation von MEFs mit EMCV hingegen wird von dem LGP2-*knock-out* nicht beeinflusst. In Makrophagen und BMDCs wiederum wird nach Stimulation mit EMCV deutlich weniger Typ-I-Interferon produziert. Diese Unterschiede im Verhalten der verschiedenen Zellreihen sind ein Hinweis auf Zelltyp-spezifische Mechanismen des RLH-Systems, die bis dato nicht systematisch untersucht worden sind. Die Tatsache, dass die Interferon-Induktion nach poly(I:C)-Stimulation hier durch LGP2 offenbar negativ reguliert wird, kann dadurch erklärt werden, dass poly(I:C) einen sehr inhomogenen Liganden darstellt, der je nach Länge von RIG-I und/oder MDA5 erkannt werden kann.⁵¹ Der funktionelle Mechanismus der LGP2-Wirkung wird in der Studie nicht beleuchtet. Da jedoch Protein-Protein-Interaktionen der RLHs untereinander bereits mehrfach beobachtet werden konnten (siehe Saito et al. 2007⁴² oder Abschnitt 3.9), ist die Formierung von LGP2-MDA5-Heterokomplexen eine Erklärungsmöglichkeit der LGP2-Abhängigkeit des MDA5-Signals (entsprechend Modell D: stimulatorische Protein-Protein-Interaktion, Abbildung 4.1).

Die Untersuchung einer zweiten LGP2-*knock-out*-Maus von Satoh et al. stehen in deutlichem Gegensatz zu den oben geschilderten Ergebnissen.⁷¹ Hier führte der LGP2-*knock-out* zu einer starken Reduktion der IFN- β -Antwort nach Stimulation mit

EMCV und Mengovirus (MDA5-Liganden), aber auch nach Stimulation mit SeV, JEV und VSV (RIG-I-Liganden). Nach Stimulation mit Influenza Virus, poly(I:C) oder *in vitro* transkribierter dsRNA konnte jedoch kein Unterschied zwischen *Wildtyp*- und *LGP2-knock-out*-Maus festgestellt werden. Die Gruppe konnte außerdem eine Maus mit einer homozygoten *LGP2-K30A*-Mutation generieren bei der die ATPase-Aktivität der Helikase Domäne unterbrochen ist. Die *LGP2-K30A*-Mutante zeigt die gleichen Befunde wie der *LGP2-knock-out*. Die Autoren äußern daher die Vermutung, dass die Funktion von *LGP2* darin bestehen könnte, komplex strukturierte RNA zu entwinden und virale Ribonukleoproteine (RNP) von der RNA zu entfernen. Erst diese Prozessierung erlaubt die Erkennung der viralen RNA durch *RIG-I* und *MDA5* und die konsekutive Aktivierung der *RLH*-Signalkaskade (entsprechend Modell E: *upstream* RNA-Prozessierung, Abbildung 4.1).

4.3 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

In Bezug auf die Hemmung der *RIG-I*-Signaltransduktion decken sich die in dieser Arbeit geschilderten Ergebnisse mit den Beobachtungen von Rothenfusser et al., Yoneyama et al., Komuro et al., Saito et al. und Venkatarama et al.^{42,68-70,72} Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Saito et al. zeigt sich in der hier vorliegenden Arbeit jedoch auch durch die N-terminale Domäne von *LGP2* (*LGP2-N*) eine Dosis-abhängige Inhibition der *RIG-I*-abhängigen Interferon-Induktion. Eine mögliche Erklärung sind unterschiedliche Mechanismen der *RLH*-Signalkaskade in den jeweiligen Zelltypen (Verwendung der Huh7 Zelllinie bei Saito et al., hier Verwendung der Hek293 Zelllinie).

Ein klarer Gegensatz besteht zu den oben geschilderten Ergebnissen der Arbeit von Satoh et al. bei der *LGP2* als positiver Regulator des *RIG-I*-Signals in Erscheinung tritt.⁷¹ Einschränkung muss jedoch festgehalten werden, dass die positive Regulation nur bei bestimmten *RIG-I*-Liganden (SeV, JEV und VSV) festgestellt werden konnte. Für Influenza Virus, *in vitro* transkribierter dsRNA oder poly(I:C) wurde weder durch den *knock-out* noch durch *rescue*-Experimente eine inhibierende oder stimulierende Wirkung von *LGP2* beobachtet. Da diese Experimente in MEFs und BMDCs durchgeführt wurden, sind wieder unterschiedliche Mechanismen der *RLH*-Signalkaskade in den jeweiligen Zelltypen eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Befunde. Wichtiger ist jedoch die Tatsache, dass ein *knock-out* und die

entsprechenden *in vivo* Untersuchungen ein gänzlich anderes Testsystem darstellen. So kann beispielsweise auf die Überexpression eines durch Transfektion eingebrachten Plasmids verzichtet werden. Diese Überexpression durch Transfektion kann erfahrungsgemäß zu einer unphysiologisch hohen Proteinexpression oder anderen Nebeneffekten führen. Im Übrigen wird auch in der Arbeit von Satoh et al. ein Experiment in Hek293 Zellen mit Überexpression von LGP2 durchgeführt. Unter diesen Voraussetzungen wird ähnlich den hier geschilderten Ergebnissen ein inhibierender Effekt der LGP2-Überexpression festgestellt.⁷¹ Dies unterstreicht die Bedeutung Zelltyp-spezifischer Mechanismen der RLH-Signalkaskade und den Einfluss des experimentellen Systems auf diese Mechanismen.

In Bezug auf das MDA5-Signal stellt die hier vorliegende Arbeit die erste, systematische *in vitro* Untersuchung von LGP2 und seinen Domänen dar. Die dabei beobachtete positive Regulation der MDA5-Aktivität durch das Volllängen-LGP2 wird prinzipiell auch in den beiden oben geschilderten *knock-out*-Studien konstatiert - jedoch nur für die MDA5-Liganden EMCV und Mengovirus. Bei Stimulation mit poly(I:C) wird eine negative Regulation durch LGP2 oder gar kein Einfluss beobachtet.^{70,71} Der Gegensatz zu den hier geschilderten Ergebnissen kann am einfachsten dadurch erklärt werden, dass der strukturell sehr heterogene Ligand poly(I:C) unter den dort gewählten Bedingungen von RIG-I und nicht von MDA5 erkannt wurde. Bei Saito et al. zeigt die Ko-Expression von LGP2 mit MDA5 keinen ko-stimulatorischen Effekt.⁴² Als Stimulus wird in diesem Experiment allerdings SeV verwendet, welches von RIG-I und nicht MDA5 erkannt wird. In demselben Experiment werden die konstitutiv aktiven MDA5-CARD-Domänen mit LGP2 ko-exprimiert. Hierbei zeigt sich eine Steigerung der Interferon-Induktion, die von den Autoren jedoch nicht weiter kommentiert wird.⁴²

Zusammenfassend finden sich in den bisher publizierten Arbeiten zur Funktion von LGP2 deutliche Gegensätze (sowohl untereinander als auch zu den hier geschilderten Ergebnissen). Eine Erklärung dieser Unterschiede sind mutmaßliche Zelltyp-spezifische Mechanismen der RLH-Signalkaskade. Weiterhin spielt das experimentelle System offenbar eine entscheidende Rolle (Untersuchung der LGP2-Funktion durch Überexpression und Transfektion vs. *knock-down* und *knock-out*). Schließlich könnten im murinen und humanen System grundlegende Unterschiede in den Mechanismen der RLH-Signalkaskade vorhanden sein, die die Diskrepanz der Befunde erklären.

4.4 Ergebnisinterpretation vor dem Hintergrund struktureller biologischer Daten

In Zusammenarbeit mit dem Labor für ‚Structural Biology and DNA Repair‘ von Prof. Karl-Peter Hopfner wurde eine 2,6 Å Kristallstruktur der LGP2-RD ermittelt (PDB: 2W4R). Die allgemeine Struktur zeigt eine leicht abgeflachte, globuläre Domäne mit einer konvexen und einer konkaven Oberfläche mit einer Größe von ~ 45 x 35 x 30 Å. Die Domäne besteht aus drei Blättern: zwei vier-strängige ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 9$, $\beta 10$ und $\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$, $\beta 8$) und ein zwei-strängiges ($\beta 3$, $\beta 4$) β -Faltblatt. Die β -Faltblätter werden durch kleine 3_{10} helikale Schleifen verbunden ($\eta 1$ - $\eta 5$). Der C-Terminus trägt eine kurze α -Helix ($\alpha 1$). Die vier-strängigen β -Faltblätter sind lateral durch zwei ausladende Schleifen verbunden, die je zwei hoch-konservierte Cystein-Reste enthalten (Cys556 und Cys559, Cys612 und Cys615; vergleiche Abbildung 3.6). Die vier Thiolgruppen der Cystein-Aminosäuren koordinieren ein Zink-Atom (in der Kristallstruktur durch ein Quecksilber Atom ersetzt) und stellen ein zentrales Strukturmotiv der LGP2-RD dar.⁴⁶

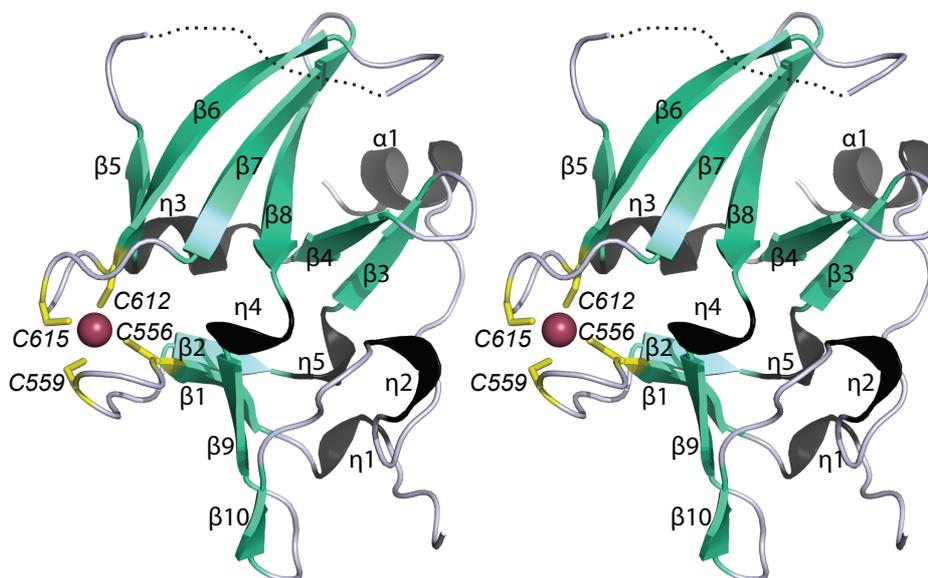


Abb. 4.4.1 Stereoskopische Ansicht der drei-dimensionalen Struktur der LGP2-RD.

Wie Eingangs geschildert (siehe Abschnitt 1.3.1) ist die Struktur der LGP2-RD (PDB: 2W4R) sehr eng mit der kristallographisch ermittelten Struktur der RIG-I-RD (PDB: 2QFD) und der per *homology-modeling* und *small angle X-ray scattering* ermittelten MDA5-RD verwandt. Die konkave Oberfläche aller drei RLH-RDs ist gekennzeichnet durch ein stark positives, elektrostatisches Potential.⁴⁶

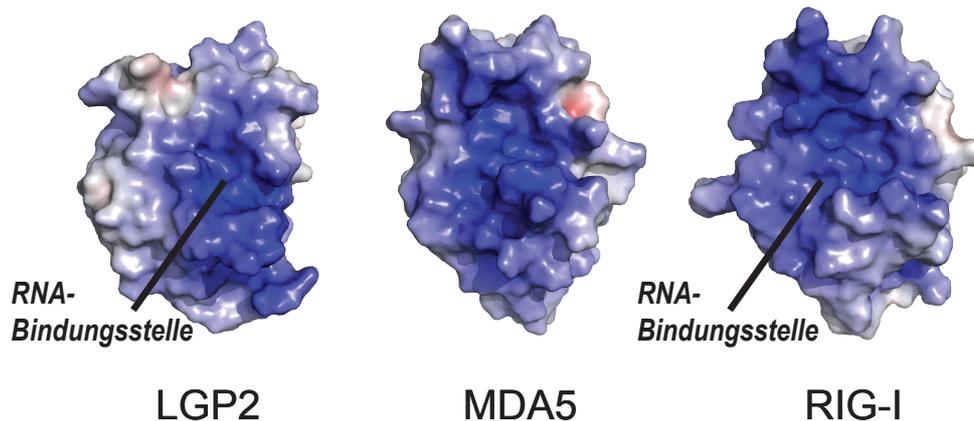


Abb. 4.4.2 Darstellung des elektrostatischen Oberflächen-Potentials der LGP2-RD, RIG-I-RD und MDA5-RD.

Cui et al. konnten für die RIG-I-RD zeigen, dass dieser Bereich die primäre Bindungsstelle für 5'-Triphosphat RNA darstellt.⁴³ Entsprechend konnten Pippig et al. demonstrieren, dass auch die LGP2-RD als RNA-Bindungsstelle fungiert. Per EMSAs und Fluoreszenz-Anisotropie-*assays* wurde als Ligand dsRNA bestimmt. Die Bindung zwischen der LGP2-RD und der dsRNA weist eine ähnliche oder sogar höhere Affinität auf als die Bindung von 5'-Triphosphat-RNA an die RIG-I-RD. Die Bindung der LGP2-RD an die dsRNA ist jedoch unabhängig von der Anwesenheit eines 5'-Triphosphat-Restes. Die Rolle der LGP2-RD als Bindungsstelle für dsRNA wurde später durch eine zweite strukturelle Arbeit bestätigt, die eine Kristallstruktur der LGP2 im Komplex mit dsRNA ermitteln konnte (PDB: 3EQT).⁴⁵

Die hier vorliegenden Ergebnisse können auch in Verbindung mit den strukturellen Daten den Mechanismus der LGP2-Funktion nicht definitiv festlegen. Dennoch können Erklärungen für die dichotome LGP2-Funktion und mögliche Mechanismen der RLH-Signalkaskade abgeleitet werden, auf die in der folgenden Ergebnisinterpretation eingegangen werden soll.

In Bezug auf die inhibitorische Wirkung auf das RIG-I-Signal ist ein Modell der Protein-Protein-Interaktion (entsprechend Modell B, Abbildung 4.1) mit den hier vorgelegten Daten teilweise vereinbar. Eine RIG-I-Regulierung in *trans* durch die LGP2-RD, wie von Saito et al. impliziert, würde auch zu einer Dosis-abhängigen Wirkung führen.⁴² Die hier beobachteten additiven Effekte der einzelnen LGP2-Domänen lassen sich durch eine inhibitorische Protein-Protein-Interaktion jedoch nur schwer erklären. Wahrscheinlicher erscheint ein Mechanismus bei dem LGP2 durch Liganden-Bindung das RIG-I-Signal hemmt (entsprechend Modell A, Abbildung 4.1). Hierfür spricht die hohe Affinität, mit der die LGP2-RD dsRNA binden kann. Davon ausgehend, dass auch die Helikase-Domäne eine RNA-Bindungs Kapazität besitzt, würde der hier beobachtete additive Effekt der LGP2-Domänen für eine kompetitive Bindung der RIG-I-Liganden sprechen. Außerdem würde eine Sequestrierung der RIG-I-Liganden ebenfalls zu der oben geschilderten Dosis-abhängigen Hemmung des RIG-I-Signals führen.

Der Gegensatz zu der positiv-regulierenden Funktion von LGP2 auf das RIG-I-Signal, die von Satoh et al.⁷¹ beschrieben wurde, könnte durch ein unterschiedliches LGP2-Expressions-Niveaus erklärt werden: bei niedriger Expression von LGP2 bestünde die Funktion des Proteins darin, komplex organisierte und durch RNP blockierte Liganden-RNA zugänglich zu machen (entsprechend Modell D, Abbildung 4.1). Bei höherer LGP2-Expression würde die Bindung von LGP2 an die Liganden-RNA die Erkennung durch RIG-I jedoch hemmen. Die letztere Funktion würde in einem experimentellen System mit transienter Überexpression und entsprechend hoher Protein-Expression (wie der hier angewendeten Versuchsanordnung) in den Vordergrund treten. Da LGP2 tatsächlich nach entsprechender Virusinfektion hoch reguliert wird, würde die inhibitorische Funktion als Teil einer negativ-regulierenden Rückkopplung (*negative feedback loop*) erscheinen. Die physiologische Bedeutung dieser Rückkopplung könnte in der Begrenzung überschießender Immunantworten liegen.

In Bezug auf das MDA5-Signal zeigen die hier vorliegenden Ergebnisse eine ko-stimulatorische Funktion von LGP2. Diese Einschätzung wird untermauert durch die oben beschriebenen Befunde beider *knock-out*-Mäuse.^{70,71} Einen möglichen Mechanismus der ko-stimulatorischen Funktion von LGP2 stellt wiederum das Modell D dar (siehe Abbildung 4.1), bei dem LGP2 Liganden derart prozessiert, dass sie durch MDA5 erkannt werden können. Wenn man davon ausgeht, dass für eine

optimale Prozessierung ein bestimmtes Verhältnis zwischen LGP2 und dem entsprechenden Liganden herrschen muss, könnte eine zu hohe LGP2-Expression die Liganden-Prozessierung und die nachfolgende MDA5-Signalkaskade stören. Dieses Modell wäre dann auch vereinbar mit dem hier beobachteten Optimum des MDA5-LGP2-Synergismus bei einem bestimmten LGP2-Expressions-Niveau (siehe Abbildung 3.3). Auch die Tatsache, dass die einzelnen LGP2-Domänen keine ko-stimulatorische Aktivität aufweisen, kann durch dieses Modell erklärt werden: die RNA Prozessierung erfordert mutmaßlich RNA-Bindung (LGP2-RD) und konsekutive Helikase Aktivität (LGP2-N) um die MDA5-Liganden zu entwinden und der Erkennung zugänglich zu machen. Daher kann nur das Volllängen-Protein, nicht aber die einzelnen Domänen, diese Funktion ausüben. Die hier beobachtete LGP2-MDA5-Interaktion (siehe Abschnitt 3.9) kann jedoch nur teilweise in Einklang mit diesem Modell gebracht werden, da sie auch in Abwesenheit eines Liganden demonstriert werden konnte.

Der zweite mögliche Mechanismus der LGP2 ko-stimulatorischen Aktivität ist die Formation von LGP2-MDA5-Heterokomplexen (entsprechend Modell D, Abbildung 4.1). Die dsRNA Bindung der LGP2-RD wäre zentraler Bestandteil der PRR-Funktion des LGP2-MDA5-Heterokomplex und würde auch erklären, weswegen ein MDA5-Ligand bisher nicht klar charakterisiert werden konnte. Das hier beobachtete, ko-stimulatorische Optimum bei ungefähr gleichen Expressions-Niveaus von LGP2 und MDA5 würde zu diesem Modell sehr gut passen (siehe Abbildung 3.3), ebenso wie die fehlende, ko-stimulatorische Funktion der einzelnen Domänen (siehe Abbildung 3.5) und die Liganden-unabhängigen Interaktion (siehe Abbildung 3.9).

Abschließend kann der Mechanismus der LGP2 Funktion anhand der bisherigen Daten nicht erklärt werden, zumal sich die hier beschriebenen Modelle nicht gegenseitig ausschließen. Denkbar ist, dass LGP2 in verschiedenen Zell-Typen eine unterschiedliche Funktion ausübt. Wie oben bereits beschrieben kann auch das Niveau der jeweiligen RLH-Expression unterschiedliche Mechanismen in Gang setzten. Diese Vorstellung ist vor allem interessant, weil die RLHs ISGs darstellen und daher deren Expression im Verlauf einer Virusinfektion erheblich variieren wird. Die RLH-Liganden umfassen entsprechend der Vielzahl verschiedener Viren, die über RIG-I oder MDA5 erkannt werden, ein breites Spektrum. Daher sind auch verschiedene Mechanismen der LGP2 Funktion in Abhängigkeit des jeweiligen Liganden möglich.

4.5 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Eine direkte klinische Anwendung der hier geschilderten Ergebnisse z.B. im Sinne einer Identifikation eines pharmakologischen *targets* lässt sich nicht ableiten. Diese Arbeit leistet jedoch einen Beitrag zum genaueren Verständnis der RLH-Signalkaskade und der zugrunde liegenden funktionellen Mechanismen. Dieses Verständnis ist für mehrere klinische Zielsetzungen von fundamentaler Bedeutung. Die klinischen Anwendungsmöglichkeiten einer Beeinflussung der RLH-Signalkaskade fallen im weitesten Sinne in den Bereich der Immuntherapie. Die Zielsetzung einer solchen Immuntherapie reicht von der Krebstherapie über die Behandlung von Autoimmunerkrankungen bis hin zur Infektiologie.

Im Bereich der Krebstherapie werden aktuell eine Vielzahl verschiedener Strategien in präklinischen und klinischen Untersuchungen verfolgt, die am System der PRRs und deren Liganden ansetzen.

Als besonders interessantes Beispiel einer präklinischen Anwendung der RLH-Liganden ist die Arbeit von Poeck et al. zu nennen.⁷⁵ In einem Mausmodell des malignen Melanoms wurden erfolgreich RIG-I-Liganden therapeutisch angewendet, die einen dualen Wirkmechanismus ausnutzten: zum einen induzierte die eingesetzte 5'-Triphosphat-RNA über RIG-I eine anti-neoplastische Immunstimulation und Apoptose. Zum anderen wurde die Triphosphat-RNA als siRNA konstruiert, die einen *knock-down* des anti-apoptotischen BCL-2-Proteins bewirkte. Die Kombination dieser beiden Wirkmechanismen führte zu einer synergistischen Apoptose-Induktion der Tumorzellen.⁷⁵

Klinische Anwendung finden PRR-Liganden bereits heute bei der Entwicklung von Immuntherapien mit dendritischen Zellen (DC). Dendritische Zellen sind hoch potente Antigen-präsentierende Zellen, die über T- und B-Zellen Antigen-spezifische Immunantworten erzeugen können. Außerdem können DCs natürliche Killerzellen aktivieren und stellen somit eine Verbindung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem dar. Diese Fähigkeiten können genutzt werden, um das Immunsystem gegen bestimmte Antigene von Tumorzellen zu richten.^{78,79}

Bei der Herstellung solcher DC-Vaccine werden dem Patienten üblicherweise Monozyten entnommen, die *ex vivo* zu dendritischen Zellen ausgereift werden. Diese DCs werden mit Tumor-Antigenen beladen und durch Stimulation mit verschiedenen

Substanzen aktiviert. Die aktivierten und Antigen-beladenen DCs sollen anschließend im Patienten über o.g. Mechanismen eine gegen den Tumor gerichtete Immunreaktion auszulösen.

Neben der Auswahl und Applikation der Tumorantigene stellt die Aktivierung der DCs einen für die Effektivität der DC-Vaccine entscheidenden Schritt dar. Eine besonders potente Aktivierung kann dabei durch den Einsatz verschiedener PAMPs wie z.B. den TLR-Liganden poly(I:C) oder R848 erreicht werden.⁷⁹ Dass auch RLH-Liganden dendritische Zellen aktivieren können und sich daher potentiell für die Herstellung von DC-vaccinen eignen, konnte bereits durch eine erste präklinische Studie gezeigt werden.⁸⁰ Die genaue Auswahl der Stimuli, die zu einer optimalen Aktivierung dendritischer Zellen führt, ist jedoch weiterhin Gegenstand intensiver Forschung und noch nicht abschließend geklärt.

Kürzlich ist die erste DC-basierte Immuntherapie, Sipeleucel T, von der FDA zur Behandlung des hormon-resistenten, metastasierten Prostata-Karzinoms zugelassen worden.⁸¹ Eine Vielzahl weiterer DC-Vaccinierungen befinden sich aktuell in klinischen Studien, von denen einige bereits PRR-Liganden einsetzen (z.B. clinicaltrial.gov identifier NCT01677962 oder NCT00390338).

Im Bereich der Infektiologie bestehen ebenfalls eine Vielzahl präklinischer und klinischer Ansätze, die an der RLH-Signalkaskade ansetzen. Ein besonders wichtiges humanpathogenes Virus, welches durch die RLH (i.e. RIG-I) und andere PRR (i.e. TLR3) erkannt werden kann, stellt das Hepatitis C Virus dar. Die Bedeutung der RLH-vermittelten HCV-Erkennung wird unterstrichen durch eine Studie unserer Arbeitsgruppe, die den Einfluss bestimmter RLH-SNPs auf den Krankheitsverlauf einer Hepatitis C Virusinfektion belegt (Hoffmann et al. 2014, submitted). Das Hepatitis C Virus hat jedoch Strategien entwickelt, um einer Erkennung durch RLHs zu entgehen: Die Serin-Protease NS3/4A ist essentieller Bestandteil des HCV-Replikationszyklus und ist dabei v.a. für die post-translationale Prozessierung zuständig. Darüber hinaus blockiert die NS3/4A-Protease die Interferon-Produktion infizierter Zellen indem es die zentralen Adapter-Proteine der TLR- und RLH-Signalkaskade TRIF und MAVS inaktiviert.^{82,83}

Die Inhibition der NS3/4A-Protease könnte dementsprechend nicht nur über die Blockierung der HCV-Replikation, sondern auch durch eine Immunrestitution virostatisch wirken.⁸⁴ NS3/4A-Protease-Inhibitoren werden seit geraumer Zeit

präklinisch und klinisch erforscht. Zwei solcher HCV-Proteaseinhibitoren, Telaprevir und Boceprevir, wurden kürzlich von der FDA und EMA zur Therapie der chronischen Hepatitis-C-Virusinfektion zugelassen.^{85,86}

5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Barriere gegen eindringende Mikroorganismen dar und ist in der Lage auf Krankheitserreger in kürzester Zeit zu reagieren. Die grundlegende Erkennungsstrategie des angeborenen Immunsystems ist die Identifikation fremder, mit Mikroben assoziierter molekularer Muster. Träger dieser Mustererkennung sind die in der Keimbahn kodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRRs; *pattern-recognition receptors*).

Die Gruppe der *RIG-I-like helicases* (RLH) sind PRRs, die für die Erkennung zahlreicher humanpathologisch bedeutsamer Viren essentiell sind. Die Gruppe besteht aus drei zytosolischen Proteinen: RIG-I, MDA5 und LGP2. RIG-I und MDA5 stellen typische PRRs dar, die nach Bindung ihres jeweiligen Liganden eine Signalkaskade aktivieren und eine anti-virale Immunantwort auslösen können. Da LGP2 im Gegensatz zu RIG-I und MDA5 keine Signal-Domäne besitzt wird eine regulatorische Funktion angenommen. Die genaue Bedeutung und der Mechanismus der Wechselwirkung von LGP2 mit RIG-I und MDA5 sind bisher jedoch unklar.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine inhibitorische Funktion von LGP2 auf das von RIG-I ausgelöste Signal demonstriert werden. Die einzelnen LGP2-Domänen, LGP-RD und LGP2-N, konnten dabei jede für sich eine Dosis-abhängige Hemmung des RIG-I-Signals bewirken. In Kooperation mit dem Labor für ‚Structural Biology and DNA Repair‘ von Prof. Karl-Peter Hopfner konnte außerdem gezeigt werden, dass die LGP2-RD mit hoher Affinität dsRNA bindet. Daher kann als Mechanismus der RIG-I-inhibitorischen LGP2-Funktion eine kompetitive Bindung und Sequestrierung der RIG-I-Liganden postuliert werden.

In Bezug auf das von MDA5 ausgelöste Signal konnte eine synergistische bzw. ko-stimulatorische LGP2-Funktion etabliert werden. Diese Ko-Stimulation konnte nur für das Volllängen-Protein und nicht für die einzelnen LGP2-Domänen, LGP2-N und LGP2-RD, beobachtet werden. Die Ko-Stimulation zeigte ein Optimum bei ungefähr gleichen Expressions-Niveaus von LGP2 und MDA5. Des Weiteren konnte mittels Co-Immunpräzipitations-Versuchen eine LGP2-MDA5-Interaktion nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund der Liganden-Bindungseigenschaften der LGP2-RD kann wiederum postuliert werden, dass LGP2 mit MDA5 Heterokomplexe bildet und

die Formation dieser Heterokomplexe für die Bindung von bestimmten MDA5-Liganden und die Initiierung der MDA5-Signalkaskade erforderlich ist.

Die vorgestellten Daten sind jedoch auch mit alternativen Modellen der LGP2-Funktion vereinbar. Die unterschiedlichen Erklärungsmodelle schließen sich dabei nicht gegenseitig aus sondern könnten, abhängig von Zell-Typ, dem gegenwärtigen Liganden und dem aktuellen Expressions-Niveau alternieren oder sogar überlappen.

Ein genaues Verständnis der Funktion der *RIG-I-like helicases* ist wichtig, um ihr bereits demonstriertes Potential als Zielstruktur immuntherapeutischer Ansätze voll nutzbar zu machen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AP-1	activator protein 1
AS	Aminosäure
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma-2
BMDC	bone marrow derived dendritic cells
bp	Basenpaar
CARD	caspase recruitment domain, caspase activation and recruitment domain
CARDIF	CARD adaptor inducing IFN- β
CDS	coding DNA sequence
CLR	C-type lectin receptor
DAI	DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors
DAMP	danger-associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure / double-stranded ribonucleic acid
DUBA	deubiquitinating enzyme A
EMCV	encephalomyocarditis virus
FADD	Fas-associated death domain-containing protein
GFP	green fluorescent protein
HMGB1	high mobility group box 1
iE-DAP	gamma-D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid
IFN	Interferon
IKK- ϵ / IKK-i	inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IPS-1	IFN- β promoter stimulator
IRF	interferon regulatory factor
ISG	interferon stimulated gene
JEV	Japanese encephalitis virus
kbp	Kilo-Basenpaar
ko	knock-out
LCMV	lymphocytic choriomeningitis virus
LGP2	laboratory of genetics and physiology 2
LPS	Lipopolysaccharide
MAVS	mitochondrial antiviral-signaling protein
MDA5	melanoma differentiation associated protein-5
MDP	Muramyl Dipeptid
MEFs	mouse embryonic fibroblasts
MINCLE	macrophage-inducible C-type lectin
NAP1	NAK-associated protein 1
NDV	newcastle disease virus
NF- κ B	nuclear factor kappa B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NLR	nucleotide-binding domain leucine-rich repeats containing family, NOD-like receptors
NLRA	NLR with acidic activation domain
NLRB	NLR with BIR domain (baculovirus inhibitor of apoptosis)
NLRC	NLR with CARD (caspase recruitment domain)
NLRP	NLR with pyrin domain
NLRX	NLR with an n-terminal domain that has no strong homology to the domain of any other NLR subfamily

NMR	member
NOD	nuclear magnetic resonance
	nucleotide-binding and oligomerization domain,
	nucleotide-binding oligomerization domain
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
pDC	Plasmacytoid dendritic cell
PRR	pattern recognition receptors
RD	regulatory domain, repressor domain
RIG-I	retinoic acid-inducible gene-I
RLH	RIG-I-like helicase
RNP	Ribonukleoprotein
SeV	sendai virus
SINTBAD	similar to NAP1 TGK1 adaptor
ssRNA	einzelsträngige Ribonukleinsäure / single-stranded ribonucleic acid
TBK1	TANK-binding kinase I
TIR	toll/interleukin-1 receptor
TRADD	TNFR-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRIF	TIR domain-containing adapter inducing interferon- β
TRIM25	tripartite motif-containing protein
VISA	virus-induced signalling adaptor
VSV	vesicular stomatitis virus
wt	wild type

7 Literaturverzeichnis

1. Pancer Z, Cooper MD. The evolution of adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 2006;24:497-518.
2. Raulet DH. The structure, function, and molecular genetics of the gamma/delta T cell receptor. *Annu Rev Immunol* 1989;7:175-207.
3. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983;302:575-81.
4. Teng G, Papavasiliou FN. Immunoglobulin somatic hypermutation. *Annu Rev Genet* 2007;41:107-20.
5. Esser C, Radbruch A. Immunoglobulin class switching: molecular and cellular analysis. *Annu Rev Immunol* 1990;8:717-35.
6. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 1999;284:1313-8.
7. Medzhitov R, Janeway CA, Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 1997;91:295-8.
8. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819-26.
9. Medzhitov R, Janeway C, Jr. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000;8:452-6.
10. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004;5:987-95.
11. Palm NW, Medzhitov R. Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009;227:221-33.
12. Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010;327:291-5.
13. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010;11:373-84.
14. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010;140:805-20.
15. Geijtenbeek TB, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9:465-79.
16. Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, et al. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 2011;68:765-83.
17. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 2009;21:317-37.
18. Rehwinkel J, Reis e Sousa C. RIGorous detection: exposing virus through RNA sensing. *Science* 2010;327:284-6.
19. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 2007;448:501-5.
20. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 2009;10:1065-72.
21. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 2009;138:576-91.
22. Choi MK, Wang Z, Ban T, et al. A selective contribution of the RIG-I-like receptor pathway to type I interferon responses activated by cytosolic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:17870-5.

23. Yanai H, Ban T, Wang Z, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 2009;462:99-103.
24. Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011;30:16-34.
25. Diebold S. Innate recognition of viruses. *Immunol Lett* 2010;128:17-20.
26. Ishii KJ, Kawagoe T, Koyama S, et al. TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines. *Nature* 2008;451:725-9.
27. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
28. Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett* 2009;122:1-11.
29. McCartney SA, Colonna M. Viral sensors: diversity in pathogen recognition. *Immunol Rev* 2009;227:87-94.
30. Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Dalod MY, et al. Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection. *J Immunol* 2002;169:4279-87.
31. Lee CK, Rao DT, Gertner R, Gimeno R, Frey AB, Levy DE. Distinct requirements for IFNs and STAT1 in NK cell function. *J Immunol* 2000;165:3571-7.
32. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K. Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. *J Exp Med* 2005;202:637-50.
33. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001;14:461-70.
34. Braun D, Caramalho I, Demengeot J. IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses. *Int Immunol* 2002;14:411-9.
35. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev* 1995;148:5-18.
36. Schulz O, Diebold SS, Chen M, et al. Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. *Nature* 2005;433:887-92.
37. Kato H, Sato S, Yoneyama M, et al. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity* 2005;23:19-28.
38. Jung A, Kato H, Kumagai Y, et al. Lymphocytoid choriomeningitis virus activates plasmacytoid dendritic cells and induces a cytotoxic T-cell response via MyD88. *J Virol* 2008;82:196-206.
39. Koyama S, Ishii KJ, Kumar H, et al. Differential role of TLR- and RLR-signaling in the immune responses to influenza A virus infection and vaccination. *J Immunol* 2007;179:4711-20.
40. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol* 2010;20:4-22.
41. Sarkar D, Desalle R, Fisher PB. Evolution of MDA-5/RIG-I-dependent innate immunity: independent evolution by domain grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:17040-5.
42. Saito T, Hirai R, Loo YM, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:582-7.

43. Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell* 2008;29:169-79.
44. Takahasi K, Yoneyama M, Nishihori T, et al. Nonspecific RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell* 2008;29:428-40.
45. Li X, Ranjith-Kumar CT, Brooks MT, et al. The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. *J Biol Chem* 2009;284:13881-91.
46. Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res* 2009;37:2014-25.
47. Takahasi K, Kumeta H, Tsuduki N, et al. Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors. *J Biol Chem* 2009;284:17465-74.
48. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006;314:994-7.
49. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science* 2006;314:997-1001.
50. Schmidt A, Schwerdt T, Hamm W, et al. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12067-72.
51. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, et al. 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.
52. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature* 2008;454:523-7.
53. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature* 2007;448:816-9.
54. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006;441:101-5.
55. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. *J Virol* 2009;83:10761-9.
56. Loo YM, Fornek J, Crochet N, et al. Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. *J Virol* 2008;82:335-45.
57. Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature* 2005;437:1167-72.
58. 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.
59. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 2005;6:981-8.
60. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell* 2005;19:727-40.
61. Moore CB, Bergstralh DT, Duncan JA, et al. NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 2008;451:573-7.

62. Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Curr Opin Immunol* 2008;20:17-22.
63. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* 2009;284:807-17.
64. Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007;446:916-20.
65. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:7500-5.
66. Sun SC. Deubiquitylation and regulation of the immune response. *Nat Rev Immunol* 2008;8:501-11.
67. Bhoj VG, Chen ZJ. Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature* 2009;458:430-7.
68. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005;175:5260-8.
69. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005;175:2851-8.
70. Venkataraman T, Valdes M, Elsbey R, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 2007;178:6444-55.
71. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1512-7.
72. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol* 2006;80:12332-42.
73. Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol* 2007;81:514-24.
74. Loo YM, Owen DM, Li K, et al. Viral and therapeutic control of IFN-beta promoter stimulator 1 during hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:6001-6.
75. 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.
76. Sievers F, Wilm A, Dineen D, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 2011;7:539.
77. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 2009;25:1189-91.
78. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, et al. Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch Arztebl International* 2002;99:2408-16.
79. Adema GJ. Dendritic cells from bench to bedside and back. *Immunol Lett* 2009;122:128-30.

-
80. Okano S, Yonemitsu Y, Shirabe K, et al. Provision of continuous maturation signaling to dendritic cells by RIG-I-stimulating cytosolic RNA synthesis of Sendai virus. *J Immunol* 2011;186:1828-39.
 81. Apetoh L, Locher C, Ghiringhelli F, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing dendritic cells in cancer. *Semin Immunol* 2011;23:42-9.
 82. Meurs EF, Breiman A. The interferon inducing pathways and the hepatitis C virus. *World J Gastroenterol* 2007;13:2446-54.
 83. Horner SM, Gale M, Jr. Intracellular innate immune cascades and interferon defenses that control hepatitis C virus. *J Interferon Cytokine Res* 2009;29:489-98.
 84. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest* 2009;119:1745-54.
 85. Schaefer EA, Chung RT. Anti-hepatitis C virus drugs in development. *Gastroenterology* 2012;142:1340-50 e1.
 86. Cunningham M, Foster GR. Efficacy and safety of telaprevir in patients with genotype 1 hepatitis C infection. *Therap Adv Gastroenterol* 2012;5:139-51.

8 Danksagung

Während der Arbeit an dieser Dissertation habe ich vielfältige Unterstützung erfahren. Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Simon Rothenfuß, der mit großem Engagement meine wissenschaftliche Ausbildung und Arbeit gefördert und diese Dissertation in einer Art und Weise betreut hat, wie man es sich besser nicht wünschen kann.

Zu großem Dank bin ich auch Prof. Dr. Stefan Endres verpflichtet, der mir die Möglichkeit gab, in der inspirierenden Atmosphäre der Abteilung für Klinische Pharmakologie und des Graduiertenkollegs 1202 „*Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie*“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu arbeiten und zu promovieren.

Dr. Andreas Schmidt animierte mich, über den Tellerrand meines eigenen Arbeitsgebietes hinauszuschauen und hat mir methodische Ansätze der neueren biochemischen und biomedizinischen Forschung vermittelt.

Zudem habe ich von der Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl Hopfner und Dr. Diana Pippig sehr profitiert und bedanke mich für die inhaltliche und methodische Unterstützung.

Frau Julia Vorac und Frau Simone Willms haben mir bei der Laborarbeit geholfen. Meinen Mitdoktoranden danke für die Kollegialität und freundschaftliche Zusammenarbeit.