

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie  
Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

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

Vorstand: Prof. Dr. Martin Reincke

**Das Fehlen von LGP2 reduziert das antivirale Signal der  
Immunrezeptoren RIG-I und MDA5 in der Melanomzelllinie 1205lu**

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



vorgelegt von  
Johannes Joseph Rädler  
aus München

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christian Kunte  
PD Dr. Robert Besch

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dharmendra Pandey

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2022

# Eidesstattliche Versicherung

Rädler, Johannes Joseph

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

## **Das Fehlen von LGP2 reduziert das antivirale Signal der Immunrezeptoren RIG-I und MDA5 in der Melanomzelllinie 1205lu**

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.

Ebersberg, den 30. Januar 2022

Ort, Datum

Johannes Rädler

Unterschrift Doktorand



*Meinen Eltern in Dankbarkeit*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Das Immunsystem	1
1.1.1.	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.2.	Das adaptive Immunsystem	2
1.2.	Viren als Krankheitserreger	3
1.3.	Interferone	5
1.4.	Mustererkennungsrezeptoren	7
1.5.	Die RIG-I-like Rezeptoren	9
1.5.1.	RIG-I ( <i>Retinoic acid Inducible Gene 1</i> )	11
1.5.2.	MDA5 ( <i>Melanoma Differentiation Associated gene 5</i> )	12
1.5.3.	LGP2 ( <i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i> )	13
1.6.	Fragestellung	16
<b>2.</b>	<b>Material</b>	<b>17</b>
2.1.	Geräte	17
2.2.	Allgemeine Chemikalien	18
2.3.	Antikörper	19
2.4.	Reagenziensätze ( <i>kits</i> ) und Zusatzprodukte	19
2.5.	Enzyme	20
2.6.	Material für die Zellkultur	21
2.7.	Transfektionsreagenzien	22
2.8.	Stimulantien	22
2.8.1.	Synthetische Stimulantien	22
2.8.2.	Stimulationsplasmide	23
2.8.3.	Viren	23
2.9.	Verwendete Zelllinien	24
2.10.	Verwendete Programme	24
<b>3.</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
3.1.	Zellkultur	26
3.1.1.	Zellen Ausplattieren	27
3.1.2.	Transfektion von Zellen	27
3.1.3.	Virusinfektion von Zellen	28
3.2.	Erstellung von <i>knockout</i> (KO) Zellklonen	28
3.2.1.	CRISPR/Cas9 Geneditierung	28
3.3.	DNA-Analyse	30
3.3.1.	DNA-Extraktion	30
3.3.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	30
3.3.3.	Agarosegel-Elektrophorese	32
3.3.4.	T7-Endonuklease-1-Verdau	32
3.3.5.	Sequenzierung	34
3.4.	Proteinanalysen	34
3.4.1.	Zellyse	34
3.4.2.	Lowry Protein Assay	35
3.4.3.	<i>Westernblot</i>	35
3.4.4.	ELISA zum Nachweis von humanem IP-10	38
3.4.5.	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i>	39
3.4.6.	<i>Firefly-Luciferase Reporter assay</i>	40
3.5.	Genexpressionsanalyse	41
3.5.1.	RT-qPCR	41
3.6.	Virusreplikationsassays	44
3.6.1.	TCID50	44
3.6.2.	<i>CellTiter Blue</i>	45
3.6.3.	Durchflusszytometrie	45
3.7.	Statistische Auswertungen	47
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>48</b>
4.1.	Generierung und Validierung von LGP2-defizienten 1205lu Zelllinien durch CRISPR/Cas9 Geneditierung	48

4.2.	LGP2 beeinflusst die RLR-Signalwege oberhalb oder auf Höhe von RIG-I und MDA5 aber nicht in nachgeschalteten Teilen des RLR-Signalwegs.....	50
4.3.	LGP2-Defizienz führt zu einer stark verminderten Immunaktivität nach Stimulation mit synthetischen RLR-Liganden.....	52
4.4.	LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Sendai Virus, VSV und Mengovirus.....	54
4.5.	LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Virusreplikation nach Infektion mit VSV in 1205lu Zellen	59
4.6.	LGP2-Defizienz führt auch nach Infektion mit VSV-WT in 1205lu Zellen zu verminderter Virusreplikation und dies beruht nicht auf einer Reduktion der Zellvitalität .....	60
4.7.	LGP2 zeigt keine Interaktion mit VSV-RNP im <i>electrophoretic mobility shift assay</i> .....	62
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>11.</b>	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>85</b>
<b>12.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>86</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Vereinfacht lassen sich die Aufgaben des Immunsystems in drei Bereiche zusammenfassen <sup>[1]</sup>:

1. Erkennung und Reparatur von Gewebeschäden
2. Kontrolle mikrobiologischer Fremdorganismen, bei gleichzeitigem Erhalt der Toleranz gegenüber gesunden, körpereigenen Geweben
3. Entsorgung alter oder krankhaft veränderter Zellen

Um diese Funktionen adäquat ausführen zu können, hat sich ein komplexes und hochspezialisiertes System entwickelt, das kontinuierlich angepasst und kontrolliert wird. Klassischerweise wird das Immunsystem multizellulärer Organismen in zwei Komponenten unterteilt: das angeborene/unspezifische und das adaptive/spezifische Immunsystem, wobei es sich um zwei hochspezialisierte und voneinander abhängige Komponenten eines Systems handelt. Beide Komponenten setzen sich jeweils aus zwei Bestandteilen zusammen: die Immunzellen und die löslichen Faktoren (z.B. Abwehr- und Signalstoffe oder Antikörper). Die Immunzellen werden als Leukozyten (weiße Blutzellen) zusammengefasst, welche mit den Erythrozyten (rote Blutzellen) und den Thrombozyten (Blutplättchen) im Knochenmark aus gemeinsamen Vorläuferzellen gebildet werden.

### 1.1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem kann als Standardprogramm der Immunität angesehen werden, welches in gewisser Ausprägung in allen Organismen vorhanden ist. Es wird charakterisiert durch rasche und stereotypische Reaktionen, ohne der Ausbildung eines Gedächtnisses <sup>[1,2]</sup>. Das besondere Merkmal der angeborenen Immunität ist die keimbahnkodierte Mustererkennung <sup>[3]</sup>, die beruhend auf einer begrenzten Anzahl vererbter Rezeptoren durch eine spezifische Erkennung fremder Muster (oder Entzündungsinduktoren) Krankheitserreger von körpereigenen Geweben unterscheiden. Die Rezeptoren werden als Mustererkennungsrezeptoren (engl.: *pattern recognition receptors*, PRR) bezeichnet <sup>[4]</sup>. Diese Muster sind evolutionär konservierte Strukturen bestimmter Pathogene und werden daher auch als *pathogen associated molecular pattern* (PAMP = Pathogen assoziierte molekulare Muster; oder: *microbe associated molecular pattern* = MAMP) bezeichnet <sup>[3,5]</sup>. Diese PAMP müssen durch ihre Struktur oder Ort des Vorkommens eindeutig von körpereigenen Strukturen unterscheidbar sein und repräsentieren meist unveränderliche Strukturen einer größeren Anzahl von Mikroorganismen, die häufig für das Überleben der Pathogene essenziell sind <sup>[2,3]</sup>. Von den PAMP werden die *danger associated molecular pattern* (DAMP) unterschieden, die körpereigene Muster beschreiben und deren Erkennung lokalisationsabhängig als endogenes Warnsignal agiert (z.B. DNA außerhalb des Zellkerns). PAMP und DAMP werden gemeinsam auch als Alarmine (oder Entzündungsinduktoren) bezeichnet, die eine Reaktion des angeborenen Immunsystems auslösen <sup>[1]</sup>. Der entscheidende Vorteil der

Mustererkennung beruht auf der Erkennung möglichst vieler Pathogene durch eine limitierte Anzahl im Genom kodierter Rezeptoren<sup>[3]</sup>. Die Mustererkennungsrezeptoren können zellulär als membrangebundene oder zytosolisch lösliche Rezeptoren vorliegen, oder auch extrazellulär im Blutplasma (humoral, z.B. Komplementsystem) lokalisiert sein<sup>[3]</sup>. Eine Auswahl der Mustererkennungsrezeptoren wird in Abschnitt 1.4 beschrieben.

Die zelluläre Komponente des angeborenen Immunsystems besteht im Wesentlichen aus Phagozyten (Fresszellen), bestehend aus Makrophagen, Granulozyten und dendritischen Zellen<sup>[1,2,6]</sup>. Diese können Mikroorganismen über Rezeptoren auf der Oberfläche erkennen und internalisieren, um sie anschließend im Zellinneren über Effektormoleküle abzutöten. Eine wichtige Untergruppe bilden die antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Die APZ können nach Prozessieren des phagozytierten Fremdmaterials Proteinfragmente präsentieren und bilden ein wichtiges Bindeglied zwischen dem natürlichen und dem adaptiven Immunsystem. Weitere zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind Mastzellen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und angeborene lymphatische Zellen (ILCs = *innate lymphoid cells*)<sup>[2,6]</sup>. Durch Aktivierung von Sensorzellen können weitere Botenstoffe wie Zytokine (z.B. Interleukine und Interferone) freigesetzt werden. Diese Mechanismen führen zur Bildung einer Immunantwort mit lokaler Entzündungsreaktion. Dadurch wird der Organismus auf die Pathogene aufmerksam gemacht, eine Abwehrreaktion durch Effektormoleküle eingeleitet, das adaptive Immunsystem aktiviert und ein entstandener Gewebeschaden repariert<sup>[7]</sup>.

### 1.1.2. Das adaptive Immunsystem

Die zweite Komponente des Immunsystems ist auf Wirbeltiere beschränkt. Das adaptive/spezifische Immunsystem ist charakterisiert durch eine spezifische, auf Grund der zugrunde liegenden klonalen Selektion und Proliferation verzögerte Immunreaktion, die jedoch mit der Bildung eines immunologischen Gedächtnisses einhergeht und bei einer Reinfektion schneller und stärker einsetzt<sup>[1,3,6,8]</sup>.

Das adaptive Immunsystem wird vorwiegend durch die Lymphozyten repräsentiert. Die B- und T-Lymphozyten haben spezialisierte Antigenrezeptoren auf ihrer Oberfläche. Die Spezifität der Antigenrezeptoren des adaptiven Immunsystems wird nicht wie Mustererkennungsrezeptoren im Genom kodiert, sondern entsteht durch zufällige somatische Rekombination durch Genumlagerungen. Ein spezifischer Antigenrezeptor wird daher nur von den zugehörigen Lymphozyten und deren Nachfolgezellen (Klonen) exprimiert. Dieser Vorgang setzt verzögert ein, erlaubt jedoch die Erkennung nahezu jeder Antigenstruktur<sup>[1,2,6,7]</sup>. Die Antikörper bilden die lösliche Form des adaptiven Immunsystems und sind durch hochspezifische Bindung an Pathogene oder Fremdstoffe (z.B. Toxine) für deren Abwehr verantwortlich.

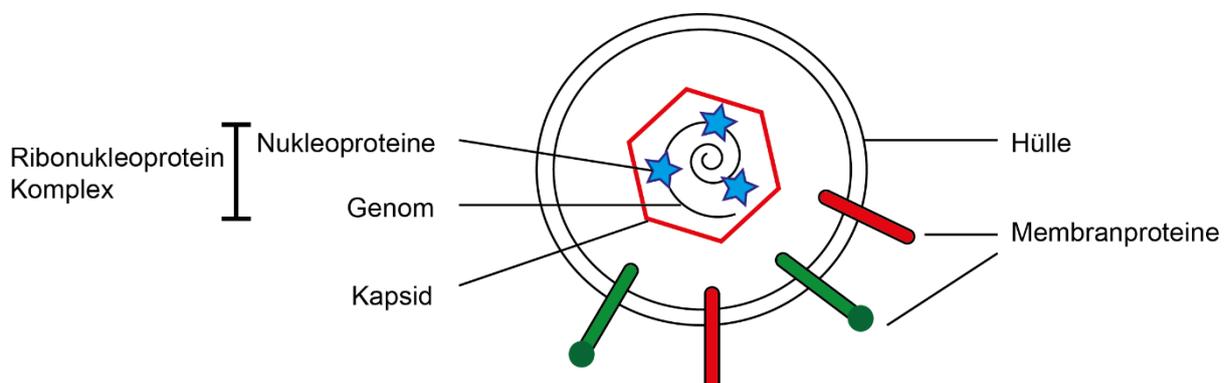
Die zwei Komponenten des Immunsystems arbeiten kooperativ, wobei die rasche angeborene Immunreaktion die adaptive Immunreaktion einleitet. Beispielsweise fördern einige Zytokine die Migration und Interaktion der Lymphozyten, andere Zytokine fördern die Antigenprozessierung und Präsentation oder induzieren die Expression ko-stimulatorischer Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen und Lymphozyten. Dies ermöglicht die klonale Selektion spezifischer Lymphozyten mit verzögerter, aber hochspezifischer adaptiver Immunreaktion und die Bildung eines Immungedächtnisses<sup>[7,9,10]</sup>.

## 1.2. Viren als Krankheitserreger

Viren stellen besondere Krankheitserreger dar, da sie aufgrund ihrer einfachen Ausstattung zur Replikation obligat auf eine Wirtszelle und deren Replikationsmaschinerie angewiesen sind, keinen eigenen Metabolismus betreiben und deshalb nicht als Mikroorganismen oder Lebewesen klassifiziert werden <sup>[11,12]</sup>. Viren werden daher als intrazelluläre Parasiten beschrieben <sup>[11]</sup>.

Die kleinste infektiöse Einheit, das Virion, besteht aus einem Genom und Proteinen (*Abbildung 1*). Das Virusgenom besteht aus DNA oder RNA, das als Doppel- oder Einzelstrang (ds oder ss) vorliegen kann. Ein Einzelstrang-Genom kann zusätzlich als plus/positiv oder minus/negativ unterteilt werden, abhängig von der Polarität (oder Lesefunktion) des Einzelstrangs. Entspricht die Polarität der *messenger RNA* (mRNA), dann wird das Genom als Plus (+)-Strang RNA/DNA bezeichnet. Ist die Polarität des Einzelstrangs jedoch der mRNA entgegengesetzt, muss das Genom in einem Zwischenschritt umgeschrieben werden und wird als Minus(-)-Strang RNA/DNA-Genom bezeichnet <sup>[11]</sup>. Das Genom kann zusätzlich mit Nukleoproteinen umhüllt sein. Genom und Nukleoproteine bilden den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP). Der RNP kann wiederum von einer weiteren Proteinhülle (Kapsid) und/oder einer Membran (Hülle) umgeben sein <sup>[11]</sup>. Die Virushülle besteht aus einer zellulären Membran und kann mit unterschiedlichen Proteinen besetzt sein, die sowohl zellulären als auch viralen Ursprung haben können <sup>[11]</sup>. Entsprechend dieser Bestandteile werden Viren anhand folgender Klassifikationskriterien definiert <sup>[11]</sup>:

1. Genom: RNA oder DNA, Doppel- oder Einzelstrang
2. Kapsidsymmetrie: helikal (entlang einer longitudinalen Achse) oder kubisch-sphärisch (Rotationssymmetrie)
3. Vorhandensein einer Hülle
4. Größe eines Virions
5. Ort der Virusreplikation: Zellkern oder Zytoplasma



**Abbildung 1: Aufbau eines Virions**

Zentral liegt das virale Genom, bestehend aus DNA oder RNA. Das Genom ist mit Nukleoproteinen besetzt (blaue Sterne) und bilden zusammen den Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), welches von einem Kapsid (rotes Sechseck) umgeben wird. Die Virushülle besteht aus einer zellulären Membran, die mit unterschiedlichen Proteinen besetzt sein kann.

(Modifiziert nach Modrow et al. <sup>[11]</sup>)

Der Replikationszyklus eines Virus beginnt mit dem *attachment* (Anheftung) an die Wirtszelle. Dies wird über Hüllproteine (Membranproteine) oder Kapsidproteine (im Falle eines hüllenlosen Virus) ermöglicht, die spezifisch an Rezeptormoleküle der Wirtszelle binden <sup>[11]</sup>. Anschließend folgt die Penetration des Virus in die Wirtszelle. Einige Viren können ihre Membran mit der Wirtszellmembran fusionieren und ihren Inhalt in die Zelle translozieren <sup>[13]</sup>. Andere Viren penetrieren über eine Rezeptorvermittelte Endozytose, wobei der Virusinhalt in Endosomen aufgenommen wird <sup>[11]</sup>. Zur Vermeidung der endosomalen Verdauung, wandern die Viren aus dem Endosom in das Zytoplasma. Dies wird häufig über Kapsidproteine vermittelt <sup>[11]</sup>. Anschließend wird das virale Genom beim *uncoating* (Enthüllung) aus dem Kapsid freigesetzt. Das freie Genom muss nun an den Ort der Replikation gelangen. Alle DNA-Viren (mit Ausnahme der Poxviren) replizieren im Zellkern. Daher wird das DNA-Genom in den Zellkern über Kernporen eingeschleust <sup>[11]</sup>. Bei RNA-Viren liegt nach dem *uncoating* das Genom als Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) im Zytoplasma vor, wobei die Nukleoproteine eine Verdauung des viralen Genoms verhindern. Nahezu alle RNA-Viren replizieren im Zytoplasma und müssen ihr Genom nicht in den Zellkern einschleusen (mit wenigen Ausnahmen, z.B. den Influenzaviren). Durch die Expression der viralen Gene kommt es zur Replikation des viralen Genoms, welches sehr komplex und für jede Virusart unterschiedlich verläuft. Hierbei werden die zellulären Mechanismen der Wirtszelle vom Virus verwendet, wodurch viele Replikate des Virusgenoms entstehen, die anschließend mit den Nukleoproteinen, beziehungsweise dem Kapsid, zusammengeführt und freigesetzt werden. Behüllte Viren werden entweder durch das *budding* mit der Zellmembran abgekapselt oder über den Golgi-Apparat durch Exozytose freigesetzt. Unbehüllte Viren werden meistens durch die Lyse der Wirtszelle freigesetzt <sup>[11]</sup>.

Eine Virusinfektion kann auf der Seite des Wirtes ein breites Spektrum an Reaktionen auslösen, die von Integration, chronischer Infektion und Ausheilung, bis zum Zytokinsturm, Multiorganversagen und Tod des Organismus reichen. Die Immunantwort der Wirtszellen wird dabei durch PRRs induzierte Zytokine wie Interleukine oder Interferone gesteuert (Abschnitt 1.3) <sup>[11]</sup>. Diese führen zu typischen Allgemeinsymptomen wie Fieber, Gliederschmerzen oder Abgeschlagenheit.

Viele Viren haben in den Millionen von Jahren ihrer Ko-Existenz mit den Wirtsorganismen vielfältige Evasionsmechanismen entwickelt, um die Initiierung einer Immunantwort zu unterbinden oder eine bestehende Immunantwort zu unterdrücken <sup>[14]</sup>. Unter anderem umfassen die Evasionsstrategien die Verschleierung viraler PAMPs vor den PRR, die Blockade der Signalkaskaden der PRR und die Blockade der Interferon-Signalwege <sup>[15]</sup>. Eine weitere Strategie ist die Inkorporation des viralen Genoms in die Wirtszelle. Dies wird auch als latente Infektion bezeichnet, wobei die Viren über längere Zeit in der Wirtszelle verweilen, bis der optimale Zeitpunkt für die Reaktivierung und Replikation eintritt. Häufig brechen solche latente Virusinfektionen während einer Immunschwäche des Wirts aus <sup>[11,12]</sup>.

### 1.3. Interferone

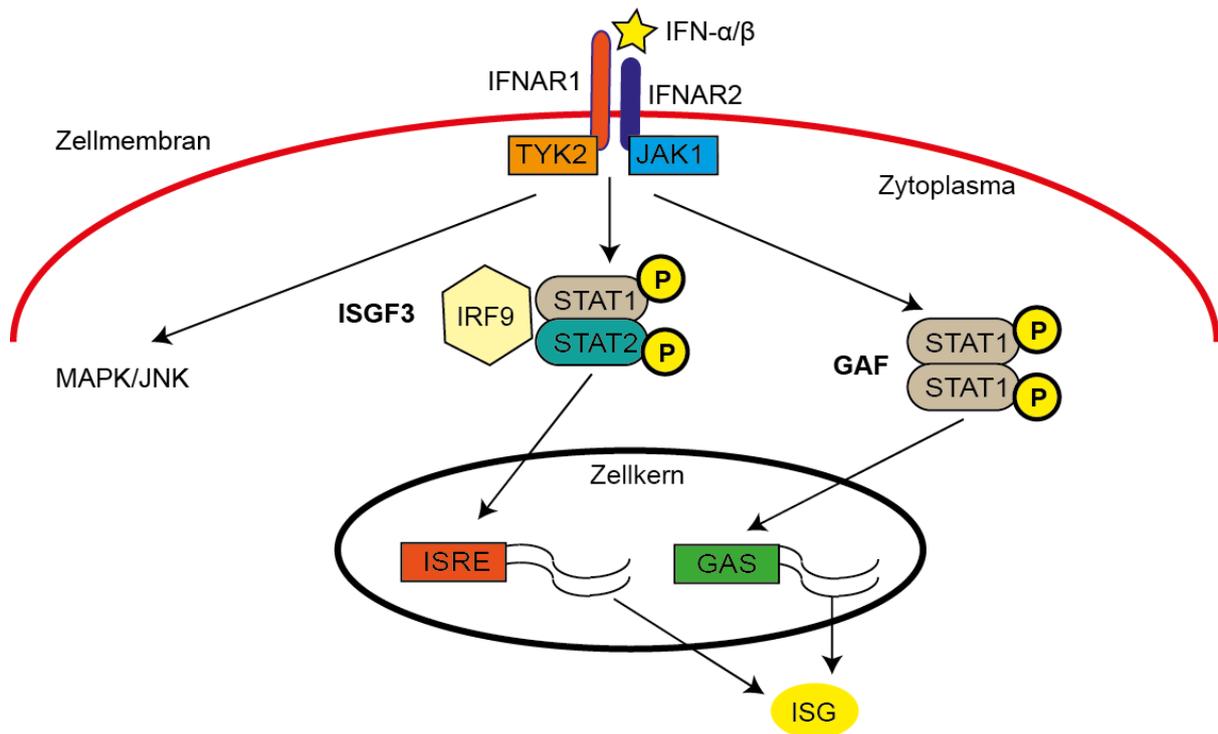
Interferone sind antiviral aktive Zytokine. Der schützende Effekt vor einer Virusinfektion durch die vorherige Infektion mit avirulenten Viren wurde erstmals 1935 beschrieben <sup>[16]</sup> und diese „interferierende“ Funktion 1957 auf die Interferon-Zytokine zurückgeführt werden <sup>[17]</sup>. Seither wurde gezeigt, dass Interferone wichtige Effektorzytokine für die angeborene antivirale Immunabwehr sind und das adaptive Immunsystem stimulieren können <sup>[11]</sup>.

Verschiedene Interferon-Zytokine sind bekannt, die alle einen Klasse-II-Zytokinrezeptor aktivieren und in drei Typen unterteilt werden <sup>[1,2,11,18-21]</sup>:

- Typ-I-Interferone (IFN-I): IFN- $\alpha$  und - $\beta$ . IFN- $\alpha$  umfasst 14 Subtypen, die von ebenso vielen Genen produziert werden. IFN- $\beta$  wird von einem einzigen Gen produziert. Sie können in nahezu allen Zellen produziert werden, insbesondere wird IFN- $\alpha$  von plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDZ) gebildet. Viren und dsRNA sind potente Induktoren von IFN-I. Die Aktivierung des membranständigen, heterodimeren IFN- $\alpha$ -Rezeptors (IFN $\alpha$ R mit IFN $\alpha$ R1- und IFN $\alpha$ R2-Untereinheiten), der auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird, führt über JAK1 und TYK2 zur Bildung des ISGF3-Komplexes (STAT1, STAT2 und IRF9), welcher *IFN-stimulated response elements* (ISRE) in Promotoren vieler interferonstimulierter Gene (ISG) bindet und deren Expression einleitet (*Abbildung 2*). Weitere, weniger charakterisierte Typ-I-Interferone sind IFN-  $\epsilon$ ,  $\kappa$  und  $\omega$ .
- Typ-II-Interferon (IFN-II): IFN- $\gamma$ , wird nur in Leukozyten produziert, besonders in NK- und T-Helfer-Lymphozyten. Es bindet einen anderen IFN-Rezeptor (IFNGR), dessen zwei Untereinheiten (IFNGR1 und IFNGR2) jeweils mit JAK1 und JAK2 assoziieren und über Phosphorylierung von STAT1-Homodimeren einen Transkriptionsfaktor *IFN- $\gamma$ -activated factor* (GAF) bildet und *IFN- $\gamma$ -activated sequences* (GAS) in Promotoren aktiviert (*Abbildung 2*). Es dient der Abwehr von intrazellulären Pathogenen.
- Typ-III-Interferone (IFN-III): IFN- $\lambda$  1, 2, 3 und 4. Diese Interferone werden nach einer Virusinfektion produziert und wirken antiviral. Sie werden zur Interleukin-10-Zytokinfamilie gezählt und binden einen heterodimeren Rezeptor (IL10R2 und IFNLR1), dessen Expression auf einige Epithelgewebe im Körper (z.B. Hepatozyten) beschränkt ist und dessen Aktivierung analog zu IFN-I über eine ISGF3-Aktivierung von ISRE zur Expression von ISG führt (*Abbildung 2*).

Die Vielfalt der ISG und deren Funktionen wurde von Schneider, Chevillotte & Rice zusammengestellt <sup>[22]</sup>. Im Blutplasma können Interferone in basal geringen Konzentrationen nachgewiesen werden, die nach einer Virusinfektion deutlich erhöht werden. Typ-I-Interferone können autokrin, parakrin und systemisch wirken. Hierdurch kommt es auch in nicht-infizierten Zellen zur Aktivierung von ISG, wodurch ein antiviraler Alarmstatus aufrechterhalten wird <sup>[18]</sup>. Zu den ISGs zählen etliche PRR (insbesondere zytosolische DNA- und RNA-Rezeptoren), *interferon-regulating factors* (IRF) und Proteine der IFN-Signalkaskade zu den ISG <sup>[22-24]</sup>. Durch die gesteigerte PRR-Expression entsteht eine erhöhte Pathogenerkennung, wodurch eine positive Rückkopplung und Verstärkung der IFN-I-Induktion entstehen <sup>[24]</sup>. Des Weiteren kann die IFN-Produktion direkt durch die IRF-Expression gesteigert werden. Die Promotoren von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  verfügen über Elemente, die von IRF aktiviert werden <sup>[19,23]</sup>. Insbesondere IRF3 und IRF7 sind in positiven Rückkopplungsschleifen beteiligt <sup>[22,23,25-27]</sup>. Zudem sind einige ISG als negative Regulatoren zur Vermeidung

einer überschießenden IFN-Reaktion und Aufrechterhaltung der Homöostase involviert [23]. Ferner umfassen die ISGs zahlreiche antivirale Effektormoleküle. Einige ISG hemmen die virale Replikation, beispielsweise hemmen IFIT-Proteine und die PKR die Translation viraler RNA, die 2'5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS) führt durch Aktivierung einer Endoribonuklease zum Abbau viraler RNA [2,28]. Des Weiteren führen Typ-I-Interferone zur Abtötung virusinfizierter Zellen durch direkte Aktivierung von NK-Zellen und indirekt durch zytotoxische CD8-T-Zellen aufgrund vermehrter Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen [2,11,18].



**Abbildung 2: Intrazelluläre Signalkaskade der Typ-I-Interferone**

Dargestellt ist ein Querschnitt durch eine Körperzelle mit der Zellmembran (rot) und dem Zellkern (schwarz). Der heterodimere IFN- $\alpha$ -Rezeptor bildet sich nach Bindung von Typ-I-Interferonen (IFN- $\alpha/\beta$ ) an die IFNAR2-Untereinheit. Diese bindet anschließend die IFNAR1-Untereinheit zur Bildung des Rezeptorkomplexes bestehend aus IFNAR1 und IFNAR2. Intrazellulär sind die IFNAR-Untereinheiten entsprechend mit TYK2 bzw. JAK1 assoziiert. Nach Aktivierung von TYK2 und JAK1 wird der ISGF3-Komplex gebildet, bestehend aus dem phosphorylierten Heterodimer STAT1/2 und IRF9. ISGF3 wandert in den Zellkern und aktiviert das ISRE-Motiv im Promotor von ISG. Typ-I-Interferone können des Weiteren die Bildung des GAF-Komplexes (phosphorylierter Homodimer aus STAT1) stimulieren. GAF wandert in den Zellkern und aktiviert GAS-Motive im Promotor von ISG. Zusätzlich können Typ-I-Interferone die MAPK/JNK-Signalwege aktivieren. Der GAF-GAS-Signalweg wird vorwiegend von Interferon- $\gamma$  nach Bindung an dessen IFN- $\gamma$ -Rezeptorkomplex verwendet. GAF wird hierbei nach Aktivierung von JAK1 und JAK2 gebildet (nicht gezeigt). Typ-III-Interferone binden einen heterodimeren Rezeptor, der ebenfalls TYK2 und JAK1-assoziert zur Bildung des ISGF3-Komplexes führt.

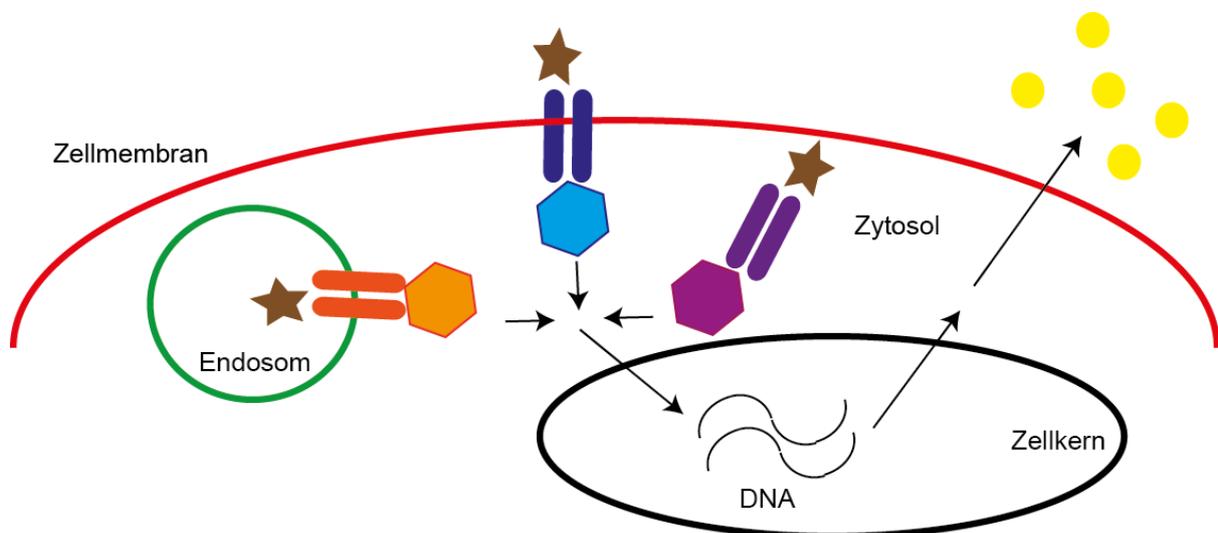
GAF = *gamma interferon activation factor*, GAS = *gamma interferon activation site*, IFN = Interferon, IRF = *interferon regulatory factor*, ISG = *interferonstimuliertes Gen*, ISGF3 = *IFN-stimulated gene factor 3*, ISRE = *IFN-stimulated response elements*, JAK = Januskinase, MAPK/JNK = *mitogen-activated protein kinase/c-Jun amino-terminal kinase*- Signalwege, STAT = *signal transducers and activators of transcription*, TYK2 = Tyrosinkinase 2. (Modifiziert nach Negishi et al. [19], ergänzt durch [22,23])

## 1.4. Mustererkennungsrezeptoren

Die Mustererkennungsrezeptoren (PRR) wurden in Abschnitt 1.1.1 vorgestellt. PRR können extrazellulär im Blutplasma oder zellulär vorliegen, wobei die zellulären Formen in membrangebundene und im Zytoplasma lösliche Rezeptoren unterteilt werden <sup>[1,29]</sup>. Die wichtigsten PRR sind in *Tabelle 1* zusammengefasst.

Entscheidend für die Funktion der PRR ist die Signalkaskade, die das entsprechende Signal in der Zelle weiterleitet und zur Aktivierung von Effektormolekülen oder Transkriptionsfaktoren führt (*Abbildung 3*) <sup>[1]</sup>. Die Initialisierung dieser Kaskade ist besonders abhängig von Adaptermolekülen mit denen die Rezeptoren nach Aktivierung interagieren. Diese Adaptermoleküle bilden die Brücke zwischen erkanntem Fremdantigen und dem entstehenden Signal <sup>[29]</sup>.

Die Toll-like Rezeptoren (TLR) bilden als Gruppe membranständiger PRR die Prototypen von Mustererkennungsrezeptoren, die in der Zellmembran oder in Membranen intrazellulärer Kompartimente von Immunzellen lokalisiert sind <sup>[29-32]</sup>. Diese heterogene Gruppe umfasst beim Menschen 10 TLR-Proteine, die entsprechend der primären Peptidsequenz in Subgruppen mit Erkennung verwandter PAMP unterteilt werden <sup>[4,19]</sup>. Beispielsweise erkennen vier TLR (TLR 3, 7, 8 und 9) virale Nukleinsäuren und führen im Regelfall zur Produktion von Typ-I-Interferonen <sup>[4,29]</sup>. Diese TLR sind endolysosomal lokalisiert. TLR9 erkennt virale DNA, TLR7 und 8 erkennen Abbauprodukte einzelsträngiger viraler RNA (ssRNA = *single stranded RNA*) <sup>[33]</sup> und TLR3 doppelsträngige virale RNA (dsRNA) <sup>[4,29,34-37]</sup>.



### Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Mustererkennungsrezeptor Signalkaskade

Dargestellt ist ein Querschnitt durch eine Körperzelle mit der Zellmembran (rot), einem Endosom (grün) und dem Zellkern (schwarz). Mustererkennungsrezeptoren (PRR) sitzen im Zytoplasol oder membrangebunden an äußeren oder inneren Zellmembranen. Ein PAMP (brauner Stern) aktiviert einen PRR, woraufhin entsprechende Adaptermoleküle (Sechsecke) rekrutiert werden, die das Signal in den Zellkern übermitteln. Im Zellkern kommt es zur Aktivierung der entsprechenden Gene. Dies führt zur Produktion von Signalstoffen (gelbe Kreise), z.B. Interferone oder proinflammatorische Zytokine. (Modifiziert nach Takeuchi & Akira <sup>[31]</sup>)

Auswahl humaner Mustererkennungsrezeptoren

<u>Mustererkennungsrezeptoren</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>PAMP</u>
AIM2	Zytoplasma	DNA
C1q-Komplement	Blutplasma	DNA, Strukturen von Mikroorganismen, Immunglobuline
cGAS	Zytoplasma	DNA
C-Typ Lektine	Zellmembran von Makrophagen, DZ, Neutrophilen; Blutplasma	Kohlenhydrate
DAI	Zytoplasma	DNA
NOD-like Rezeptoren	Zytoplasma	Bakterielle Zellmembran, iE-DAP, MDP
RIG-I-like Rezeptoren	Zytoplasma	Virale dsRNA, im Falle von RIG-I mit 5'-Di- oder Triphosphat-Modifikation
Scavenger Rezeptoren	Zellmembran von Makrophagen/ Monozyten, DZ, Endothelzellen; Blutplasma	Molekulare Muster auf apoptotischen Zellen, Mikroorganismen, alterierte Proteine/Lipide
Toll-like Rezeptoren	Zellmembran oder Endolysosom von Makrophagen, DZ, Lymphozyten, Fibroblasten, Epithelien	Bakterielle DNA, Proteine, Lipide, LPS; virale ssRNA, dsRNA, DNA

**Tabelle 1: Auswahl humaner Mustererkennungsrezeptoren**

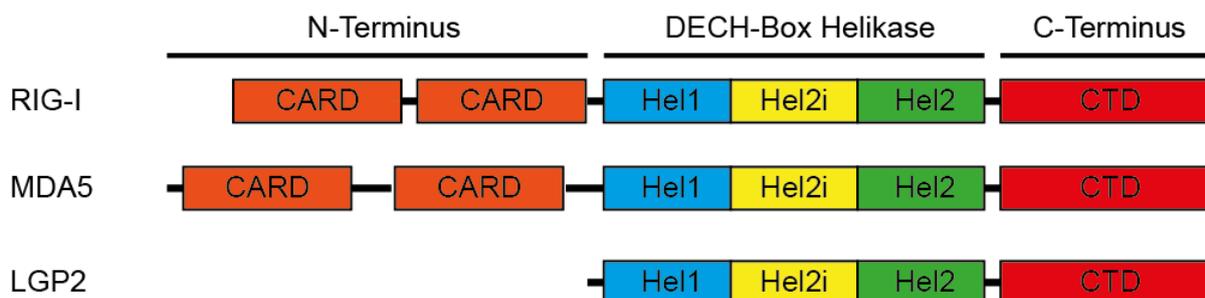
AIM2 = *absent in melanoma 2*, DAI = *DNA-dependent activator of interferon-regulatory factors*, DZ = dendritische Zelle, ds = *double strand* = Doppelstrang, iE-DAP =  $\gamma$ D-glutamyl- meso-diaminopimelic acid, LPS = Lipopolysaccharide, MDP = *muramyl dipeptide*, NOD = *nucleotide-binding oligomerization domain*, RIG-I = *retinoic acid-inducible gene 1*, ss = *single strand* = Einzelstrang  
(Modifiziert nach Peter et al. <sup>[1]</sup> und ergänzt Brubaker et al. <sup>[29]</sup>)

Doppelsträngige RNA ist von besonderem Interesse, da die meisten Viren zu irgendeinem Zeitpunkt ihres Replikationszyklus dsRNA produzieren. Diese dsRNA ist entweder Träger des viralen Genoms oder entsteht während der Replikation von ssRNA-Viren oder DNA-Viren [28]. Anfang der 2000er Jahre wurden TLR-unabhängige Interferonproduktion nach einer Virusinfektion beschrieben [35,38,39] und parallel konnten Yoneyama et al. zeigen, dass der Mustererkennungsrezeptor RIG-I eine essenzielle Rolle in der Immunantwort auf dsRNA spielt [40].

## 1.5. Die RIG-I-like Rezeptoren

Die RIG-I-like Rezeptoren (RLR) sind eine Gruppe intrazellulärer Mustererkennungsrezeptoren, die auf die Erkennung viraler dsRNA spezialisiert sind. Die RLR sind bei der Erkennung zytoplasmatischer viraler dsRNA beteiligt, während die TLR und besonders TLR 3, 7 und 8 auf die Erkennung extrazellulärer oder endosomaler viraler RNA spezialisiert sind [30]. Während TLR3 (erkennt auch dsRNA) membrangebunden am Endosom exprimiert wird, liegen die RLR im Zytoplasma im Zytoplasma vor. Die Gruppe der RIG-I-like Rezeptoren umfasst drei verwandte Enzyme: *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2). Die Entdeckung von RIG-I geht auf die Dissertationsarbeit von Y.W. Sun im Jahre 1997 in Leukämiezellen zurück [30,41] und Yoneyama et al. beschrieben die Rolle von RIG-I als Mustererkennungsrezeptor (PRR) [40]. LGP2 wurde 2001 durch Cui et al. [30,42] und MDA5 wurde 2002 durch Kang et al. erstbeschrieben [30,43]. Die Zugehörigkeit von RIG-I, MDA5 und LGP2 zu einer Rezeptorfamilie wurde aus Sequenzhomologien (Übereinstimmung, *Abbildung 4*) erkannt, die sich in drei Untereinheiten (Domänen) manifestieren [30,44-46]:

- Die C-Terminale Domäne (CTD), auch als *regulatory domain* (RD) bezeichnet, besitzt Funktionen zur Erkennung der dsRNA und Regulation der Bindung [47]
- Die DExD/H box Domäne, auch als Helikase Domäne oder „DECH“-Domäne bezeichnet. Diese Domäne ist für die RNA-Interaktion und die ATP-Hydrolyse (Spaltung = ATPase) verantwortlich. Sie gehört zur Gruppe der *Superfamily II Helikasen*, die strukturell in verschiedene funktionelle Sub-Domänen unterteilt werden kann: Hel1, Hel2i und Hel2. Der Begriff „Helikase“ wird meistens für Enzyme verwendet, die doppelsträngige DNA oder RNA abwickeln. DECH-Helikasen haben viele unterschiedliche Funktionen, unter anderem die Translokation entlang einem DNA- oder RNA-Strang oder die Verdrängung RNA-gebundener Proteine in RNP [48]
- Die N-Terminale Domäne = *caspase activation and recruitment domain* (CARD). Sie ist die Signaldomäne, die zur Interaktion mit dem Adaptermolekül MAVS benötigt wird. Die CARD ist bei RIG-I und MDA5 jeweils doppelt vorhanden, bei LGP2 fehlt diese Signaldomäne



**Abbildung 4: Aufbau der RIG-I-like Rezeptoren**

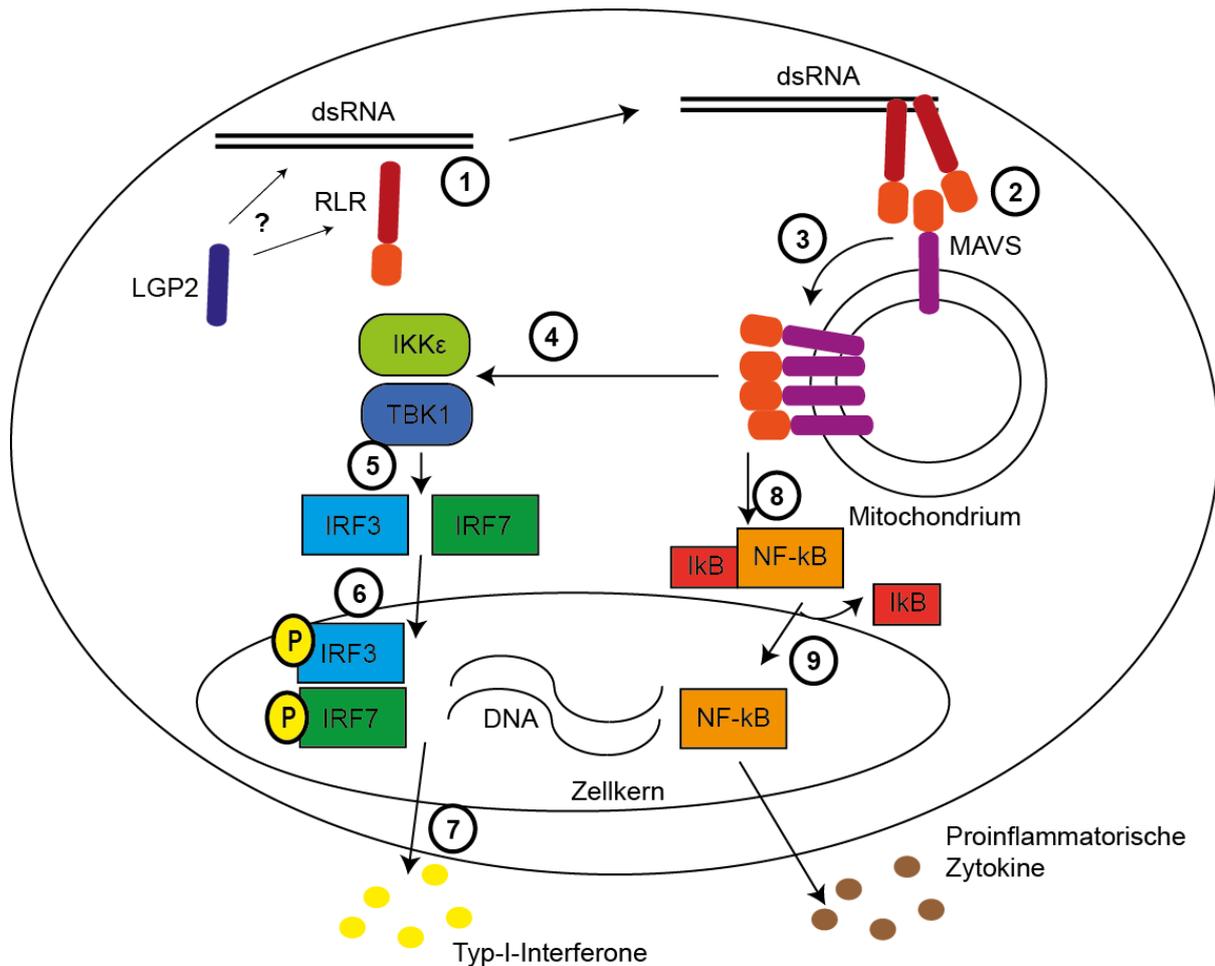
RIG-I, MDA5 und LGP2 bestehen jeweils aus einer zentralen „DECH-Box Helikase“-Domäne und einer „C-terminalen Domäne“ (CTD). RIG-I und MDA5 verfügen zusätzlich über eine „N-terminale Domäne“, bestehend aus 2 CARDS.

(Modifiziert nach Berke et al. [45] und ergänzt nach Bruns&Horvath [30] und Rodriguez, Bruns & Horvath [49])

Die RLR werden in den meisten Geweben in basal niedriger Konzentration exprimiert, allerdings ist deren Funktion in angeborenen Immunzellen wie Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen sowie einigen Epithelzellen am besten charakterisiert [50]. Nach einer Interferonproduktion wird die Expression der RLR als ISGs durch positive Rückkopplung gesteigert [51]. Während die Funktion von LGP2 weiterhin ungeklärt bleibt, ist die Erkennung viraler dsRNA als PAMP durch RIG-I und MDA5 etabliert. Eine Übersicht der durch RLR erkannten Viren wurde von Goubau et al. erstellt [52]. Allgemein wird RIG-I eine bedeutendere Rolle in der Erkennung von negativ-Strang RNA-Viren und MDA5 in der Erkennung von positiv-Strang RNA-Viren zugesprochen [50]. Die unterschiedlichen Funktionsweisen zur Erkennung der dsRNA von RIG-I und MDA5 wird ausführlicher in den Abschnitten 1.5.1 (RIG-I) und 1.5.2 (MDA5) beschrieben. Eine ausführliche Zusammenstellung des aktuellen Wissensstandes inklusive eines Vergleichs von RIG-I und MDA5 erfolgte durch Brisse and Ly [50].

RIG-I und MDA5 liegen zunächst zytosolisch in inaktiver Konformation vor und werden nach Bindung des PAMP aktiviert [50]. Für beide Rezeptoren ist eine oligomere Filamentbildung entlang von dsRNA Molekülen bekannt, wobei die CARD nach außen gerichtet sind. Diese Signaldomänen bilden ebenfalls Multimere und sind für die Interaktion mit dem Adaptermolekül *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS; auch IPS1, VISA oder CARDIF genannt) verantwortlich, das in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist [53]. Durch die Aktivierung von MAVS wird die RLR-Signalkaskade ausgelöst (*Abbildung 5*): sobald die MAVS-Moleküle aktiviert worden sind, bilden sie ein Aggregat an der mitochondrialen Membran. Hierdurch können weitere Adaptermoleküle rekrutiert und aktiviert werden: IKK und TBK1 sind intrazelluläre Moleküle, die entsprechend die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B, IRF3 und IRF7 aktivieren [40,53]. Diese Moleküle wandern in den Zellkern und können antivirale Gene aktivieren, darunter Typ-I-Interferone. Somit kommt es zur Expression von Typ-I-Interferonen und anderen antiviralen Molekülen [54].

Die Aktivierung der MAVS-Moleküle selber entspricht einer Prion-artigen Multimerisierung [54]. Als Prion wird ein Protein bezeichnet, das die Fähigkeit besitzt andere Moleküle desselben Proteins durch Konformationsänderungen zu einer Aggregatbildung zu aktivieren, die resistent gegenüber Detergenzien oder Proteasen sind. Die MAVS-Moleküle bilden somit nach Aktivierung und Aggregation eine stabile und sich selbst-erhaltende Signalplattform an der äußeren mitochondrialen Membran [54].



**Abbildung 5: Signalkaskade der RIG-I-like Rezeptoren**

- 1) Virale dsRNA wird von einem RLR (RIG-I oder MDA5) erkannt. Die Rolle von LGP2, einem RLR ohne CARD, ist hierbei weiterhin unklar
- 2) Nach Bildung eines Filaments an der dsRNA interagieren die CARD der RLR mit den CARD des Adaptermoleküls MAVS, das an der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist
- 3) Nach der Aktivierung von MAVS durch die RLR kommt es zur Aggregation der MAVS-Moleküle durch einen Prion-artigen Mechanismus
- 4) Die MAVS-Aggregate aktivieren weitere Signalmoleküle IKKε und TBK1 über Moleküle der TRAF-Familie
- 5) Die Signalmoleküle phosphorylieren und aktivieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7
- 6) IRF3 und/oder IRF7 dimerisieren und wandern in den Zellkern, wo sie Promotoren der Typ-I-Interferongene aktivieren
- 7) Nach der Genaktivierung kommt es zur Expression der Typ-I-Interferone.
- 8) Des Weiteren führen MAVS-Aggregate über FADD/RIP1 und TRAF6 zur Aktivierung von NF-κB durch Lösung von IκB.
- 9) NF-κB wandert anschließend ebenfalls als Transkriptionsfaktor in den Zellkern und führt zur Expression proinflammatorischer Zytokine.

(Modifiziert nach Rodriguez et al. [49] und ergänzt [4,19,29,30,45,46,50])

### 1.5.1. RIG-I (*R*etinoic acid *I*nducible *G*ene I)

RIG-I dient als Prototyp der RLR, dessen Funktion und Liganden am besten charakterisiert sind. RIG-I wird vom DDX58 Gen kodiert [50]. Als PRR erkennt RIG-I kurze dsRNA (mindestens 13-20 Nukleotide) [40] mit stumpfen Enden [55], die ein spezifisches Diphosphat- (5'pp) [56] oder Triphosphat-Motiv (5'ppp) am 5'-Ende der dsRNA trägt [57]. Das 5'ppp entsteht durch virale Polymerasen im Zytoplasma, aber

auch in eukaryotischer mRNA während der Transkription im Zellkern, wird aber posttranskriptionell vor Verlassen des Zellkerns modifiziert. Eukaryotische mRNA erhält dabei eine 5'-Methylguanosinkappe, wodurch die Erkennung des 5'-ppp-PAMP durch RIG-I inhibiert wird [30,57,58]. Ebenfalls wurde die Erkennung von längeren dsRNAs (>200 Basen) ohne 5'-ppp-Motif beschrieben, wie dem synthetischen Liganden poly(I:C) [59]. Allerdings wird die Entstehung von 5'-pp-Enden in der Herstellung von kurzem poly(I:C) vermutet [59]. Ferner wurde die Erkennung von poly-U/UC-reicher Sequenzen durch RIG-I beschrieben [60].

Eine Besonderheit des RIG-I ist das Vorliegen in einer inaktiven und aktiven Form: die basale, inaktive Konformation liegt vor, wenn RIG-I keine dsRNA gebunden hat. Hierbei kommt es zu einer Autorepression, da die CARDS durch Bindung an die Helikasen-Domänen an einer Interaktion mit anderen CARDS gehindert werden (sogenannte CARD-Sequestrierung). Die aktive Konformation entsteht durch Bindung einer dsRNA durch die Helikasen- und CTD-Domänen, wodurch die CARDS freigelegt werden [61]. Nach der Dephosphorylierung folgt eine CTD-Ubiquitylierung durch Riplet beziehungsweise CARD-Ubiquitylierung durch TRIM25 zur Stabilisierung der aktiven Konformation [50].

Eine weitere Besonderheit ist die Fähigkeit des RIG-I entlang einer gebundenen dsRNA durch ATP-Verbrauch zu translozieren (wandern). Die Translokation benötigt einen Doppelstrang, wobei RNA-RNA (dsRNA) oder RNA-DNA-Hybride gleichermaßen als Vorlage dienen können [62]. Diese Translokation ist zusätzlich eine Voraussetzung für die Bildung von RIG-I-Filamenten entlang der dsRNA, wodurch eine effiziente MAVS-Aktivierung stattfinden kann [63]. Die genauen Mechanismen der Translokation und Filamentbildung sind noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen [63,64].

### 1.5.2. MDA5 (*Melanoma Differentiation Associated gene 5*)

Die Funktion von MDA5 ist ähnlich gut charakterisiert wie die von RIG-I. MDA5 wird vom IFIH1 Gen kodiert [50]. Im Gegensatz zu RIG-I ist jedoch bisher noch kein spezifisches PAMP oder virales Motiv als Ligand für MDA5 im Detail beschrieben. MDA5 erkennt lange dsRNA, wie sie präferentiell von positiv-Strang Viren während der Replikation produziert werden. Wie die Längendiskriminierung der RNA durch MDA5 bewerkstelligt wird, ist noch nicht im Detail geklärt [45,63,65,66].

Die Filamentbildung entlang der dsRNA unterscheidet sich von der von RIG-I: MDA5 betreibt keine CARD-Sequestrierung, sondern eine kooperative Bindung entlang der dsRNA, die ATP-sensitiv ist [67-69]. Die Filamentbildung ist in besonderem Maße von der CTD abhängig und verläuft ATP-unabhängig [67-70]. Im Gegensatz zu RIG-I führt die Hydrolyse von ATP bei MDA5-Filamenten zur Auflösung [71]. Des Weiteren wird vermutet, dass MDA5 in einem dynamischen Equilibrium zwischen offener und geschlossener Konformation vorliegt, wobei die geschlossene Form in Abwesenheit des PAMP favorisiert wird, die ebenfalls starke Protein-Protein Interaktionen unterdrückt [50].

Die antivirale Bedeutung des MDA5 wird durch Evasionsmechanismen verdeutlicht, die bereits früh für MDA5 bekannt waren. Besonders die Virusgruppe der Paramyxoviren produzieren V-Proteine, die eine Interferonproduktion durch MDA5 inhibieren [72]. Mutationen in den Helikasen-Motiven führen bei allen RLR zum Defekt der ATP-Hydrolyse-Fähigkeit. Bei MDA5 führen Mutationen in Motiv I oder III jedoch zu einer hyperaktiven, RNA-unabhängigen Signalfunktion [30,73]. Die Erkenntnis, dass

MDA5 an autoimmunen Reaktionen beteiligt sein kann führte zur Entdeckung eines medizinisches Korrelats dieser hyperaktiven MDA5-Formen, dem *Aicardi-Goutieres Syndrom* (AGS), welches als Autoimmunerkrankung zu frühzeitiger neurologischer Degeneration durch eine konstitutiv-aktive Interferonproduktion führt [46,74,75]. Im Gegensatz zu RIG-I weist eine MDA5-Defizienz keine intrauterinen Entwicklungsstörungen im Mausmodell auf [50].

### 1.5.3. LGP2 (*L*aboratory of *G*enetics and *P*hysiology 2)

LGP2 wird vom DHX58-Gen kodiert bildet unter den RLR eine Besonderheit [52]: wie bereits beschrieben, besitzt LGP2 keine CARDS, wodurch eine direkte Interaktion mit MAVS und somit eine antivirale Signalfunktion nicht möglich sind (*Abbildung 4* und *Abbildung 5*). Dies konnten Rothenfusser et al. bereits 2005 zeigen, als die Überexpression von LGP2, im Gegensatz zu RIG-I und MDA5, keine IFN- $\beta$ -Aktivität auslöste [36].

LGP2 wird in den meisten Geweben konstant in basaler, jedoch geringerer Konzentration als RIG-I exprimiert. Nach einer Virusinfektion oder Stimulation der Zellen mit Interferonen oder poly(I:C) wird LGP2 als ISG verstärkt exprimiert [36,49,76]. Weiterhin ist bekannt, dass LGP2 spezifisch an dsRNA und nicht an ssRNA bindet [36,77], unabhängig von der Anwesenheit eines Triphosphat-Endes (5'ppp) [77]. LGP2 bindet dsRNA ebenfalls mit der C-terminalen Domäne (CTD) [78], jedoch ohne die Bildung von Dimeren [78] oder Filamenten [79].

Aufgrund der Abwesenheit einer Signal- oder Interaktionsdomäne (CARD) lässt sich die Funktion von LGP2 schwieriger einordnen. Daher wurden bereits mehrfach regulatorische Funktionen von LGP2 vermutet [49,80]. Eine Zuweisung einer eindeutigen Rolle von LGP2 in der RLR-Signalkaskade wird jedoch weiterhin durch teilweise widersprüchliche Ergebnisse kompliziert. Dabei scheint LGP2 eine bifunktionelle, konzentrationsabhängige Rolle einzunehmen: eine positive Regulation der antiviralen Immunantwort durch RLR (besonders MDA5) in basaler LGP2-Konzentration, sowie eine negative Regulation nach gesteigerter LGP2-Expression [79].

Zunächst konnten Rothenfusser et al. zeigen, dass die Überexpression von LGP2 die RIG-I-abhängige Interferon-Antwort inhibiert [36]. Hierbei wurde eine regulierende Funktion durch Konkurrenz um die dsRNA vermutet [36,77]. Folgend konnte gezeigt werden, dass diese negative Regulation unabhängig von der Bindung des LGP2 an die dsRNA [78] und auch unabhängig von der ATPase Funktion abläuft [73]. Saito et al. wiesen eine direkte Interaktion zwischen der CTD von LGP2 und der Helikasen-Domäne von RIG-I nach, die zur Suppression der RIG-I-Signale führt [47]. Diese inhibitorische Funktion von LGP2 konnte auch auf der Ebene von MAVS gezeigt werden. Hier scheint eine direkte Proteininteraktion unabhängig von einer dsRNA-Bindung oder einer Virusinfektion vorzuliegen, bei der eventuell die Signalfunktion von MAVS über IKK durch LGP2 gestört wird [76]. Ferner wurden hemmende Einflüsse von LGP2 auf die TRIM25-abhängigen RIG-I-Ubiquitylierung *upstream* von MAVS [81] und Hemmung der IRF3- und NF- $\kappa$ B-Aktivierung *downstream* von MAVS durch Interaktion mit TRAF [82] beschrieben.

Eine positiv-regulatorische Funktion von LGP2 ist für MDA5 bisher am besten charakterisiert [83,84]. Diese Funktion ist abhängig von der ATP-Hydrolyse, wobei das volle LGP2 zur Augmentation der MDA5-Aktivität benötigt wird [77]. Die synergistische Funktion mit MDA5 wurde von der Entdeckung gestützt, dass auch die ATP-Hydrolyse

von LGP2 durch die V-Proteine der Paramyxoviren inhibiert wird [85]. Die Interaktion zwischen LGP2 und den V-Proteinen verhindert die Koaktivierung von MDA5, ist jedoch ohne Einfluss auf die inhibitorische Funktionen von LGP2 [86]. Besonders Bruns et al. konnten einen Mechanismus für die modulierende Wirkung von LGP2 auf MDA5 belegen. Es zeigte sich, dass LGP2 zur effizienten Filamentbildung von MDA5 beiträgt, wobei die Anwesenheit von LGP2 zur schnelleren Ausbildung vermehrter, aber kürzerer MDA5-Filamente führt, die jedoch in ihrer Signalwirkung stärker sind [79]. Eine eigene Filamentbildung von LGP2 konnte allerdings ausgeschlossen werden [79]. Des Weiteren zeigte sich eine dichotome Wirkung von LGP2: in geringer Konzentration wirkt LGP2 fördernd auf MDA5, in höheren Konzentrationen allerdings hemmend [79].

Die Hoffnung eine Klärung der Rolle von LGP2 in der Modulation des RLR-Signals durch *knockout* Mausmodelle zu erreichen, wurde bisher nicht erfüllt. Drei unabhängige LGP2-defiziente Mausmodelle wurden publiziert, jedoch mit unterschiedlichen, teils widersprüchlichen Ergebnissen. Venkataraman et al. [87] beschrieben, dass die LGP2-Defizienz in Mäusen zu einer vermehrten Interferonproduktion nach Stimulation der Zellen mit poly(I:C) führt. Ebenso ist die antivirale Immunantwort nach Infektion mit dem durch RIG-I erkannten Vesicular stomatitis Virus (VSV) in LGP2-defizienten Zellen erhöht. Die Infektion mit Encephalomyocarditis Virus (EMCV), das spezifisch von MDA5 erkannt wird, führte bei LGP2-Defizienz jedoch zu verminderter Interferonproduktion. Diese Ergebnisse stützten die bifunktionelle regulatorische Rolle des LGP2. LGP2-defiziente Zellen zeigten dabei eine erhöhte Resistenz gegenüber VSV. Daraufhin führten Satoh et al. weitere Virusinfektionsversuche mit LGP2-defizienten Mäusen durch [84]. Hier zeigte die LGP2-Defizienz eine verminderte antivirale Antwort durch RIG-I und MDA5 nach Infektion mit Mengovirus, VSV, EMCV oder Sendai Virus (SeV), sowie die Abhängigkeit dieser antiviralen Effekte von der ATPase-Funktion von LGP2. LGP2 zeigte jedoch keine essenzielle Rolle in der antiviralen Immunabwehr, sodass trotz einer LGP2-Defizienz eine Interferonproduktion nachweisbar war. Dies führte zur Hypothese, dass LGP2 eine übergeordnete augmentierende Rolle für die Funktion von RIG-I und MDA5 spielt. Zuletzt zeigten Suthar et al. eine nicht essenzielle Funktion von LGP2 für die antivirale Immunantwort in LGP2-defizienten Mäusen, die jedoch bei LGP2-Defizienz reduziert auftritt [88]. Des Weiteren ließ sich eine wichtige Rolle von LGP2 für das Überleben von CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten nachweisen [88].

Weitere Funktionen von LGP2 unabhängig von der RLR-Signalkaskade sind beschreiben: Widau et al. zeigten, dass LGP2 bedeutend für die zelluläre Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung ist, indem LGP2 die zytotoxischen Effekte nach Bestrahlung mindert. Dies wurde auf eine Verminderung der Interferonproduktion durch erhöhte Expression des LGP2 zurückgeführt [89]. Neuere Untersuchungen durch Parisien et al. weisen auf eine NF-κB-Regulation durch LGP2 hin, wodurch die strahlenabhängige NF-κB-Aktivierung möglicherweise beeinflusst wird [82]. Liu et al. zeigten, dass Pumilioprotein 1 (PUM1) einen negativen Regulator von Genen der adaptiven Immunität durch Suppression von LGP2 darstellt, wobei LGP2 als „*master activator of innate immunity genes*“ beschrieben wurde [90]. Ferner ist eine Interaktion von LGP2 mit Pumilioproteinen (PUM1 & PUM2) nach Infektion mit NDV (Newcastle Disease Virus) beschrieben [91]. Die Komplexbildung der PUM zu antiviraler Stressgranula mag eine weitere Funktion von LGP2 unabhängig von RIG-I oder MDA5 darstellen.

Des Weiteren ist eine Interaktion zwischen LGP2 und der RNA Interferenz (RNAi) durch Dicer bekannt [92]. Die Endoribonuklease Dicer (ebenfalls DExD/H Helikase

Domäne) produziert *small interfering RNAs* (siRNA) durch Spaltung viraler dsRNA. Die siRNA bindet komplementäre virale RNA und führt zu deren Verdauung <sup>[92]</sup>. Die antivirale Aktivität von Dicer in Säugetierzellen ist allerdings noch umstritten. Van der Veen et al. zeigten, dass die Inhibition von Dicer durch Interferone möglicherweise auf dem ISG LGP2 beruht <sup>[92]</sup>. Ähnliche Ergebnisse von Takahashi et al. zeigten eine Interaktion von LGP2 mit TRBP, einem Kofaktor von Dicer <sup>[93]</sup>. Die Hemmung der TRBP-Interferenz führte während einer Infektion mit SeV zu vermehrter Expression pro-apoptotischer Gene und somit zu einer gesteigerten Apoptose nach SeV-Infektion. Dies stellt möglicherweise einen antiviralen Schutzmechanismus dar <sup>[93]</sup>.

Zusammenfassend lassen die bisherigen Studien keine einheitliche Einordnung der physiologischen Rolle von LGP2 zu, weisen aber auf eine Funktion in der antiviralen Immunantwort hin. Besonders die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse in Studien mit LGP2 *knockout* Mäusen erzeugen starkes Interesse an der weiteren Erforschung der Funktion von LGP2.

## 1.6. Fragestellung

RLR spielen als Mustererkennungsrezeptoren eine wichtige Rolle bei der Erkennung viraler Infektionen im Zytoplasma infizierter Zellen. Während die Familienmitglieder RIG-I und MDA5 in ihrer physiologischen Funktion inzwischen in großer Detailtiefe charakterisiert sind, gibt es bisher widersprüchliche Ergebnisse in der Fachliteratur zur Funktion des dritten Familienmitglieds LGP2. Durch das Fehlen einer Signaldomäne ist LGP2 selbstständig nicht zur Initiierung einer antiviralen Immunantwort befähigt. Es wurden jedoch bisher verschiedene regulatorische Funktionen von LGP2 auf die antivirale Immunabwehr von MDA5 und RIG-I beschrieben, teilweise jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen. Die Ergebnisse der bisherigen Studien beruhten dabei im Wesentlichen auf *loss of function* Experimenten in *knockout* Mausmodellen oder transienten *knock-down* Versuchen mit siRNA. In der vorliegenden Arbeit sollten durch CRISPR/Cas9 Geneditierung stabile LGP2-defiziente Klone der humanen 1205lu Melanomzelllinie generiert werden, in der Erwartung die bisherigen Studien zu komplementieren und die möglicherweise der Methodik geschuldeten Inkonsistenz bisheriger Ergebnisse zu umgehen.

Mit den neu generierten LGP2-defizienten Zelllinien sollten in funktionellen Experimenten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Auf welcher Ebene der RLR-Signalkaskade wirkt sich das Fehlen von LGP2 aus?
- Wie beeinflusst das Fehlen von LGP2 die zelluläre Reaktion nach Aktivierung von MDA5 und RIG-I mit den synthetischen Liganden Triphosphat-RNA und poly(I:C)?
- Wie beeinflusst das Fehlen von LGP2 die zelluläre Reaktion nach einer Infektion mit Viren, die eine RLR-abhängige Immunreaktion induzieren?
- Welchen Einfluss hat das Fehlen von LGP2 auf die Replikationsfähigkeit von Viren?

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob *in vitro* Experimente eine direkte Interaktion zwischen rekombinantem LGP2 und aufgereinigten viralen Ribonukleoprotein-Komplexen nachweisen können. Diese Interaktion wurde als Voraussetzung für die Hypothese gesehen, dass LGP2 eine Wirkung auf RIG-I und MDA5 über die Zugänglichkeitmachung der viralen RNA in RNP-Komplexen ausüben könnte.

## 2. Material

### 2.1. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
Begasungsbrutschrank	Heraeus BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Chemi- und Biolumineszenzdetektor Durchflusszytometer	Luminescent <i>Image Analyzer</i> LAS4000 mini FACS-Calibur	Fujifilm, Minato (J) BD <i>Biosciences</i> , San Jose (USA)
Elektrophoresekammer	Sub-Cell® GT <i>Cell</i>	Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Elektrophoresekammer – <i>Westernblot</i>	Owl™ Dual-Gel <i>Vertical Electrophoresis Systems</i>	ThermoFisher <i>Scientific</i> , Waltham (USA)
Fluoreszenzmikroskop Heizblock	Axiovert 200M Thermomixer <i>compact/comfort</i>	Carl Zeiss AG, Jena (D) Eppendorf AG, Hamburg (D)
Konfokalmikroskop	Leica TCS SP5	Leica Microsystems CMS GmbH, Mannheim (D)
Lichtmikroskop Fluoreszenzleser	Axiovert 25C Mithras LB940	Carl Zeiss AG, Jena (D) Berthold <i>Technologies</i> GmbH, Bad Wildbad (D)
Neubauer Zählkammer		Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen (D)
PCR-Maschine	T3 Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen (D)
pH-Meter	SenTix 41	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim (D)
Pipetten		
- Elektronische	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt (D)
- Manuelle	<i>Discovery Comfort</i> <i>Eppendorf Research Pipetman</i>	HT Lab AG, Pfäffikon (CH) Eppendorf AG, Hamburg (D) Gilson Inc., Middleton (USA)
RT-qPCR-Maschine	<i>LightCycler</i> 480II	Roche, Basel (CH)

## Material

---

Spannungsgerät	Model 200/20	Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Spectralphotometer	<i>NanoDrop 2000c</i>	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Sterilwerkbank	<i>Laminar air flow</i> (HB 2448)	Heraeus Holding GmbH, Hanau (D)
Tank-Blotter	Criterion™ <i>Blotter</i>	Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
UV-Imager	Alphamager (302 nm)	Alpha-InnoTec GmbH, Kasendorf (D)
	2011 Macrovue <i>Transilluminator</i>	Amershampharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg (D)
Vortex	Vortex-Genie 2	<i>Scientific Industries</i> Inc., Bohemia (USA)
Zentrifuge	<i>Centrifuge 5415R</i>	Eppendorf AG, Hamburg (D)
	Heraeus Multifuge 3L-R	ThermoFisher <i>Scientific</i> , Waltham (USA)

## 2.2. Allgemeine Chemikalien

<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
2-Propanol	Merck Millipore, Billerica (USA)
Agarose	Biozym <i>Scientific</i> GmbH, Hessisch Oldendorf (D)
Acrylamid 30% - Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Chloroquin	InvivoGen, San Diego (USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Fraktion V Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Glyzin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Methanol	Merck Millipore, Billerica (USA)
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumazid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Natriumdesoxycholat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Schwefelsäure	Apotheke des Klinikums der Universität München
TEMED =	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Tetramethylethylenediamine	
TRIS =	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
tris(hydroxymethyl)aminomethane	
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Tween-20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Zink Chlorid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

## 2.3. Antikörper

<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
Anti-Maus-IgG (H+L) HRP konjugiert, Wirt: Ziege	Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Anti-Kaninchen-IgG (H+L) HRP konjugiert, Wirt: Ziege	Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
Anti-LGP2 DHX58 polyklonaler Antikörper, Wirt: Hase	Proteintech Europe, Manchester (UK)
Anti-MDA5 (human) polyklonaler Antikörper, Wirt: Hase	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale (USA)
Anti-RIG-I (human) monoklonaler Antikörper (Alme-1), Wirt: Maus	Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale (USA)
Anti-GAPDH-IgG-HRP polyklonaler Antikörper, Wirt: Hase	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)

## 2.4. Reagenziensätze (*kits*) und Zusatzprodukte

<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF Plasmid Maxiprep <i>kit</i>	Macherey-Nagel, Düren (D)
peqGOLD Gel <i>extraction kit</i> C-Line	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
peqGOLD Total RNA <i>kit</i> C-Line	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
SmartSeq DNA-Sequenzierungskit	Eurofins Genomics, Ebersberg (D)
DNA-Agarosegel-Elektrophorese:	
- 6X Orange DNA loading dye	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
- Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
- O'Gene ruler mix (100 – 10.000 bp)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
human IP-10-ELISA:	
- BD OptEIA™ Human IP-10 ELISA-Set	BD Biosciences, San Jose (USA)
- TMB substrate reagent set	BD Biosciences, San Jose (USA)
Firefly-Luciferase-Assay	
- Coelenterazin-h	Promega Corp., Madison (USA)
- Passive lysis buffer	Promega Corp., Madison (USA)

Polymerase-Ketten-Reaktion  
(PCR):

- PCR-tubes Eppendorf AG, Hamburg (D)
- QuickExtract™ DNA extraction solution Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf (D)
- 5x Phusion-HF Puffer NewEnglandBiolabs, Ipswich (USA)
- Primer Metabion GmbH, Steinkirchen (D)

Reverse transcription quantitative  
PCR (RT-qPCR):

- Kapa Probe Fast qPCR master mix (2x) Kapa Biosystems, Wilmington (USA)
- RiboLock RNase Inhibitor ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
- Oligo(dT) Microbeads Metabion GmbH, Steinkirchen (D)
- dNTP ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
- Reverse Transkriptase Puffer ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
- Universal Probe Library Sonde Roche, Basel (CH)
- Primer Metabion GmbH, Steinkirchen (D)

Westernblot:

- Amersham Hybond-ECL 0,45µm Nitrozellulose Membran GE-Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire (UK)
- DC Protein Assay Reagent B, A & S Bio-Rad-Laboratories, Inc., Hercules (USA)
- Immobilon-P Membran; 0,45µm, PVDF Merck Millipore, Billerica (USA)
- PageRuler prestained protein ladder (10 – 170 kDa) ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrat ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

CellTiter-Blue® cell  
viability assay

Promega Corp., Madison (USA)

SYBR-Green II  
DNA stain clear G

Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)  
SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg (D)

## 2.5. Enzyme

Produktname

Phusion High-fidelity DNA  
Polymerase  
T7E1-Endonuklease  
RevertAid H Minus reverse  
transcriptase

Hersteller, Herkunftsort (Land)

NewEnglandBiolabs, Ipswich (USA)  
NewEnglandBiolabs, Ipswich (USA)  
ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

## 2.6. Material für die Zellkultur

<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
<b>Antibiotika</b>	
- Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
- Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
- Penicillin / Streptomycin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>Lösungen</b>	
- Fetales Kälberserum	<i>Life Technologies</i> , Carlsbad (USA)
- Kochsalzlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen (D)
- L-Glutamine (200 mM in 0,85 % NaCl)	Lonza, Basel (CH)
- Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel (CH)
- Trypsin (10x)	Lonza, Basel (CH)
- Tryptose-Phosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>Nährmedium</b>	
- Dulbecco's <i>modified Eagle's</i> Medium (DMEM; 4,5 g/L Glukose)	Lonza, Basel (CH)
- Opti-MEM, Serum-reduziertes Kulturmedium	<i>Life Technologies</i> , Carlsbad (USA)
<b>Verbrauchsmaterial</b>	
<b>Kulturbehälter:</b>	
- 75 cm <sup>2</sup> Kulturflasche, 0,2 µm <i>Vent cap</i>	Corning Inc., Corning (USA)
- 10 cm Kulturplatte	Corning Inc., Corning (USA)
- 6- <i>well</i> Mikrotiterplatte	Corning Inc., Corning (USA)
- 12- <i>well</i> Mikrotiterplatte	Greiner Bio- <i>one</i> , Kremsmünst (A)
- 24- <i>well</i> Mikrotiterplatte	Corning Inc., Corning (USA)
- 48- <i>well</i> Mikrotiterplatte	Corning Inc., Corning (USA)
- 96- <i>well</i> Mikrotiterplatte	Corning Inc., Corning (USA)
- 96- <i>well</i> Mikrotiterplatte unsteril	Brand GmbH, Wertheim (D)
<b>Serumpipetten:</b>	
- Stripette 5 mL	Corning Inc., Corning (USA)
- Stripette 10 mL	Corning Inc., Corning (USA)
- Stripette 25 mL	Corning Inc., Corning (USA)
<b>Pipettenspitzen:</b>	
- 10 µL weiß	Gilson Inc., Middleton (USA)
- 200 µL gelb	Sarstedt Ag & Co., Nürnberg (D)
- 1000 µL blau	Sarstedt Ag & Co., Nürnberg (D)

Zentrifugenröhrchen:

- |                   |                                 |
|-------------------|---------------------------------|
| - 1,5 mL Easy Cap | Sarstedt Ag & Co., Nürnberg (D) |
| - 2,0 mL          | Sarstedt Ag & Co., Nürnberg (D) |
| - 15 mL           | Greiner Bio-one, Kremsmünst (A) |
| - 50 mL           | Greiner Bio-one, Kremsmünst (A) |

## 2.7. Transfektionsreagenzien

<u>Produktname</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
<i>GeneJuice® transfection reagent</i>	Merck Millipore, Billerica (USA)
<i>Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent</i>	<i>Life Technologies</i> , Carlsbad (USA)
<i>TransIT-X2® dynamic delivery system</i>	Mirus Bio, Madison (USA)

## 2.8. Stimulantien

### 2.8.1. Synthetische Stimulantien

<u>Stimulanz</u>	<u>Beschreibung / Sequenz (5' → 3')</u>	<u>Hersteller, Herkunftsort (Land)</u>
5'-pppRNA <sup>1</sup>	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA- UCAAACAGAGGUCGCAUGCC	Hergestellt durch <i>in vitro</i> Transkription
Hochmolekulares poly(I:C) <sup>2</sup> ( <i>engl.: high molecular weight; HMW</i> )	1,5 – 8,0 kb	InvivoGen, San Diego (USA)
Niedermolekulares poly(I:C) <sup>2</sup> ( <i>engl.: low molecular weight; LMW</i> )	0,2 – 1,0 kb	InvivoGen, San Diego (USA)
OH-RNA-CO <sub>4</sub> <sup>3</sup>	GCGCUAUCCAGCUUACGUA	Metabion, Martinsried (D)
poly(A:U) <sup>4</sup>		InvivoGen, San Diego (USA)
Interferon-β 1a, mammalian		PBL Assay Science, Piscataway (USA)

<sup>1</sup> *In vitro* transkribierte RNA mit einer Triphosphat-Gruppe am 5'-Ende. Durch komplementäre Sequenzen innerhalb des Stranges bilden sich intramolekulare Bindungen, wodurch eine Haarnadelschleife (*engl.: hairpin loop*) und doppelsträngige Regionen aus 18 Basenpaare entstehen.

<sup>2</sup> Synthetisches Analog doppelsträngiger RNA, bestehend aus einer poly-Inosinsäure- und einer poly-Cytidinsäure-Kette. Poly(I:C) dient als Ligand für den Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3), sowie RIG-I und MDA5 (Produktdatenblatt *In vivo*Gen; online: <http://www.invivogen.com/polyic-hmw>); <sup>[59,94]</sup>.

<sup>3</sup> Nicht immunstimulatorische RNA. Sie diente zur Kontrolle bei Stimulationsversuchen mit den oben genannten synthetischen Liganden Triphosphat-RNA und poly(I:C).

<sup>4</sup> Synthetisches Analog doppelsträngiger RNA, bestehend aus einer poly-Adenylsäure- und einer poly-Uridylsäure-Kette. Poly(A:U) dient als Ligand für den Toll-like-Rezeptor 3 (TLR3). (Produktdatenblatt *In vivo*Gen; online: <http://www.invivogen.com/polyau>)

### 2.8.2. Stimulationsplasmide

<u>Genprodukt</u>	<u>Vektor</u>	<u>Promotor</u>	<u>Wirkung</u>
IRF3-5D	pcDNA 3.1	CMV	<i>Downstream</i> von MAVS
RIG-I-CARD-Domäne	pcDNA 3.1	CMV	Direkte MAVS-Aktivierung
MDA5-CARD-Domäne	pcDNA 3.1	CMV	Direkte MAVS-Aktivierung
pcDNA 3.1	pcDNA 3.1	CMV	Leervektor, Kontrolle
p125- <i>firefly</i> -luciferase	pGL3	P125 (IFN- $\beta$ )	Reporterplasmid; <i>firefly</i> -Luciferase gesteuert durch IFN- $\beta$ -Promotor
pRL-TK-Renilla	pRL	HSV-thymidine kinase (TK)	Kontroll-Reporter; Bezogen von Promega Corp., Madison, USA

### 2.8.3. Viren

<u>Virusname</u>	<u>Beschreibung</u>
Mengovirus C19A/C22A	Mengoviren sind eine Untergruppe des EMCV. Diese Mutante des Mengovirus erlaubt die Interferonproduktion der infizierten Zellen durch C19A/C22A-Mutation im <i>leader</i> (L) Gen. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. F.J.M. van Kuppeveld, Department of Biomolecular Health Sciences & Infectious Diseases & Immunology Universität Utrecht, Niederlande.
Sendai Virus (SeV)	Cantell-Stamm; (-)ssRNA; Paramyxoviridae, nicht-segmentiertes Genom Bezogen von <i>Charles River Laboratories</i> (Wilmington, MA, USA)

Vesicular stomatitis Virus (VSV)	Indiana-Stamm, Wildtyp; (-)ssRNA; Rhabdoviridae, nicht-segmentiertes Genom. Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München <sup>[95,96]</sup>
Vesicular stomatitis Virus P-GFP (VSV-WT P-GFP)	VSV mit <i>green fluorescent protein</i> (GFP) markiertem P-Protein Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München <sup>[95,96]</sup>
Vesicular stomatitis Virus M51R (VSV-M51R)	VSV mit Met->Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins zerstört dessen interferon-inhibierende Funktion Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München <sup>[95,96]</sup>

## 2.9. Verwendete Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>
1205lu	Humane Melanomzelllinie isoliert aus einer Lungenmetastase; adhärent Zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Besch, Ludwig- Maximilians-Universität München
A549	Humane Adenokarzinomzelllinie (alveolär- epithelial); adhärent Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, USA)
BHK 21	Nierenfibroblastzelllinie eines Babyhamsters ( <i>engl.: <u>B</u>aby <u>H</u>amster <u>K</u>idney cell</i> ); adhärent Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, USA)
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzelllinie ( <i>engl.: <u>H</u>uman <u>E</u>mbryonic <u>K</u>idney cells</i> ); adhärent Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC; Manassas, USA)

## 2.10. Verwendete Programme

<u>Programm/Datenbank</u>	<u>Entwickler, Lizenz</u>
Adobe <i>Illustrator</i> CS5.1	Adobe Systems Inc., Abteilungslizenz
ApE – <i>A plasmid editor</i> 2.0.47	M. Wayne Davis online frei erhältlich: <a href="http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/">http://biologylabs.utah.edu/ jorgensen/wayned/ape/</a>
EndNote X7	Thomson Reuters; LMU Campus Lizenz
FlowJo 7.6.1	FlowJo, LLC.; Abteilungslizenz

Google *Scholar*

Google Inc., Lizenz der Universitätsbibliothek München

*Graphpad Prism* 5.01

GraphPad Software, Inc.; Abteilungslizenz

Microsoft *Office* 2013

Microsoft Corporation; Studenten-Lizenz

NCBI *Blast*

National Center for Biotechnology Information  
online: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

NCBI Pubmed

Datenbank MEDLINE der U.S. National Library of  
Medicine, Lizenz der Universitätsbibliothek  
München

### 3. Methoden

#### 3.1. Zellkultur

Sterile Zellkulturbedingungen wurden unter der Sterilwerkbank (Heraeus HB 2448, Heraeus  *Holding* GmbH, Hanau, Deutschland) geschaffen, deren laminarer Luftstrom das Eintreten von Fremdkörpern auf der Arbeitsfläche erschwert. Die Arbeitsfläche wurde täglich mit UV-Licht dekontaminiert und zusätzlich wöchentlich gereinigt. Die Zellkulturen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM; Glukose 4,5 g/L) gezüchtet, mit folgenden Zusätzen:

Zusammensetzung der Zellkulturmedien

	<u>Zellkulturmedium</u>	<u>BHK-21-Zellmedium</u>
<i>Fetales Kälberserum (FBS)</i> <sup>1</sup>	10 %Vol	10 %Vol
L-Glutamin <sup>2</sup>	2 mM	2 mM
Ciprofloxacin <sup>3</sup>	10 mg/L	10 mg/L
Tryptosephosphat	---	1 %
	In DMEM	In DMEM

**Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien**

<sup>1</sup>fetales Kälberserum: wachstumsfördernd und mitogene Wirkung <sup>[97]</sup>.

<sup>2</sup>L-Glutamin, eine nichtessenzielle Aminosäure, die als Vorstufe für Ribonukleotide dient und als Energiequelle verwendet werden kann <sup>[97]</sup>.

<sup>3</sup>Anstatt Ciprofloxacin wurde zeitweise auch Penicillin/Streptomycin verwendet

Zellkulturbehälter wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 96 % Luftfeuchtigkeit in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus, BBD 6220; Heraeus  *Holding* GmbH, Hanau, Deutschland) aufbewahrt. Die Zelldichte wurde unter einem Lichtmikroskop beurteilt. Die Ablösung adhärenter Zellen von der Kulturfläche erfolgte nach Waschung mit steriler Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) mit einer 1x Trypsinlösung. Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch lichtmikroskopische Auszählung einer Neubauer Zählkammer nach Standardprotokoll.

Als unerwünschte Kontamination sind besonders Mykoplasmen als intrazelluläre Erreger gefürchtet, die sich stark auf zelluläre Expressionsmuster auswirken können und somit Ergebnisse verfälschen können. Daher wurden abteilungsintern monatliche Mykoplasmentests der Zellkulturüberstände zur Qualitätskontrolle der Zellkultur und als Reinheitsmarker der Zelllinien durchgeführt.

Die Identität der verwendeten Zelllinien wurde mittels *short tandem repeats* (STR)-Analyse am Institut für Rechtsmedizin der LMU München überprüft. Durch Abgleich mit der STR-Profil-Datenbank der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ), konnte die Identität der verwendeten Zellen verifiziert werden.

## 3.1.1. Zellen Ausplattieren

Zu Beginn jedes Zellversuches wurden die benötigten Zellen auf der verwendeten Mikrotiterplatte im Zellkulturmedium ausgesät (*Tabelle 3*), anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert und für die Versuchszwecke verwendet.

(Anmerkung: Wenngleich die Zellzahl zu Versuchsbeginn standardisiert wurde, kann aufgrund unterschiedlichen Wachstumsverhaltens einzelner Zellklone die Zellzahl zum Infektions- bzw. Stimulationszeitpunkt abweichen.)

Ausgesäte Zellzahl		
<u>Mikrotiterplatte</u>	<u>Anzahl Zellen / well</u>	<u>Medium / well</u>
96-well	20.000	150 µL
24-well	60.000	450 µL
6-well	600.000	2 ml

**Tabelle 3: Ausgesäte Zellzahl**

## 3.1.2. Transfektion von Zellen

Die Stimulation mittels synthetischer RNA (Abschnitt 2.8.1) oder DNA-Plasmiden benötigt eine transiente (vorübergehende) Transfektion der Stimulanzen in die Zellen. Die Stimulanzen müssen daher mit einer lipophilen Hülle verpackt werden, um die Zellmembran zu überwinden. Diese Hülle besteht aus einem Transfektionsreagenz. In der Arbeit wurden zwei verschiedene Transfektionreagenzien verwendet, je nach Nukleotidstruktur der Stimulanzen:

Verwendete Transfektionsreagenzien		
Transfektionsreagenz	<u>Lipofectamine® RNAiMAX</u>	<u>GeneJuice®</u>
Stimulanz	RNA (poly(I:C), poly(A:U), Triphosphat-RNA)	DNA (Plasmide)
Menge	1,0 µl je 6-well-Probe	3 µL : 1 µg DNA
Transfektionsreagenz	0,9 µl je 24-well-Probe; 0,1 µl je 96-well-Probe	
Verdünnungsmedium	Opti-MEM	Opti-MEM

**Tabelle 4: Verwendete Transfektionsreagenzien**

Nach getrennter Verdünnung des Transfektionsreagenzes und der Stimulanzen in Opti-MEM Kulturmedium (*Life Technologies, Carlsbad, USA*), wurden diese getrennt für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben zusammengeführt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass die Stimulanzen mittels Transfektionsreagenz verpackt werden konnten. Zur Transfektion wurde das verpackte Stimulanz anschließend direkt in das Zellmedium der ausplattierten Zellen hinzugegeben (50 µL) und für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 3.1.3. Virusinfektion von Zellen

Als weiterer Aktivierungsassay der *knockout* Klone wurden diese mit Viren infiziert, um Unterschiede in der Immunantwort zu untersuchen. Die verwendeten Viren (Abschnitt 2.8.2) wurden zu Beginn einer Versuchsreihe aliquotiert und der Virustiter eines Aliquots mittels TCID50 bestimmt (Abschnitt 3.6.1). Die Virusbestände wurden bei -80 °C gelagert.

Die Menge der zugegebenen Viren wird in MOI (= *Multiplicity of Infection* = Multiplizität der Infektion) angegeben, was der durchschnittlichen Anzahl infizierender Partikel je Zelle entspricht. Die nötige Virusmenge der verwendeten Virusaliquots wurde mithilfe des TCID50-Wertes wie folgend berechnet:

$$\text{Einzusetzende Virusmenge [ml]} = \text{MOI} \times \text{Zellzahl}^1 / \text{TCID50 [1/ml]}$$

<sup>1</sup>Die Zellzahl entspricht der ausgesäten Zellzahl zu Beginn des Versuches (*Tabelle 3*)

Der TCID50-Wert kann mittels folgender Gleichung in FFU-Wert eines Plaque-Assays (= *focus forming units*) umgerechnet werden, entsprechend der Poisson'schen Verteilung <sup>[98]</sup>:

$$\text{FFU [1/ml]} \approx 0,69 \times \text{TCID50 [1/ml]}$$

Die benötigte Virusmenge wurde in 50 µL Opti-MEM je Probe gelöst und in das Zellmedium hinzugegeben. Die Virusarbeiten wurden in einer S2-Anlage der Abteilung unter den entsprechenden Sicherheitsbedingungen durchgeführt.

(Anmerkung: Als wichtige Ausnahme ist das Sendai Virus (SeV) zu nennen. Da dieses Virus auf humane Zellen und Hamsterzellen nicht zytotoxisch wirkt, kann der Sendai-Virus-Titer nicht mittels TCID50 gemessen werden. Hier wird die Virusmenge nach Angaben des Herstellers (Charles River) in *Units/ml* (U/ml) angegeben und wurde aus den erworbenen Vorrat entsprechend verdünnt.)

## 3.2. Erstellung von *knockout* (KO) Zellklonen

### 3.2.1. CRISPR/Cas9 Geneditierung

Das CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Pallindromic Repeats*)/Cas (*CRISPR-associated*)-System (CRISPR/Cas) entspricht einem prokaryotischen Immungedächtnis. Es erlaubt fremde Nukleinsäure-Abschnitte nach einer Infektion (z.B. durch Viren oder Plasmide) innerhalb ihrer CRISPR-Gen-Loci zu speichern und sich dadurch vor einer Re-Infektion zu schützen. Durch Produktion komplementärer crRNA (*CRISPR-derived-RNAs*) <sup>[99]</sup>, kann die Re-Infektion der Zelle durch gleichartige DNA erkannt werden. Mithilfe der Cas-Proteine (CRISPR-assoziierte Proteine) wird die fremde DNA anschließend zerstört, wodurch ein Schutz vor dem Pathogen ermöglicht wird <sup>[100]</sup>. Dieses System ähnelt der eukaryotischen RNAi (RNA-Interferenz), mit der eukaryotische Zellen die Stilllegung von Genen steuern können <sup>[101]</sup>. Ursprünglich wurde dieses System 1987 in *E. Coli*-Bakterien identifiziert <sup>[102]</sup> und in verschiedenen Spezies der Prokaryoten (Bakterien und Archaeen) nachgewiesen <sup>[103,104]</sup>. Die CRISPR-Gene sind nach einem einheitlichen Schema aufgebaut (*Abbildung 6*): kurze repetitive Sequenzen (*repeat*), die meist als

Palindrome aufgebaut sind. Dazwischen ist die nicht-repetitive *spacer*-DNA geschaltet, die den Fremd-DNA-Fragmenten entspricht (sogenannte *protospacer*). Und schließlich benötigt jedes CRISPR-Gen eine *leader*/Promotor-Sequenz und die Cas-Gene. Drei verschiedene CRISPR-Typen sind bisher beschrieben, die sich durch Integration der *spacer*-DNA und Modifikation der crRNA unterscheiden <sup>[101,105]</sup>.



**Abbildung 6: CRISPR/Cas-Gen-Aufbau**

Das CRISPR-Gen besteht aus repetitiven Sequenzen (Repeat, häufig als Palindrom), die zwischengeschaltete, nicht-repetitive Sequenzen (*Spacer*) flankieren. Zusätzlich wird ein *leader*/Promotor benötigt, sowie die Cas-Gene (CRISPR-associated). (Modifiziert nach <sup>[101]</sup>).

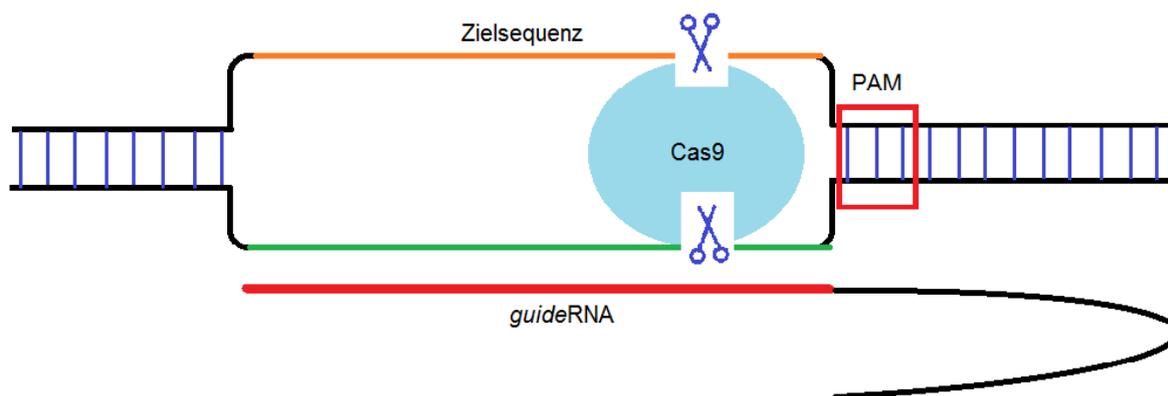
Die hier verwendeten Konstrukte der Firma Sigma-Aldrich basieren auf dem Typ-II-CRISPR/Cas-System, mit der Notwendigkeit eines 3'-PAM (*protospacer adjacent motif*, 5'-NGG-3', wobei N einem beliebigen Nukleotid entspricht) und verwendet eine *guide*RNA (Abbildung 7). Die *guide*RNA bindet komplementär an eine Zielsequenz vor einem 3'-PAM im Zielgen (Tabelle 5) und aktiviert die Endonuklease Cas9 mithilfe einer *hairpin*-Struktur. Anschließend führt die Cas9 einen Doppelstrangbruch innerhalb einer Zielsequenz ein, der durch fehlerhafte Reparatur zu einer Mutation führt. Hierzu werden zunächst Wildtypzellen mit einem CRISPR/Cas9-Plasmid transfiziert, welches für die *guide*RNA und Endonuklease Cas9 kodiert (DHX58 SIGMA CRISPR Plasmid, CMV-Promotor gesteuerte CAS9-2A-GFP Kasette und U6 gesteuerte *guide*RNA; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die erfolgreich transfizierten Zellen können mithilfe des ko-exprimierten *green fluorescent protein* (GFP; grün-fluoreszierendes-Protein) mittels FACS-Sortierung isoliert, durch Grenzverdünnungsklonierung vereinzelt (Aussäen 0,5 GFP-positiver Zellen je *well* einer Mikrotiterplatte) und anschließend als Einzelzellklone weitergezüchtet werden. Die hierdurch gezüchteten Zellklone werden durch anschließende Analyse der DNA- und Proteinexpression des Zielgens als *knockout* Klone verifiziert.

Verwendete *guide*RNA Zielsequenzen

Zielgen	Sequenz (5' -> 3')
LGP2	CTTCGGTCCTACCAATGGGAGG
MDA5	GAGGGCTGCCGGTTCTCCGGAGG
RIG-I	GGGTCTTCCGGATATAATCCTGG

**Tabelle 5: Verwendete *guide*RNA Zielsequenzen**

Ein essenzielles Element für die korrekte Funktion der CRISPR/Cas9-Konstrukte sind die enthaltenen PAM (*protospacer adjacent motif*; NGG) am 3'-Ende der Zielsequenzen.



**Abbildung 7: Funktionsweise der CRISPR/Cas9 Geneditierung**

Dargestellt ist die *guideRNA* Zielsequenz eines Zielgens mit dem PAM (*protospacer adjacent motif*) und der *guideRNA*. Die *guideRNA* bindet an komplementäre Abschnitte der Zielsequenz und aktiviert die Cas9-Endonuklease. Diese fügt daraufhin einen Doppelstrangbruch im Zielgen ein. (Modifiziert nach Sigma Aldrich (online: <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/crispr-cas9-genome-editing.html>)).

### 3.3. DNA-Analyse

#### 3.3.1. DNA-Extraktion

Der erste Schritt jeder DNA-Analyse ist die Isolierung der DNA aus den zu untersuchenden Zellen/Bakterien. Hierfür wird ein Extraktionspuffer verwendet, der die Isolierung ohne Zentrifugationsschritte ermöglicht. Für eine zufriedenstellende DNA-Ausbeute wurden  $1 \times 10^5$  Zellen verwendet und mit 50  $\mu$ L der *QuickExtract™ DNA extraction solution* (Biozym Scientific GmbH) mit folgendem Programm im Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) inkubiert und anschließend bei -20 °C gelagert:

Verwendetes Programm zur DNA-Extraktion		
Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (min)
1.	68,0	17,0
2.	95,0	8,0

**Tabelle 6: Verwendetes Programm zur DNA-Extraktion**

#### 3.3.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Entwicklung der Polymerase-Ketten-Reaktion (*engl: Polymerase-Chain-Reaction, PCR*) durch Kary Mullis im Jahre 1983 erlaubte erstmals die Synthese großer Mengen von DNA-Fragmenten mit technisch einfachen Mitteln <sup>[106]</sup>.

Die Methode beruht auf der zyklischen Verdopplung einer DNA-Sequenz, die somit eine exponentielle Vermehrung eines Genabschnittes erlaubt. Die Durchführung erfordert eine kleine Menge der isolierten DNA (= *template*) und zwei spezifische Primer (kurze Oligonukleotide), die komplementär zur *template*-DNA binden können und als Startpunkt für die Replikation der Zielsequenz dienen. Die Synthese der neuen DNA wird von einem hitzestabilen Polymerase-Enzym durchgeführt (hier: Phusion-

Polymerase, einem Fusionsprotein der *Pfu-DNA-Polymerase* und dem DNA-Bindungsprotein *Sso7d*, wodurch die Bindung der *Pfu* an die DNA erhöht wird [107]).

Jeder Zyklus der PCR beginnt mit dem Denaturierungsschritt der Template-DNA (Auftrennung der beiden DNA-Stränge) bei hoher Temperatur. Beim folgenden *annealing* (=Anlagerung) wird die Temperatur gesenkt, sodass die Primer an die jeweiligen DNA-Stränge binden können. Während des Elongationsschrittes (Verlängerung) wird ein komplementärer DNA-Strang durch die Polymerase an den Primer angehängt. Die Synthese wird von der Polymerase ausgehend von den vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten (=dNTP) dA, dT, dC und dG katalysiert. [108]. Aufgrund unterschiedlicher Sequenzen besitzt jeder Primer spezifische physikalische Eigenschaften (z.B. der Schmelzpunkt des Primers), die beispielsweise durch den GC-Gehalt bestimmt werden. Daher sollte die *annealing*-Temperatur jeder PCR an das Primer-Paar angepasst werden. Das verwendete PCR-Protokoll (*Tabelle 7*), die Primer-Sequenzen (*Tabelle 8*) und Programme für den PCR-Thermocycler (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland; *Tabelle 9*) sind nachfolgend aufgeführt.

#### Verwendetes PCR-Protokoll

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
Template DNA	80 ng
Primer 1 ( <i>forward</i> )	0,2 µM
Primer 2 ( <i>reverse</i> )	0,2 µM
Phusion HF Polymerase	0,2 µL = 0,4 Einheiten
dNTP	2 mM
5x HF Puffer	10 µL
ddH <sub>2</sub> O	ad 50 µL

**Tabelle 7: Verwendetes PCR-Protokoll**

Die Mengen der Reagenzien beziehen sich jeweils auf einen PCR-Ansatz.

#### Verwendete PCR-Primer für die Amplifikation des Genabschnitts, in dem die *guideRNA*-Zielsequenz liegt

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' -&gt; 3')</u>
LGP2-CRISPR- <i>forward</i>	CCTGGGCAGACCTACCTACT
LGP2-CRISPR- <i>reverse</i>	TCTTCACCATGCTGGGTCAC
MDA5-CRISPR- <i>forward</i>	AGGCACAGAGCGGTAGACC
MDA5-CRISPR- <i>reverse</i>	CACATTTGGAAAGGGGCAAACG
RIG-I-CRISPR- <i>forward</i>	GGGAAACGAACTAGCCCGA
RIG-I-CRISPR- <i>reverse</i>	CCTGGGCAGACCTACCTACT

**Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer für die Amplifikation des Genabschnittes mit den *guideRNA*-Zielsequenzen**

## Verwendete PCR-Programme zur CRISPR/Cas9-Klon-Analyse

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Dauer (Sek.)</u>
<b>LGP2 und RIG-I:</b>		
1. Denaturierung	98,0	210
2. <i>Annealing</i>	60,0	30
3. Elongation	72,0	30
Zyklen	36	
<b>MDA5:</b>		
1. Denaturierung	98,0	310
2. <i>Annealing</i>	62	30
3. Elongation	72,0	30
Zyklen	31	

Tabelle 9: Verwendete PCR-Programme zur CRISPR/Cas9-Klon-Analyse

## 3.3.3. Agarosegel-Elektrophorese

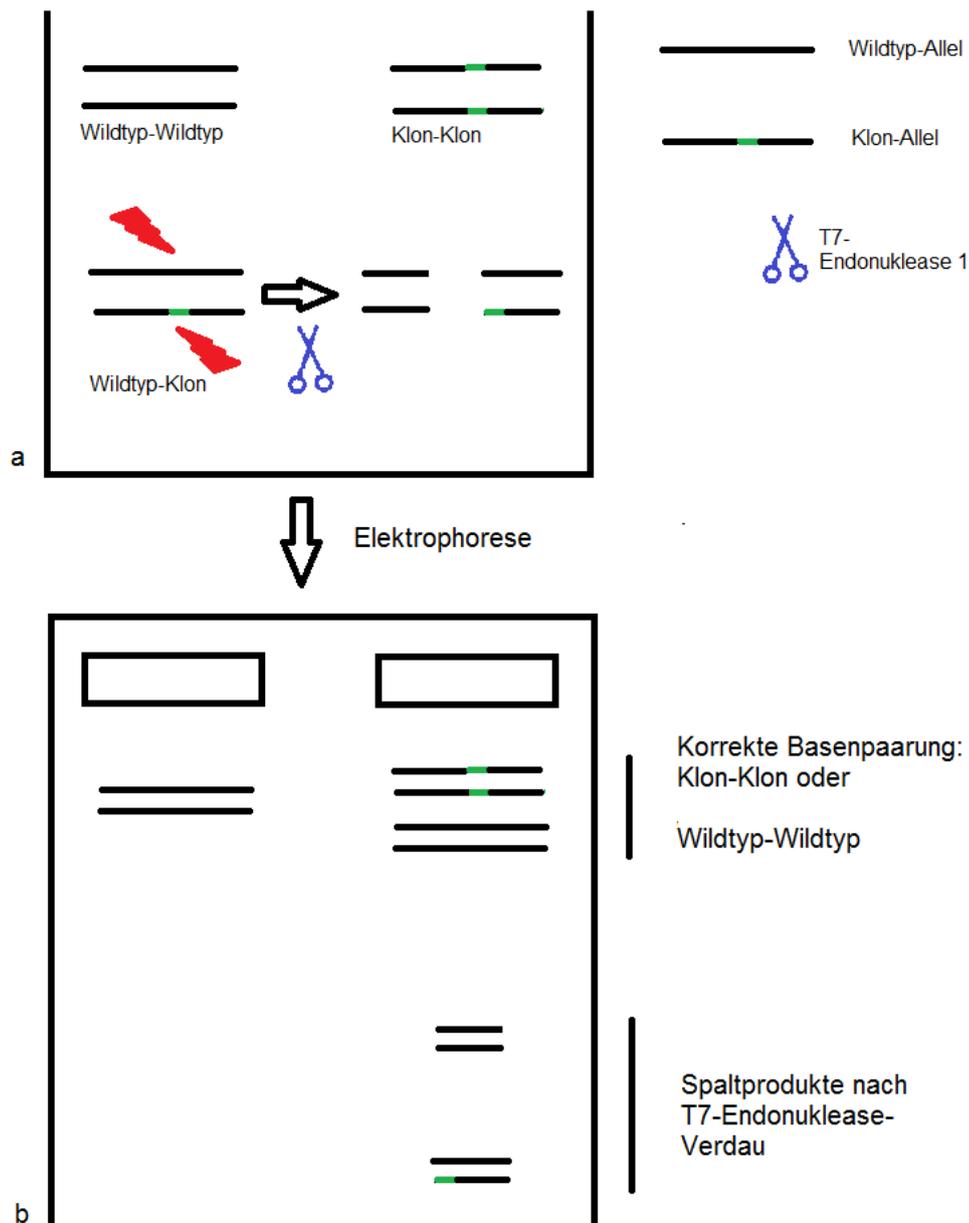
Die Analyse und Visualisierung der PCR-Produkte geschieht mittels Auftrennung der Fragmente nach ihrer Länge in einem Agarosegel mithilfe eines Spannungsfeldes. Hierzu wurde ein 1,0 % Agarosegel mit 1x TAE-Puffer zubereitet und mit 5 % Ethidiumbromid versetzt, um die DNA-Fragmente unter Ultraviolettstrahlung (UV) sichtbar werden zu lassen. Die DNA-Proben wurden, mit einem Ladepuffer (ThermoFisher *Scientific*, Waltham, USA) gemischt, in die Ladekammern des Agarose-Ethidiumbromid-Gels geladen. Zur Quantifizierung der einzelnen DNA-Fragmentlängen wurde eine aus definierten DNA-Fragmenten bestehende DNA-Leiter (ThermoFisher *Scientific*) als Standard in eine Kammer des Gels geladen. Anschließend wurde die Auftrennung der DNA für 30 Minuten in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad-*Laboratories*, Hercules, USA) in 1x TAE-Puffer bei 100V durchgeführt. Durch das Spannungsfeld wird die negativ-geladene DNA zur Anode hin nach ihrer Größe aufgeteilt, wobei die größeren Fragmente erschwert durch das netzartige Gel wandern und daher kathodennahe bei den Ladekammern verbleiben. Das Ethidiumbromid lagert sich als interkalierendes Salz an doppelsträngige DNA oder RNA an. Nach Bindung wird die Fluoreszenz des Ethidiumbromids verstärkt (Produktdatenblatt Sigma-Aldrich: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/e7637?lang=de>). Durch eine UV-Bestrahlung in einen UV-Transilluminator (Amershampharmacia Biotech *Europe*) oder mittels Computer-gestütztem Alphamager bei 302 nm (Alpha-InnoTec) werden die DNA-Banden sichtbar.

## 3.3.4. T7-Endonuklease-1-Verdau

Die T7-Endonuklease1 (T7E1) ist ein Enzym mit der Eigenschaft fehlgepaarte Nukleotide in einer DNA-Probe zu erkennen und innerhalb der ersten drei Phosphodiester-Bindungen in 5'-Richtung einen Doppelstrangbruch einzufügen (Produktdatenblatt *NewEnglandBiolabs*, Ipswich, USA; online: <https://www.neb.com/products/m0302-t7-endonuclease-i>). Die T7E1 hat sich im Vergleich zu ähnlichen

Enzymen (*Surveyor*, T4-Endonuklease-VII, Endonuklease-V) durch höhere Sensitivität in Erkennung von Mutationen bewährt [109,110].

Die Durchführung erfordert zunächst die Amplifikation der Zielsequenzen der CRISPR/Cas9-Konstrukte mittels PCR aus jedem Einzelzellklon (Abschnitt 3.3.2). Anschließend werden die PCR-Produkte jedes Zellklons mit einem PCR-Produkt aus mit der Wildtyp-Zelllinie equimolar (1:1) vermischt und in einem 10 µl Ansatz mit 5 Einheiten T7E1 nach vorheriger Denaturierung für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Durch Denaturierung und *annealing* der gemischten Probe entstehen drei mögliche *annealing*-Produkte (*Abbildung 8a*): Wildtyp-Wildtyp, Klon-Klon und Wildtyp-Klon.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung eines T7E1-Assays**

a) Die Wildtyp- und Klon-PCR-Produkte werden in einem PCR-*tube* vermischt. Der grün-markierte Bereich des Klon-Allels stellt eine Mutation dar. Nach der Denaturierung kann es zu einer fehlerhaften Basenpaarung zwischen einem Wildtyp- und einem Klon-Allel kommen (rote Blitze). Diese wird nach Zugabe der T7-Endonuklease erkannt und ein Doppelstrangbruch eingeführt.

b) Nach Agarosegel-Elektrophorese kann aufgrund des Bandenmusters beurteilt werden, ob eine Mutation in der Zielsequenz vorliegt, wenn zusätzliche Banden der T7E1-Spaltprodukte nachweisbar sind.

Bei Vorliegen einer Mutation in der Zielsequenz bei einem der Zellklone entsteht eine fehlerhafte Basenpaarung zwischen dem Wildtyp- und Klon-Allel. Diese wird nach Zugabe der T7-Endonuklease1 erkannt und ein Doppelstrangbruch eingeführt. Nach dem T7E1-Verdau kann das Produkt mittels Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt werden (Abschnitt 3.3.3). Bei Vorliegen einer Mutation in der Zielsequenz eines Einzelzellklons entstehen durch die Elektrophorese drei distinkte Banden (*Abbildung 8b* und *Abbildung 11a*). Das längste Fragment (oberste Bande) entspricht den unverdauten *annealing*-Produkten Wildtyp-Wildtyp und Klon-Klon Allelen. Die unteren beiden Fragmente entsprechen dem verdauten *annealing*-Produkt zwischen Wildtyp-Klon, wobei es durch eine Mutation in der Zielsequenz zu einer fehlerhaften Basenpaarung und Verdau durch die T7E1 gekommen ist. Diese Methode erlaubt ein einfaches *screening* der CRISPR/Cas9-behandelten-Zellklone. Falls nach dem T7E1-Verdau drei Banden sichtbar werden, wird der Klon als möglicher *knockout* Klon durch Sanger-Sequenzierung Zielsequenz (Abschnitt 3.3.5) und Protein-Expression im *westernblot* (Abschnitt 3.4.3) validiert.

### 3.3.5. Sequenzierung

Die Sequenzierung bietet die präziseste Analyse einer DNA-Probe durch Identifizierung der exakten Nukleotid-Sequenz. Die verwendeten SmartSeq-Sequenzierungskits (*Eurofins Genomics*, Ebersberg, Deutschland) wurden mit dem PCR-Produkt der Zielsequenz (*template*), sowie dem entsprechenden *forward*-Primer (*Tabelle 8*) nach Herstellerangaben eingeschickt. Die erhaltenen DNA-Sequenzen wurden anschließend mit dem frei zugänglichen Programm „ApE – A *plasmid editor*“ (online erhältlich: <http://biologylabs.utah.edu/~jorgensen/wayned/ape/>) ausgewertet. Die BLAST-Datenbank des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI; online: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erlaubt den Abgleich erhaltener DNA-Sequenzen mit Wildtypsequenzen, um eventuell vorhandene Mutationen zu charakterisieren. Hierdurch konnten die Zielsequenzen der CRISPR-Klone überprüft werden.

## 3.4. Proteinanalysen

Neben der DNA-Analyse ist die Analyse der Proteinexpression des Zielproteins ein wichtiger Schritt in der Validierung potenzieller *knockout* Klone. Hierbei können mittels immunologischer Reaktionen, vermittelt durch Antikörper-Bindungen, das Vorhandensein eines Proteins in Zellen oder Überständen spezifisch nachgewiesen und quantifiziert werden.

### 3.4.1. Zelllyse

Befindet sich das Zielprotein intrazellulär, müssen die Zellen zunächst lysiert (=Auflösung der Zellen) werden, um die Proteine aus dem Zellinneren zu befreien. Dies wird mit einem speziellen Puffer erreicht, der die Proteine nach der Lyse stabilisiert. Der verwendete RIPA-Puffer (*Radioimmunopräzipitations-assay-Puffer*, Lyse-Puffer) bewirkt neben der Auflösung der Zytoplasmamembran auch einen Abbau

der Kernmembran und erlaubt daher auch die Untersuchung nuklearer Proteine (z.B. von Transkriptionsfaktoren).

Für eine Protein-Extraktion wurden  $6 \times 10^4$  Zellen mit Kochsalzlösung gewaschen und anschließend mit 250  $\mu\text{L}$  RIPA-Puffer bedeckt und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gelöst und für weitere 10 Minuten bei 4 °C in einem 1,5 mL Zentrifugenröhrchen inkubiert. Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 4 °C mit 16000xg kann der proteinhaltige Überstand vom Zelldetritus (v.a. DNA und Lipide) getrennt und stabil bei -20 °C gelagert werden.

#### Zusammensetzung des RIPA-Lyse-Puffers

Tris-HCl	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
SDS	0,1 %
Sodium Deoxycholate	0,5 %
Sodium Orthovanadate	1 mM
NaF	1 mM
pH	8,0
ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Lyse-Puffers**

#### 3.4.2. Lowry Protein Assay

Zur Interpretation von Proteinexpressionen aus Zellversuchen müssen gleiche Mengen einer Proteinsuspension verwendet werden. In dieser Arbeit wurden Proteinkonzentration aus Zelllysaten nach dem Herstellerprotokoll des „DC Protein Assay“ (Bio-Rad-Laboratories, Hercules, USA) bestimmt. Das verwendete Protokoll basiert auf der Lowry-Methode, entwickelt 1951 von Oliver Lowry <sup>[111]</sup>. Die Methode besteht aus einer zweistufigen Reaktion zwischen Proteinen, einer alkalinen Kupfer-Tartrat-Lösung und dem Folin Reagenz (Produktdatenblatt Bio-Rad-Laboratories, online: <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/LIT448.pdf>). Als Endprodukt entsteht eine Blaufärbung, die kolorimetrisch erfasst und quantifiziert wird. Diese wurde bei 750 nm Absorption im Mithras LB940 (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland) ausgelesen. Zur Standardisierung diente eine Albumin-RIPA-Lösung mit Konzentrationen 0,1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 1,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  und 5,0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

#### 3.4.3. Westernblot

Der *western blot*, auch Protein Immunoblot genannt, gilt als Goldstandard zum spezifischen Nachweis einzelner Proteine in einem Proteingemisch (z.B. Zelllysate). Die SDS-PAGE (SDS= Natriumdodecylsulfat; PAGE= Polyakrylamid-Gelelektrophorese) wurde maßgeblich von U. K. Lämmli <sup>[112]</sup> und Tobwin et al. <sup>[113]</sup> entwickelt und erlaubt die Trennung von Proteinen entsprechend ihrer Masse in einem Gel durch ein Spannungsfeld (Elektrophorese), mit anschließender Übertragung auf

eine Membran (*blotten*). Durch die diskontinuierliche Auftrennung im Spannungsfeld entstehen einzelne Proteinbanden. Mithilfe von Antikörpern und Chemilumineszenz können anschließend Zielproteine auf der Membran dargestellt werden. Der Begriff „*western blot*“ wurde 1981 durch W. N. Burnette <sup>[114]</sup>, in Anspielung auf eine ähnliche Methode zum Nachweis spezifischer DNA-Fragmente („*southern blot*“ <sup>[115]</sup>), geprägt <sup>[116]</sup>.

### 1. Elektrophorese

Zunächst werden die Zelllysate (Abschnitt 3.4.1) durch Erhitzen auf 95 °C im Lämmli-Puffer (*Tabelle 11*) denaturiert. Das im Lämmli-Puffer enthaltene SDS lagert sich an die Proteine an und sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung und Auftrennung rein nach Masse, unabhängig von der Proteinladung <sup>[117,118]</sup>. Die verwendete Proteinmenge wurde mittels Lowry Protein Assay zuvor angepasst (Abschnitt 3.4.2). Anschließend werden die denaturierten Proteine auf ein Polyacrylamidgel geladen (*Tabelle 12*), das in einer Elektrophorese-Kammer (ThermoFisher *Scientific*, Waltham, USA) mit Elektrophorese-Puffer (*Tabelle 13*) eingespannt wurde. Als späterer Massenstandard diente der „*PageRuler Prestained Protein Ladder*“ (ThermoFisher *Scientific*, Waltham, USA) mit zehn rekombinanten Proteinen mit bekannter Masse (10 kDa bis 170 kDa).

#### Zusammensetzung des Lämmli-Puffers (1x)

---

2-Mercaptoethanol	0,1 %
Bromophenol Blau	0,0005 %
Glycerol	10 %
SDS	2 %
Tris-HCl	63 mM
pH	6,8

**Tabelle 11: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers (1x).**

SDS = Natriumdodecylsulfat

#### Zusammensetzung des Polyacrylamid-Gels

---

	<u>Stacking Gel (5 %)</u>	<u>Resolving-Gel (10 %)</u>
Acrylamid	5 %	10 %
Tris-HCl	0,125 M (pH=6,8)	0,375 M (pH=8,8)
APS	0,1 %	0,1 %
TEMED	40 µL	40 µL
SDS	0,1 %	0,1 %
ddH <sub>2</sub> O		

**Tabelle 12: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Elektrophoreseegel**

APS = Ammoniumperoxodisulfat, SDS = Natriumdodecylsulfat, TEMED = Tetramethylethyldiamin

Anschließend wird die Elektrophoresekammer an das Spannungsgerät (Bio-Rad-Laboratories) angeschlossen, sodass die mit SDS beladenen Proteinketten an dem Anoden-Ende geladen werden und zum Kathoden-Ende der Elektrophoresekammer im Spannungsfeld wandern. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung durchgeführt (100 V im *stacking*-Gel, 150 V im *resolving*-Gel). Entsprechend der DNA-Agarose-Elektrophorese (Abschnitt 3.3.3) können längere Proteinketten das Polyacrylamidgel nur langsamer durchdringen und bleiben daher am Anoden-Ende des Gels zurück. Kleinere Proteinketten durchwandern das Gel in Richtung Kathoden-Ende des Gels <sup>[116,118]</sup>.

---

#### Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers (*Running-Buffer*)

---

Tris	25 mM
Glycine	190 mM
SDS	0,1 %
pH	8,3
ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 13: Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers**

SDS = Natriumdodecylsulfat

## 2. Blotting

Als *blotting* wird die Übertragung der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran bezeichnet. Die hier verwendeten PVDF-Membranen (Polyvinylidenfluorid) müssen vor dem *blotting* zur Minderung der Oberflächenhydrophobie in Methanol aktiviert werden. Das anschließende *wet-blotting* (Nass-*blotting*) wurde in einem Tank-*blotter* (Bio-Rad-Laboratories) mithilfe eines Spannungsfeldes in einem *wet-/* Transfer-Puffer (Tabelle 14) für 120 Minuten bei 110V konstanter Spannung durchgeführt.

---

#### Zusammensetzung des *wet-/* Transfer-Puffers

---

Tris	25 mM
Glycine	192 mM
Methanol	20 %
ddH <sub>2</sub> O	
pH	8,3

**Tabelle 14: Zusammensetzung des *wet-/* Transfer-Buffers**

## 3. Detektion

Nach dem *blotting* sind die aufgetrennten Proteine auf der Membran fixiert und können durch Antikörperbindung und anschließender Chemilumineszenzreaktion visualisiert werden. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen an der PVDF-Oberfläche werden diese nach dem *blotting* zunächst mit Milchlösung geblockt

(5-% Milchlösung (Carl Roth GmbH) in TBST-Puffer; *Tabelle 15*). Die anschließende Inkubation mit Antikörpern erfolgt in zwei Schritten: der primäre Antikörper richtet sich gegen ein Epitop des gesuchten Proteins, der sekundäre Antikörper richtet sich gegen den primären Antikörper und ist mit dem Enzym HRP konjugiert (= *horseradish peroxidase* = Meerrettichperoxidase). Die Visualisierung der gesuchten Proteinbande erfolgte nach Zugabe des ECL-Substrats (*Enhanced-Chemilumineszenz*) für HRP (*SuperSignal West Pico*, ThermoFisher *Scientific*, Waltham, USA). Dieses wird durch die HRP in Luminol umgewandelt, dessen Lumineszenz mittels eines *Luminescent Image Analyzer LAS4000* (*Fujifilm*, Minato, Japan) detektiert wird. Zur Überprüfung der geladenen Proteinmenge erfolgte eine Ladekontrolle mittels GAPDH (=Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Dies ist ein Protein, das in allen Zellen gleichermaßen exprimiert wird und daher in gleicher Intensität detektierbar sein sollte (GAPDH Bande bei 37 kDa).

Zusammensetzung des TBST-Puffers

Tris	50 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,1 %
pH	7,6
ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 15: Zusammensetzung des TBST-Puffers**

TBST = *Tris-buffered saline* (NaCl-Lösung) mit Tween

Antikörper-Verdünnung

	Primärer Antikörper	Sekundärer Antikörper
Verdünnung	1:500 – 1:20.000	1:3000
Natrium Azid	0,005 %	-----
5 %-Milch-TBST		

**Tabelle 16: Antikörper-Verdünnung zur Protein-Detektion**

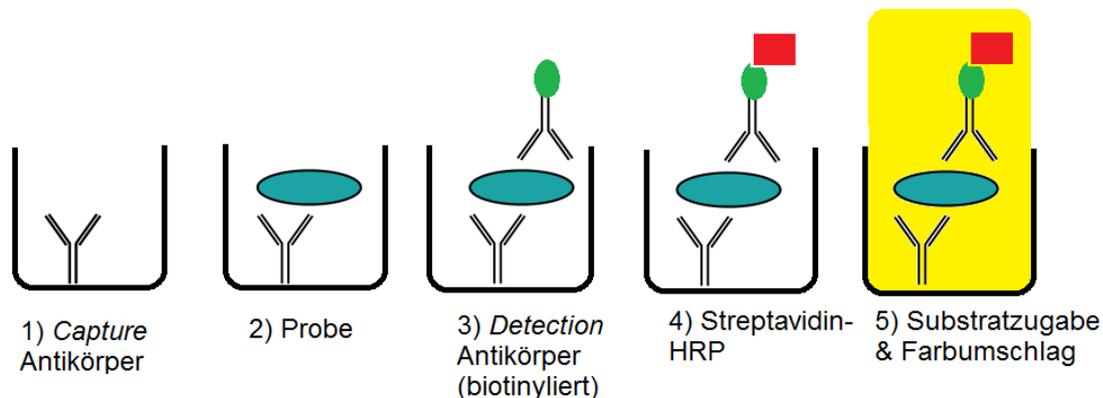
Die verwendeten Antikörper werden entsprechend ihrer Bindungsaffinität und Konzentration in 5%-Milch-TBST-Lösung verdünnt. Zur Mehrfachnutzung und Aufbewahrung der Antikörperlösung kann mikrobielles Wachstum durch Natrium Azid unterbunden werden. Das zugefügte Natrium Azid inhibiert jedoch das HRP-Enzym und darf daher nicht mit den sekundären Antikörpern in Kontakt kommen. Dazu werden Spülvorgänge der Membranen mit TBST durchgeführt.

3.4.4. ELISA zum Nachweis von humanem IP-10

Der *enzyme-linked immunosorbant assay* (ELISA) bietet neben dem überwiegend qualitativen *westernblot* (Abschnitt 3.4.3) eine Methode zur Proteinquantifizierung. Das hier verwendete humane-IP-10-ELISA-kit (BD *Biosciences*, San Jose, USA) basiert auf einem direkten *sandwich immunoassay* (*Abbildung 9*), wobei das Zielantigen (hier: humanes IP-10) durch einen *capture*-Antikörper an der Oberfläche einer Mikrotiterplatte gebunden und fixiert wird. Anschließend bindet ein zweiter *detection*-Antikörper ein weiteres Epitop. Der *detection*-Antikörper enthält zusätzlich Biotin-Moleküle (Vitamin H, Biotinylierung). Zur Auswertung wird zusätzlich HRP

(Abschnitt 3.4.3) hinzugefügt. Das HRP ist an Streptavidin gekoppelt, welches spezifisch an das Biotin des *detection*-Antikörpers bindet. Die Menge gebundenen HRP korreliert daher mit der Konzentration des Zielantigens. Durch die Zugabe eines Substrat Reagenzes (BD Biosciences, San Jose, USA) kommt es durch die HRP-vermittelte Reaktion zu einer sichtbaren Farbveränderung, die mittels Schwefelsäure zur Auswertung arretiert werden kann. Eine Standardmessreihe mit rekombinantem hIP-10 ermöglicht eine Quantifizierung des Zielantigens. Die Auswertung der Farbtintensität erfolgte mittels Absorptionsmessung im Mithras LB940 (Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland).

In dieser Arbeit wurde der ELISA zur Bestimmung der kumulativen Immunaktivität anhand der Menge von hIP-10 im Überstand der Zellklone nach Stimulation oder Infektion verwendet.



**Abbildung 9: Sandwich ELISA**

(Modifiziert, nach BioRad Laboratories: "Guide: An Introduction to ELISA – Overview of direct sandwich ELISA", online: <https://www.bio-rad-antibodies.com/human-mouse-rat-antibodies-matched-elisa.html> )

### 3.4.5. Electrophoretic mobility shift assay

Der *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) erlaubt die Visualisierung von Protein-RNA-Komplexen. Die Methode wurde aufgrund der Arbeiten von Fried & Crothers<sup>[119]</sup> und Rezvin et al.<sup>[120]</sup> basierend auf einer nativen Elektrophorese entwickelt. Das hier verwendete Protokoll entstammt der Arbeit von Berke & Modis<sup>[68]</sup>:

Die native Agarose-Elektrophorese (Abschnitt 3.3.2) ermöglicht die Auftrennung von RNA nach ihrer Masse unter dem Erhalt von Protein-RNA-Komplexen. Freie RNA-Moleküle wandern schneller durch das Agarosegel in Richtung Kathode als RNA-Protein-Komplexe<sup>[121]</sup>. Diese Laufdifferenz wird durch anschließende Färbung der RNA mittels *SYBR-Green-II* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sichtbar und imponiert als *shift* (versetzen). Der EMSA liefert einen indirekten Nachweis einer Protein-RNA-Interaktion.

Proteine und RNA wurden in einem EMSA-Puffer (Tabelle 17) auf jeweils 20 µL verdünnt und in einem PCR-Thermocycler (Biometra GmbH) bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Proben mithilfe von 5 % Glycerol auf ein 1,2 % Agarosegel in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad-Laboratories) aufgetragen und bei 100 V konstant für 60 Minuten in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde die RNA mithilfe von *SYBR-Green-II* (1:2500 in 1x TAE-Puffer) lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 60 Minuten gefärbt. Auf diese Färbung konnte

bei späteren Versuchen mit *DNA Stain Clear G* durch direkte Zugabe in das Agarosegel verzichtet werden. Die Visualisierung wurde mittels Alphamager bei 302 nm (*Alpha-InnoTec*, Kasendorf, Deutschland) durchgeführt.

In dieser Arbeit wurde der EMSA zur Analyse des Bindungsverhaltens der rekombinanten RLR-Proteine mit synthetischen RNAs (poly(I:C), pppRNA) verwendet, sowie der Überprüfung einer Interaktion zwischen RLR und viralen Ribonukleinsäure-Protein-Komplexen (RNP).

---

Zusammensetzung des EMSA-Puffers

---

Hepes	20 nM
NaCl	150 nM
MgCl <sub>2</sub>	3 nM
pH	7,5
DTT	1 nM
ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 17: Zusammensetzung des EMSA-Puffers**

DTT wurde kurz vor Verwendung dem Puffer zugefügt. DTT = Dithiothreitol

#### 3.4.6. Firefly-Luciferase Reporter assay

Die *firefly*-Luciferase ist ein häufig verwendetes Reporter gen in Versuchen zur Untersuchung der Expressionsänderung von Genen. In Promotorstudien wird die Promotorsequenz des zu untersuchenden Zielgens vor das Reporter gen auf einem Plasmid gekoppelt <sup>[108]</sup>. Basierend auf der ersten Klonierung der *firefly*-Luciferase (Glühwürmchen) in ein *E. coli* Expressionsplasmid durch de Wet et al. <sup>[122]</sup> und anschließende Transfektion in Versuchszellen kann die Expression des Zielgens anhand der Promotoraktivität durch Messung des Reporter gens quantifiziert werden. Als Reporter gen wurde die *firefly*-Luciferase der *Photinus pyralis* verwendet. Die Luciferase produziert in Anwesenheit eines geeigneten Substrates eine messbare grüne Biolumineszenz (650 nm) <sup>[108,123,124]</sup>. Durch Kombination mit einer zweiten, konstitutiv (dauerhaft) aktiven Luciferase (*Renilla*-Luciferase der Qualle *Renilla reniformis*) wird die gemessene Promotoraktivität relativ zur Transfektionseffizienz der Versuchszellen standardisiert <sup>[108]</sup>. Das verwendete Substrat der *firefly*-Luciferase ist in *Tabelle 18* aufgeführt, für die *Renilla*-Luciferase wurde das Substrat Coelenterazin-h (Promega Corp., Madison, USA) verwendet.

In dieser Arbeit wurde der Luciferase-Reporter-assay zur Überprüfung der Aktivität des RLR-Signalwegs in durch CRISPR/Cas9 Geneditierung erstellten *knockout* Klonen durch Transfektion von Stimulationsplasmiden (Abschnitt 2.8.2) auf unterschiedlichen Ebenen des RLR-Signalwegs eingesetzt. Als Reporter gen wurde dabei der an *firefly*-Luciferase-gekoppelte IFN-β-Promotor verwendet. Zur Durchführung werden zunächst 2x10<sup>4</sup> Zellen in Triplikaten je Stimulationsbedingung in 150 µL komplettiertem DMEM in 96-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät und nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C mit den Plasmiden mithilfe des *GeneJuice* Transfektionsreagenz (Merck Millipore, Billerica, USA) transfiziert. Die Zusammensetzung eines Transfektionsansatzes je *well* ist in *Tabelle 19* aufgeführt. Die transfizierten Zellen werden anschließend nach 24 Stunden Inkubation mit 50 µL 1x *passive lysis buffer* lysiert und jeweils 20 µL des Zelllysats auf zwei

lichtundurchlässige 96-Mikrotiterplatten verteilt. Nach Hinzugabe von entweder 20 µL Firefly-Substrat oder Coelenterazin-H (Renilla-Luciferase-Substrat; 1:800 verdünnt) wird die Lumineszenz im Mithras LB940 (Berthold *Technologies* GmbH, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen. Die Ergebnisse werden als RLU = Relative Light Units als Quotienten aus gemessener *firefly*-Lumineszenz / Renilla-Lumineszenz angegeben.

#### Verwendetes *firefly*-Luciferasesubstrat

Tricine	20 mM
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	2,67 mM
EDTA, pH=8,0	0,1 mM
DTT	33,3 mM
ATP	0,53 mM
Acetyl-CoA	270 µM
Luciferin	131,6 µg/mL
Natriumhydroxid	5 mM
Magnesiumcarbonathydroxid	0,265 mM
ddH <sub>2</sub> O	

**Tabelle 18: Verwendetes *firefly*-Luciferasesubstrat**

Das *firefly*-Luciferasesubstrat ist lichtempfindlich und muss daher lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden. Acetyl-CoA = Acetyl-Coenzym A, DTT = Dithiothreitol, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure

#### Luciferase-assay Transfektion

<u>Reagenz</u>	<u>Menge</u>
IFN-β-Luciferase-Reporterplasmid	50 ng
Renilla-Luciferaseplasmid	50 ng
Stimulationsplasmid	50 ng
GeneJuice	0,45 µL
Opti-MEM	ad 50 µL

**Tabelle 19: Zusammensetzung eines Luciferase-Transfektions-Ansatzes**

## 3.5. Genexpressionsanalyse

### 3.5.1. RT-qPCR

Die *reverse transcription quantitative PCR* (RT-qPCR oder qPCR) gilt als Goldstandard zur Bestimmung der Genexpression <sup>[125]</sup>. Die wissenschaftlichen Grundlagen hierfür lieferten David Baltimore <sup>[126]</sup> und Howard Temin <sup>[127]</sup> 1970 mit der Entdeckung der reversen Transkription und ein Jahr später erstmalig durch Sol Spiegelman erfolgreich durchgeführt <sup>[128]</sup>.

Die RT-qPCR ähnelt einer normalen PCR <sup>[129]</sup> (Abschnitt 3.3.2): Das Zielgen wird aus einer DNA Probe (hier: cDNA) spezifisch amplifiziert. Am Ende jedes Zyklus bindet jedoch zusätzlich eine Sonde an einen Abschnitt des Zielgens. Die Sonden der *universal probe library* (UPL; Roche, Basel, Schweiz) sind an ein Fluorochrom

gekoppelt und strahlen nach Anregung Licht einer bestimmten Wellenlänge ab <sup>[130]</sup>. Die UPL-Proben binden während des *annealings* an die Zielsequenz, allerdings entsteht durch die räumliche Nähe von 5' fluorescein (FAM) und einem 3' *quencher* (Löscher) keine Fluoreszenz. Durch Polymerase-vermittelte Hydrolyse während der Elongation (*Tabelle 24*) wird das FAM vom *quencher* befreit (<https://lifescience.roche.com/documents/RealTime-ready-Universal-ProbeLibrary.pdf>). Durch Messung der Fluoreszenz kann die Menge des Zielgens quantifiziert werden.

Zur Quantifizierung einer Genexpression muss zunächst die mRNA mithilfe der reversen Transkription in DNA umgeschrieben werden. Sie erlaubt den Umschrieb einer einzelsträngigen RNA in eine doppelsträngige cDNA (komplementäre DNA). Zur Standardisierung wird die ermittelte mRNA Menge des Zielgens mit der eines konstitutiv aktiven Gens (sogenanntes Housekeepinggen) als internen Standard verglichen <sup>[108]</sup>. Die einzelnen Schritte einer RT-qPCR werden folgend kurz vorgestellt:

### 1. RNA Extraktion:

Die RNA-Extraktion der virusinfizierten Zellen wurde nach Standardprotokoll des „peqGOLD *Total RNA Kit C-Line*“ (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Die extrahierte RNA kann bei -80 °C gelagert werden.

### 2. Reverse Transkription

Nach RNA-Extraktion wurde die RNA-Konzentration photometrisch im „NanoDrop 2000c“ (ThermoFisher *Scientific*, Waltham, USA) gemessen. Eine Qualitätskontrolle erfolgte durch die OD<sub>260/280</sub> Messung (1,8-2 entspricht guter Qualität), jedoch wurde keine Integritätskontrolle durchgeführt <sup>[129]</sup>. Der anschließende Umschrieb der mRNA in cDNA (reverse Transkription) erfolgte in je 50 µL Ansätzen (*Tabelle 20*) mit Oligo(dT)-*Microbeads* als Primer (bindet den Poly-A-Schwanz der mRNA; Metabion GmbH, Steinkirchen, Deutschland). Die Durchführung der reversen Transkription erfolgte im *Thermocycler* (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland; *Tabelle 21*). Die entstandene cDNA ist stabiler als die RNA und kann bei -20 °C gelagert werden.

---

#### Zusammensetzung des Ansatzes für die reverse Transkription

---

RNA Probe	125 ng
RT-Puffer	10 µL
dNTPs	1 µM
Oligo(dT) <i>Microbeads</i>	1 µM
<i>RiboLock</i> Rnase Inhibitor	1,25 µL
Reverse Transkriptase	0,1 µL
In RNase freiem Wasser	ad 50 µL

**Tabelle 20: Zusammensetzung des reversen Transkriptionsansatzes**

## Verwendetes Temperatur-Programm für die reverse Transkription

<u>Schritt</u>	<u>Temperatur (°C)</u>	<u>Dauer (min)</u>
1. Reverse Transkription	42,0	60
2. Abspaltung der Oligo (dT) <i>Microbeads</i>	70,0	10
3. Abkühlung	4,0	

Tabelle 21: Verwendetes Temperatur-Programm für die reverse Transkription

## 3. qPCR:

Die qPCR erfolgte in zweifachen technischen Replikaten im *LightCycler II* (Roche, Basel, Schweiz) in je 10 µL Ansätzen (*Tabelle 23*). Das verwendete Protokoll und die verwendeten Primer sind in *Tabelle 22* und *Tabelle 24* beschrieben.

## Verwendete Primer und Sonden der RT-qPCR

<u>Zielgen</u>	<u>Primer (5' – 3')</u>	<u>Universal Probe Library Sonde</u>
β-Aktin (human)	<i>Forward:</i> CCAACCGCGAGAAGATGA <i>Reverse:</i> CCAGAGGCGTACAGGGATAG	#64
Interferon- β (human)	<i>Forward:</i> CGACACTGTTCGTGTTGTCA <i>Reverse:</i> GAGGCACAACAGGAGAGCAA	#25
IP-10 (human)	<i>Forward:</i> AAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT <i>Reverse:</i> GACATATACTCCATGTAGGGAAAGTGA	#34
TLR3	<i>Forward:</i> GGACTTTGAGGCGGGTGTT <i>Reverse:</i> TGTTGAACTGCATGATGTACCTTGA	#80
Mengovirus A1	<i>Forward:</i> ATGGCCAATTTTCGAATCTG <i>Reverse:</i> GGAGGGGGAGCATGTTAGA	#68
VSV-N	<i>Forward:</i> CGAAGACAAACAAACCATTATTATCA <i>Reverse:</i> TCTGCAACTTCTCGGTTCAA	#85
LGP2 (human)	<i>Forward:</i> GCCTTGCAAACAGTACAACCT <i>Reverse:</i> TCTTCAGCAAGTCCCAAAC	#71

Tabelle 22: Verwendete Primer und Sonden für RT-qPCR-Assays

## Zusammensetzung eines RT-qPCR-Ansatzes

cDNA	3 µL
Kapa Probe Fast qPCR Master Mix (2x)	5 µL
Primer 1 ( <i>forward</i> )	0,2 µM
Primer 2 ( <i>reverse</i> )	0,2 µM
Universal Probe Library Sonde	0,1 µM
In ddH <sub>2</sub> O	ad 10 µL

Tabelle 23: Zusammensetzung eines RT-qPCR-Ansatzes

## Verwendetes Protokoll der RT-qPCR

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer (Sek.)
1. Denaturierung	98,0	210
2. Annealing	60,0	30
3. Elongation	72,0	30
4. Sonde		
Zyklen:	40	

Tabelle 24: Protokoll der RT-qPCR

Die Auswertung erfolgte mittels relativer Quantifizierung des *LightCycler* Programms durch die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode:

$$\text{Relative Quantifizierung} = 2^{(\Delta C_t \text{ Zielgen} - \Delta C_t \beta\text{-Aktin})}$$

Die  $C_t$ -Werte (Threshold-Werte) für das Zielgen und Housekeepinggen ( $\beta$ -Aktin) wurden durch den *LightCycler* errechnet. „2“ entspricht der „PCR-Effizienz“, was einer kontinuierlichen Produkt-Verdopplung entspricht. Dies ist eine sehr grobe Annäherung und setzt optimale Bedingungen voraus<sup>[131]</sup>.

Die RT-qPCR wurde in dieser Arbeit als Querschnittsanalyse für einen zusätzlichen Informationsgewinn über die Dynamik der Immunaktivität oder Virusreplikation verwendet. Neben den kumulativen Endpunkt-Analysen (ELISA, TCID<sub>50</sub>) können durch die mRNA-Expressionsanalyse Aussagen über einen bestimmten Zeitpunkt getroffen werden.

## 3.6 Virusreplikationsassays

### 3.6.1 TCID<sub>50</sub>

Die „*median tissue culture infective dose 50*“ (TCID<sub>50</sub>) ist eine einfache Methode zur Bestimmung einer Viruskonzentration (Titer) durch Endpunkttitration. Diese Zellkultur-basierte Methode erlaubt eine schnelle und kostengünstige Alternative zur Titerbestimmung mittels Versuchstieren<sup>[132]</sup>. Der Virustiter wird anhand des zytotoxischen Effektes auf eine sensible Zelllinie (hier: BHK-21) bestimmt. Es wurden  $5 \times 10^3$  BHK-21-Zellen in 180 µL BHK-Medium je *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte

ausgesät und 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die anschließende Infektion der BHK-21-Zellen mit der Virusprobe erfolgte mittels 12-stufiger, serieller, dezimaler (Faktor 10) Verdünnungsreihe (entsprechend der 12 Spalten der Mikrotiterplatte), jeweils in 8 Replikaten (entsprechend der 8 Reihen der Platte) in Opti-MEM. Als Endpunkt wurden hier 6 Tage nach der Infektion die Anzahl positiver *well* ( $\geq 50\%$ -iger Zelltod) der 8 Replikate je Verdünnung notiert. Die Auswertung erfolgte mittels frei zugänglicher Kalkulationstabelle von M. Binder der Universität Heidelberg, Abteilung für Molekulare Virology (online: <https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/zentrum-fuer-infektiologie/molecular-virology/welcome/downloads>).

In dieser Arbeit wurde diese Titermessung zur Bestimmung der Viruskonzentration in Virusvorräten (Abschnitt 3.1.3) und zur Bestimmung der Viruslast im Überstand nach Virusinfektion verwendet.

### 3.6.2 CellTiter Blue

Der *CellTiter Blue* (CTB) Assay ist ein Vitalitätstest zur Prüfung intakter Zellfunktion. Hierbei wird ein frei diffundierbarer Stoff von vitalen Zellen metabolisiert, wobei ein fluoreszierender Farbstoff entsteht. Die Fluoreszenz korreliert demnach mit der Anzahl metabolisch-aktiver und somit vitaler Zellen <sup>[97]</sup>.

Der verwendete „*CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*“ (Promega Corp., Madison, USA) basiert auf folgender Reduktionsreaktion (Datenblatt: *CellTiter-Blue® Cell Viability Assay*, online: <https://www.promega.de/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol.pdf>):

Resazurin (Alamar *Blue*) → Resorufin (fluoresziert)

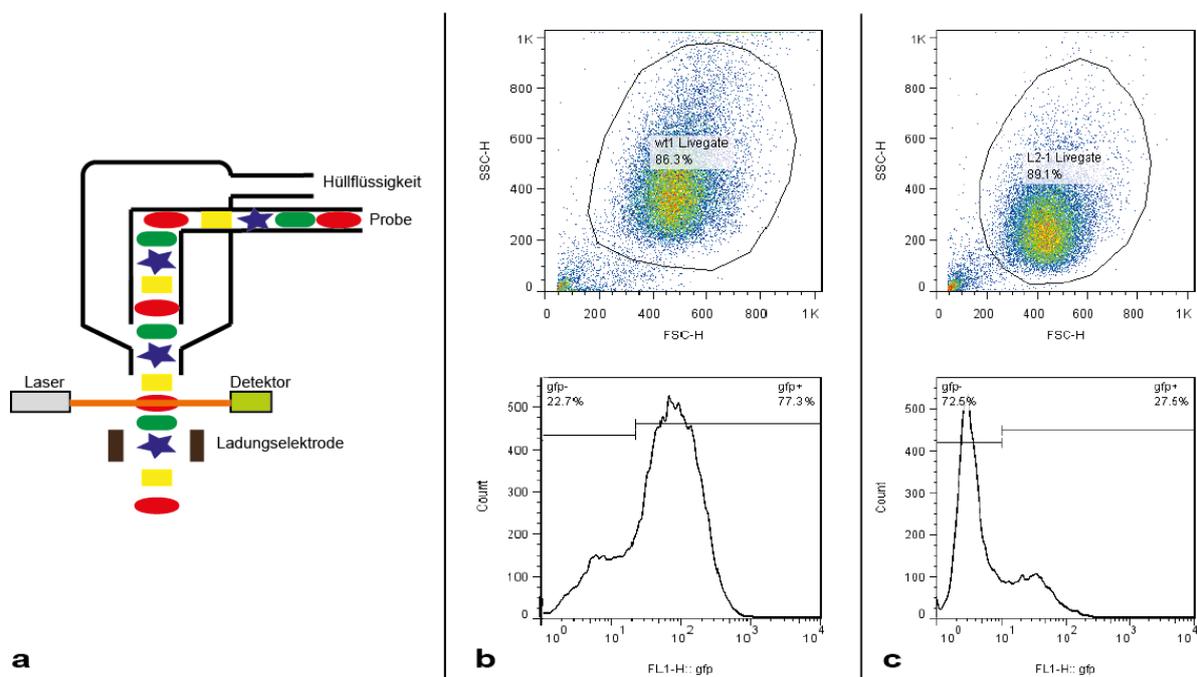
In dieser Arbeit wurde der CTB-Assay zur Vitalitätsbestimmung nach Virusinfektion verwendet. Hierzu werden  $2 \times 10^4$  Zellen in Triplikaten in eine 96-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 Stunden Bebrütung mit dem VSV-WT Virus (MOI = 0,1) infiziert (Abschnitt 3.1.3). Nach weiteren 24 Stunden werden 20  $\mu\text{L}$  des *CellTiter Blue* Reagenzes (Promega Corp., Madison, USA) je Probe hinzugefügt und für 4 Stunden inkubiert. Die Fluoreszenz wurde im Mithras LB940 Fluoreszenzleser (Berthold *Technologies GmbH*, Bad Wildbad, Deutschland) bei  $530_{\text{Ex}} / 585_{\text{Em}}$  nm bestimmt.

### 3.6.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine schnelle und automatisierte Vermessung großer Zellpopulationen auf Einzelzellebene <sup>[133]</sup>. Die Methode wurde am Los Alamos National Laboratory von Dick Sweet <sup>[134]</sup> und Mack Fulwyler entwickelt <sup>[135]</sup> und durch Leonard Herzenberg um die Erkennung von Fluoreszenzsignalen erweitert <sup>[133,136]</sup>. Technisch beruht die Analyse auf einer Einzelzellsuspension in einem laminaren Flüssigkeitsstrom (*Abbildung 10a*) <sup>[97]</sup>. Jede Zelle wird mittels Argon-Laser (488 nm) zur Vermessung bestrahlt. Aufgrund ihrer Größe und zellulärer Beschaffenheit entstehen zwei Streustrahlen: das *forward scatter* (FSC; Vorwärtsstreulicht) entspricht der Ablenkung in kleinem Winkel und korreliert mit der Zellgröße. Das *sideward scatter* (SCC; Seitwärtsstreulicht) entsteht durch Lichtstreuung in größerem Winkel und korreliert mit der Granularität der Zelle <sup>[97]</sup>. Zur

Detektion der Fluoreszenz werden die Zellen mittels weiterer Laser angeregt und das emittierte Licht in verschiedenen Fluoreszenzkanälen analysiert.

In dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur indirekten Virusreplikationsmessung verwendet. Hierzu werden *knockout* Klone mit VSV-WT P-GFP Viren (MOI = 0,1) infiziert. Diese VSV-Variante kodiert für ein P-Protein, das mit einem GFP-Reporter-Protein fusioniert ist und von Virus-infizierten Zellen exprimiert wird. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen gelöst und in FACS tubes in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS suspendiert und anschließend für 5 Minuten mittels UV-Bestrahlung inaktiviert. Hiervon werden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen in der Durchflusszytometrie im FACSCalibur (BD Biosciences, San Jose, USA) auf deren GFP-Fluoreszenz analysiert. Die GFP-Fluoreszenz korreliert mit der Viruslast [137]. Die Daten wurden mit dem Programm „FlowJo 7.6.1“ (FlowJo, LLC.) ausgewertet (Abbildung 10b,c).



**Abbildung 10: Durchflusszytometrie**

a) Die Probe wird in einer Hüllflüssigkeit suspendiert und in einen laminaren Einzelzellstrom versetzt. Jede suspendierte Zelle wird anschließend mit einem Laser bestrahlt, der im Detektor in verschiedenen Dioden analysiert wird (FSC-Diode, SSC-Diode oder Fluoreszenz-Dioden). Mithilfe einer Ladungselektrode können die Einzelzellen anschließend sortiert werden. (Modifiziert nach Gstraunthaler & Lindl [97])

b) Durchflusszytometrische Messung von  $2 \times 10^4$  1205lu Wildtyp Zellen. Zunächst Markierung der vitalen Zellen im Streudiagramm aller Zellen in einem „Livegate“. Anschließend Bestimmung der Fluoreszenz-positiven Zellen innerhalb der Markierung in einem Histogramm

c) Wie in b, bloß exemplarisch für LGP2-KO-Klon 2.

SSC = *sideward scatter* (entspricht Zellgranularität), FSC = *forward scatter* (entspricht Zellgröße), gfp= *green fluorescent protein* (fluoreszierender Farbstoff)

### 3.7 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertungen wurden mit *GraphPad Prism* durchgeführt. Aufgrund der Nichtanwendbarkeit des t-Tests bei fehlender Normalverteilung der Datensätze wurde der *two-tailed* Mann-Whitney-U-Test mit Signifikanzwert  $p < 0,05$  zur statistischen Auswertung eines signifikanten Unterschiedes der Ergebnisse zwischen den durch CRISPR/Cas9 Geneditierung erstellten KO-Klonen und Wildtyp-Zellen verwendet. Alle Ergebnisse einzelner *knockout* Klone wurden mittels frei zugänglicher Software von „GraphPad Software“ auf Ausreißer mit Signifikanzniveau  $p = 0,05$  (zweiseitig) getestet (online: <https://graphpad.com/quickcalcs/Grubbs1.cfm>). Signifikante Ausreißer wurden aus den kumulativen Daten entfernt, um den zu untersuchenden biologischen Effekt nicht zu verzerren. Den Ergebnissen der Zellversuche liegen mindestens 3 unabhängig durchgeführte Replikate (biologische Replikate) jedes Einzelzellklons zugrunde. Um Ungenauigkeiten beim Pipettieren entgegenzuwirken wurde jeder Versuch in Duplikaten oder Triplikaten (technische Replikate) je Kondition jedes Einzelzellklons durchgeführt. Die etablierten Regeln guter wissenschaftlicher Arbeit wurden nach bestem Wissen und Möglichkeiten befolgt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1. Generierung und Validierung von LGP2-defizienten 1205lu Zelllinien durch CRISPR/Cas9 Geneditierung

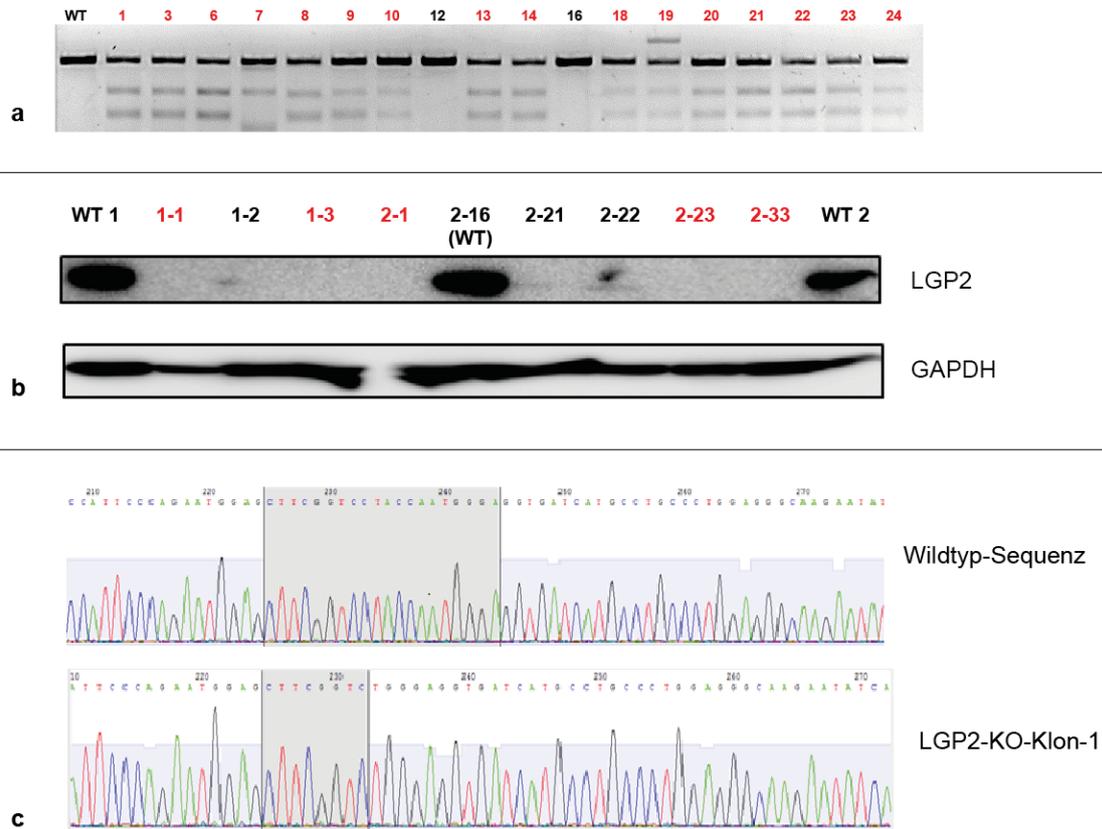
Zur Untersuchung der Rolle von LGP2 in *loss of function*-Experimenten, wurden LGP2-defiziente Zelllinien mittels CRISPR/Cas9 Geneditierung generiert. Hierfür wurde als Ausgangszelllinie die Melanomzelllinie 1205lu verwendet, von der aus Vorexperimenten unserer Arbeitsgruppe die Intaktheit der RLR-Signalwege bekannt war. 1205lu Zellen wurden dafür mit einem Expressionsplasmid transfiziert (DHX58 SIGMA CRISPR Plasmid; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), das für eine unter der Kontrolle eines CMV-Promoter stehende CAS9-2A-GFP Kasette kodiert sowie eine U6-kontrollierte *guideRNA*, mit der Zielsequenz 5'-CTTCGGTCCTACCAAT-GGGAGG-3' im Exon 1 des LGP2 Gens. Die auswachsenden Klone wurden expandiert und mittels eines T7E1 *Vor-screenings* (Abschnitt 3.3.4) auf die Anwesenheit von Mutationen in der Zielsequenz überprüft (*Abbildung 11a*). Im T7E1 *screening* positive Klone wurden anschließend im *westernblot* auf die Expression von LGP überprüft (*Abbildung 11b*). Aus Klonen mit fehlender LGP2-Expression im *westernblot* wurde der Genabschnitt, in dem die *guideRNA*-Zielsequenz liegt, mittels PCR amplifiziert und die Sequenz mittels Sangersequenzierung bestimmt (*Abbildung 11c* und *Tabelle 25*). Von über 90 untersuchten Klonen konnten so drei Klone mit definierter biallelischer Mutation im LGP2 Gen und im *westernblot* fehlender Expression von LGP2 identifiziert werden, die in den folgenden Experimenten eingesetzt und funktionell charakterisiert wurden. Die in den folgenden Experimenten zusätzlich eingesetzten RIG-I-, MDA5- und MAVS-defizienten 1205lu Zelllinien wurden auf ähnliche Weise von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe hergestellt und freundlicherweise von V. Bothe und S. Willms zur Verfügung gestellt.

Zur Sicherung der Zelllinienidentität wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin der LMU München eine STR-Analyse durchgeführt. Alle getesteten LGP2-, RIG-I-, MDA5- und MAVS-defizienten Klone waren eindeutig 1205lu-Zellen.

LGP2-defizienter Klon	Mutation
1 (entsprechend Klon 1-3)	Deletion 7 Basen 5'-CTACCAA-3' in beiden Allelen
2 (entsprechend Klon 2-1)	Allel 1: Deletion 4 Basen: 5'-CCAA-3' Allel 2: Transition G – A, anschließend 2 Basen normal, dann Deletion 2 Basen GG
3 (entsprechend Klon 2-23)	Allel 1: Deletion 4 Basen 5'-CCAA-3' Allel 2: Insertion „T“

**Tabelle 25: Mutationsanalyse der LGP2-defizienten Klone.**

Durch Sangersequenzierung der *guideRNA*-Zielsequenz der KO-Klone erhaltene Mutationen.



### Abbildung 11: Generierung und Validierung von LGP2-defizienten 1205lu Zelllinien durch CRISPR/Cas9 Geneditierung

Die Generierung der LGP2-defizienten 1205lu Zelllinien erfolgte durch die CRISPR/Cas9 Geneditierung mit Zielsequenz 5'-CTTCGGTCTACCAATGGGAGG-3' (DHX58 Gen, Chr. 17q.21.2, Exon 1, Nukleotidposition 163-184) der *guideRNA*. Hierzu wurden  $5 \times 10^5$  1205lu Zellen in einer 6-well-Mikrotiterplatte mit einem Expressionsplasmid mit CMV-Promotor gesteuerter CAS9-2A-GFP Kasette und U6 gesteuerter *guideRNA* im Verhältnis 3  $\mu$ g DNA/ 9  $\mu$ l TransIT Transfektionsreagenz transfiziert. Nach 24 h wurden GFP-positive Zellen durchflusszytometrisch sortiert und Einzelzellklone mittels Grenzverdünnungsklonen durch Aussäen von 0,5 GFP-positiver Zellen in jedes well einer 96-well-Mikrotiterplatte gezüchtet. Anwachsende Zellklone wurden durch schrittweises Übersäen in 24-well- und 6-well-Mikrotiterplatten expandiert.

a) T7E1 Vor-screening: Genomische DNA wurde mit QuickExtract™ DNA extraction solution extrahiert. Die *guideRNA*-Zielsequenz wurde durch PCR amplifiziert und anschließend einem T7-Endonuklease-1-Verdau unterzogen. Hierzu wurden Zielsequenz-PCR-Amplifikate der potentiellen *knockout* Klone equimolar mit Zielsequenz-PCR-Amplifikaten von Wildtyp (WT) 1205lu mit 5 Einheiten T7E1 für 1 h inkubiert und im Agarosegel visualisiert. Rot markierte Zellklone wurden durch Vorhandensein von drei T7E1-Verdau-Produkten im Sinne einer fehlerhaften Basenpaarung zwischen *knockout* Klon und WT-Zelllinie als T7E1-positiv gewertet.

b) LGP2-Expressionscreening:  $5 \times 10^5$  Zellen je Klon wurden in einer 6-well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h durch Transfektion mit HMW poly(I:C) (50 ng/mL) und 1  $\mu$ l Lipofectamine® RNAiMAX Transfektionsreagenz über 24 h stimuliert und anschließend mit RIPA-Lyse-Puffer lysiert. Zelllysate wurden anschließend mithilfe des Lämmli-Puffers denaturiert und mittels *westernblot* auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem Anti-LGP2-Antikörper analysiert. Als Ladekontrolle diente ein Anti-GAPDH-Antikörper. Rot markierte Klone zeigen keine LGP2-Proteinexpression im *westernblot*.

c) Sangersequenzierung der Zielsequenz: *guideRNA*-Zielsequenzen aus im *westernblot* LGP2 negativen Klonen erfolgte wie unter a) beschrieben. Das PCR-Amplifikat wurde nach Agarosegelelektrophorese mittels Skalpells isoliert. Anschließend wurde das PCR-Amplifikat mithilfe des *peqGOLD gel extraction kits* aus dem Agarosegelisolat gelöst. Die Sangersequenzierung erfolgte durch *Eurofins Genomics* nach Herstellerangaben. LGP2-defiziente Zellklone wurden durch Vorhandensein biallelscher *frameshift* Mutationen in der *guideRNA*-Zielsequenz im Vergleich zur Wildtypsequenz, sowie fehlender LGP2-Expression im *westernblot* identifiziert.

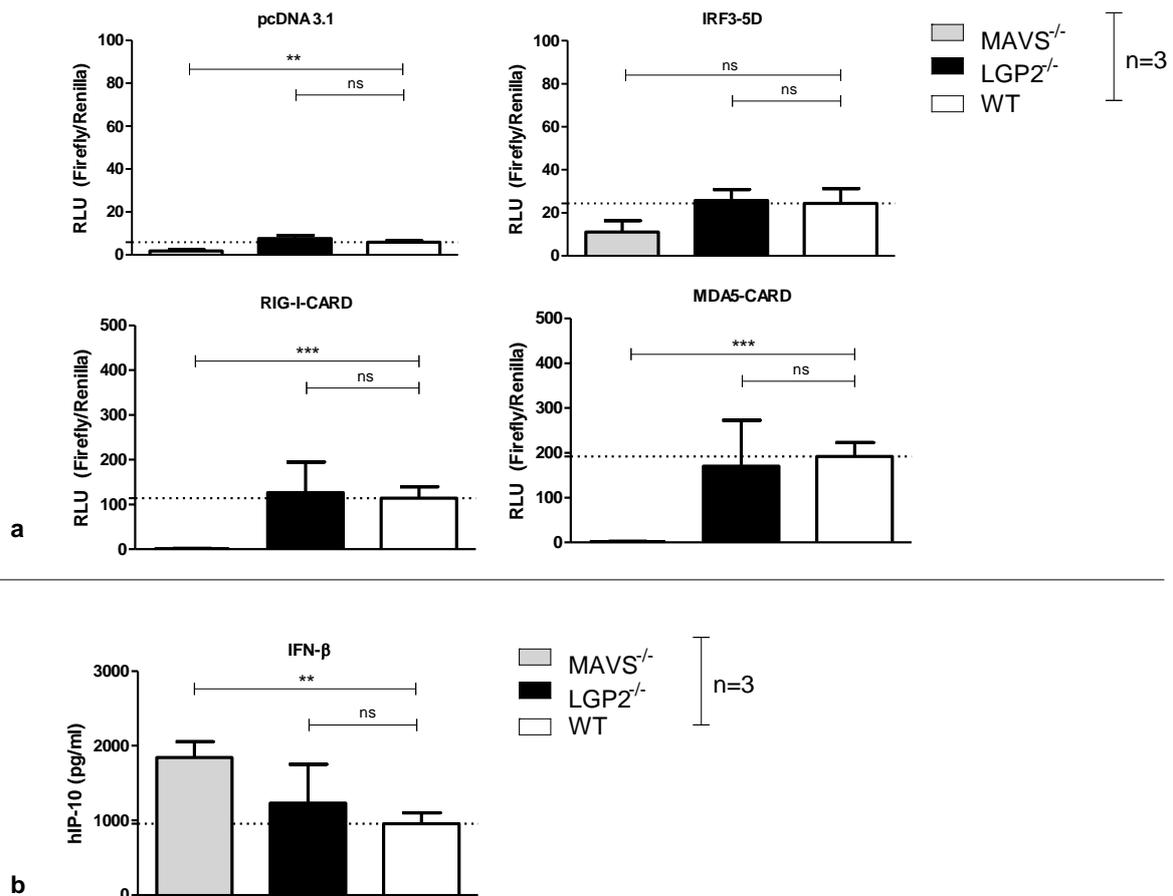
## 4.2. LGP2 beeinflusst die RLR-Signalwege oberhalb oder auf Höhe von RIG-I und MDA5 aber nicht in nachgeschalteten Teilen des RLR-Signalwegs

Zur Klärung auf welcher Höhe LGP2 einen Einfluss auf die RLR-Signalwege nimmt wurden die LGP2-defizienten Zellklone zunächst mit Stimulationsplasmiden auf unterschiedlicher Ebene des RLR-Signalwegs stimuliert und anschließend die Interferon- $\beta$ -Antwort mittels IFN- $\beta$ -Reporter-assay (Abschnitt 3.4.6) gemessen. Die stimulatorische Wirkung der CARD-Domänen von RIG-I und MDA5 und deren Aktivierung eines gemeinsamen Signalwegs wurden von Yoneyama et al. etabliert <sup>[44]</sup>. Bei RLR-spezifischer Stimulation repräsentieren die MAVS-defizienten Klone, aufgrund des fehlenden Adaptermoleküls für RIG-I- und MDA5-CARD, eine Negativkontrolle.

Die Ergebnisse in *Abbildung 12a* zeigten keine Unterschiede in der IFN- $\beta$ -Promotoraktivität nach RLR-Stimulation durch RIG-I- oder MDA5-CARD-Domänen in LGP2-defizienten Klonen (RIG-I-CARD: 126,5 RLU, MDA5-CARD: 170,3 RLU) im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (RIG-I-CARD: 113,8 RLU, MDA5-CARD: 192,3 RLU). Erwartungsgemäß weisen die MAVS-defizienten Klone keine IFN- $\beta$ -Aktivität auf. Der RLR-Signalweg der LGP2-defizienten Klone wurde zusätzlich durch Stimulation mit konstitutiv aktivem Transkriptionsfaktor IRF3 (IRF3-5D) getestet, welches in der Signalkaskade dem Adaptermolekül MAVS nachgeschaltet liegt (*Abbildung 5*). Die Stimulation mit IRF3-5D zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen den LGP2-defizienten Klonen und den Wildtyp-Zellen (WT: 24,4 RLU, LGP2<sup>-/-</sup>: 25,8 RLU). Die reduzierte IFN- $\beta$ -Promotoraktivität der MAVS-defizienten Klone ist analog zur geringfügig gesteigerten Aktivität der LGP2-defizienten Klone und Wildtyp-Zellen nach Transfektion mit dem Leervektor zu sehen.

Des Weiteren wurden die Zellklone mit Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) stimuliert, wobei die Immunreaktion durch einen hIP-10-ELISA im Zellüberstand gemessen wurde. Humanes IP-10 (interferon-*induced protein-10*; CXCL10-Gen) wird als ISG durch Typ-I- und Typ-II-Interferone gebildet <sup>[138]</sup>. Die Stimulation mit IFN- $\beta$  dient zur Überprüfung eines LGP2-Effektes auf die positive *feedback* Schleife von Interferon. Die in *Abbildung 12b* dargestellten Ergebnisse belegen, dass die LGP2-defizienten Klone auch nach direkter Stimulation mit IFN- $\beta$  keine signifikant unterschiedliche Reaktion zu Wildtypzellen zeigen (LGP2<sup>-/-</sup>: 1234,0 pg/ml, WT: 957,0 pg/ml). Das Interferon- $\beta$  wurde analog einer Virusinfektion direkt in Opti-MEM gelöst in das Zellkulturmedium der ausplattierten Zellen gegeben (Abschnitt 3.1.3).

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf einen Einfluss von LGP2 auf Höhe oder oberhalb von RIG-I und MDA5 hin, aber nicht in den nachgeschalteten Teilen des RLR-Signalweges oder der positiven *feedback* Schleife von IFN- $\beta$ .



### Abbildung 12: LGP2 beeinflusst die RLR-Signalwege auf Höhe oder oberhalb von RIG-I und MDA5

a) Interferon- $\beta$ -Reporter assay: Je Zellklon wurden  $2 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit je 50 ng IFN- $\beta$ -Promotor-Luciferase Plasmid (p125-*firefly*-luciferase), 50 ng Renilla Luciferase (pRL-TK-Renilla, HSV-TK-Promotor gesteuert) und 50 ng eines Stimulationsplasmids (pcDNA 3.1 Leervektor, RIG-I-CARD, MDA5-CARD oder konstitutiv aktives IRF3-5D; CMV-Promotor gesteuert) mit 0,45  $\mu$ l GeneJuice® Transfektionsreagenz transfiziert. Zelllyse erfolgte nach weiteren 24 h Inkubation mit *passive lysis buffer*. IFN- $\beta$ -Promotoraktivität wird als *relative luminescence unit* (RLU)-Quotient aus Firefly/Renilla-Luciferaseaktivität nach Hinzugabe von 20  $\mu$ l *firefly*- oder Renilla-Substrat zu jeweils 20  $\mu$ l Zelllysate durch Messung der Chemilumineszenz bestimmt.

b) Interferon- $\beta$ -Stimulation: Je Zellklon wurden  $6 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 24-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit IFN- $\beta$ 1a (5000 U/ml) ohne Transfektion stimuliert. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die kumulative hIP-10-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen.

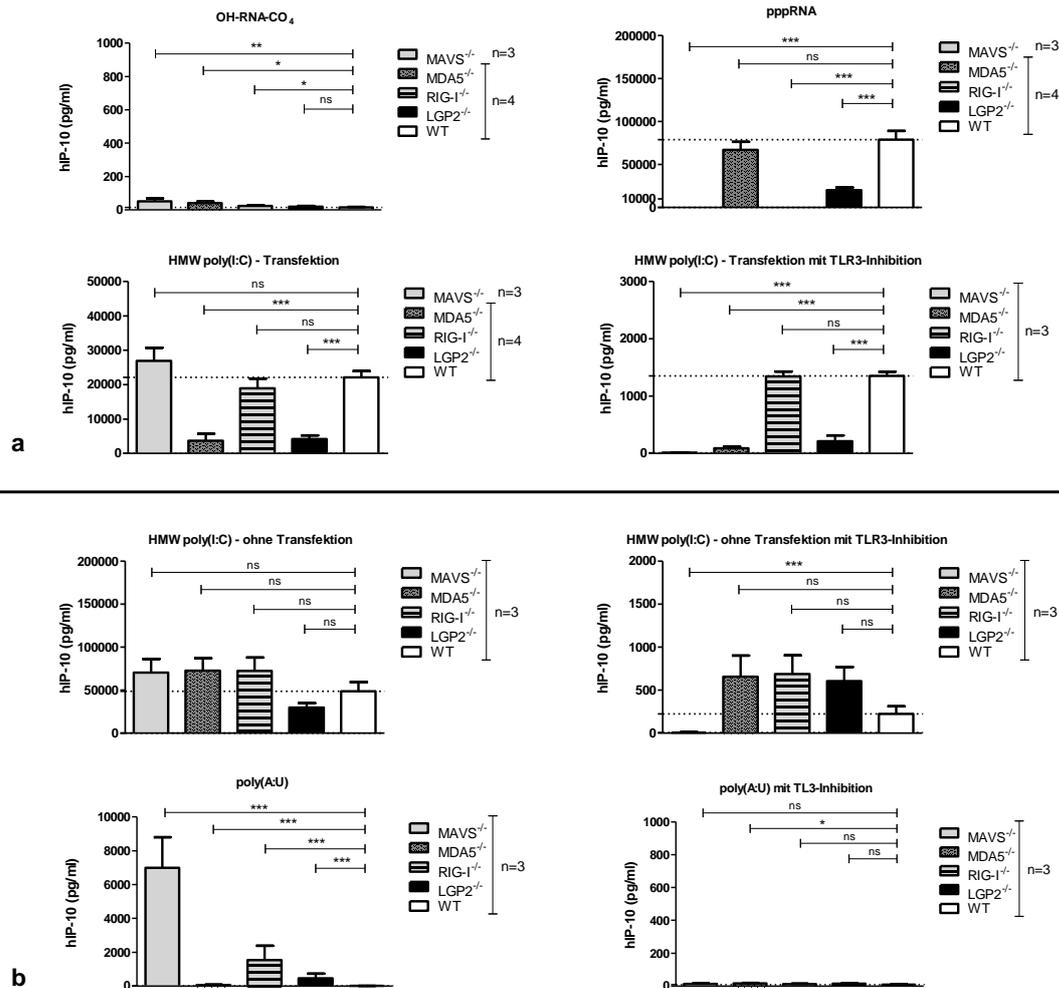
Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei, für MAVS<sup>-/-</sup> zwei, unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , ns (nicht signifikant)  $p > 0.05$ .

### 4.3. LGP2-Defizienz führt zu einer stark verminderten Immunaktivität nach Stimulation mit synthetischen RLR-Liganden

Nachdem gezeigt wurde, dass LGP2 die RLR-Signalwege auf Höhe oder oberhalb von RIG-I und MDA5 beeinflusst, wurden funktionelle Stimulationsversuche mit synthetischen RLR-Liganden durchgeführt. Durch parallele Testung der RIG-I-, MDA5- und MAVS-defizienten Klone konnte eine Spezifität der verwendeten Liganden für RIG-I oder MDA5 und somit die Auswirkung der LGP2-Defizienz deren Signalwege untersucht werden. Bei Fehlen des spezifischen Rezeptors ist in den entsprechenden *knockout* Klonen keine Immunantwort zu erwarten, während die anderen Zellklone Wildtyp-ähnliche Immunaktivitäten aufweisen sollten. Die RIG-I- und MDA5-defizienten Klone repräsentieren daher je nach Ligand eine Negativ- oder Positivkontrolle.

Zunächst wurden die Zellklone mit dem etablierten RIG-I-spezifischen-Liganden Triphosphat-RNA (pppRNA) stimuliert <sup>[57]</sup> (*Abbildung 13a*). Als Negativkontrolle wurde eine RNA ohne 5'-Triphosphatmodifikation eingesetzt (OH-RNA-CO4). Die verwendete pppRNA verfügt durch komplementäre Sequenzen über eine *hairpin loop* (Haarnadelschleife) mit Bildung einer doppelsträngigen Region. Aufgrund fehlender Rezeptoren beziehungsweise Adaptermolekülen weisen die RIG-I- und MAVS-defizienten Klone erwartungsgemäß eine nahezu fehlende Immunaktivität nach Stimulation mit pppRNA auf. Die MDA5-defizienten Klone mit intaktem RIG-I-Signalweg zeigten hier erwartungsgemäß eine normale Immunaktivität. Die LGP2-defizienten Klone zeigten jedoch eine verminderte hIP-10-Expression von 25,4 % der Wildtyp-Zellen (LGP2<sup>-/-</sup>: 20067,4 pg/ml, WT: 79123,8 pg/ml), was auf einen positiven, aber nicht essenziellen Einfluss von LGP2 bei Stimulation des RIG-I Signalweges hinweist.

Dieser Effekt ließ sich auch nach Transfektion mit poly(I:C) reproduzieren. Poly(I:C) kann als hochmolekulare dsRNA (HMW; 1,5 – 8,0 kB) oder niedermolekulare dsRNA (LMW; 0,2 – 1,0 kB) erworben werden. Transfiziertes HMW poly(I:C) aktiviert in niedriger Dosis hauptsächlich MDA5, aber in größerer Dosis oder als LMW ist poly(I:C) ebenfalls ein Ligand für RIG-I <sup>[59,94]</sup>, womit er als ein promiskuöser RLR-Ligand wirkt. Des Weiteren ist poly(I:C) ein Ligand für endosomal membrangebundenes TLR3. Nach Transfektion von HMW poly(I:C) zeigten die MDA5-defizienten Klone erwartungsgemäß eine stark verminderte hIP-10-Expression, während die RIG-I-KO-Klone eine nahezu unveränderte Immunaktivität aufwiesen (*Abbildung 13a*). Die LGP2-defizienten Klone wiesen ebenfalls eine deutlich verminderte hIP-10-Expression auf (LGP2<sup>-/-</sup>: 4192,0 pg/ml, WT: 22155,7 pg/ml). Die Aktivierung von TLR3 erklärt die Immunaktivität der MAVS-defizienten Klone, die ähnliche hIP-10 Konzentrationen wie die Wildtyp-Zellen aufwiesen. Um diesen vermuteten TLR3-Effekt zu unterdrücken wurde der Versuch mit einer TLR3-Inhibition durch Chloroquin wiederholt (*Abbildung 13a*). Hierzu wurden die Zellen zwei Stunden vor Transfektion in 50 µM Chloroquin-haltigem Zellmedium inkubiert. Hierdurch war eine MDA5-abhängige RLR-Aktivierung mit verringerter hIP-10-Expression der MAVS- und MDA5-defizienten Klone, bei intakter Aktivierung der RIG-I-defizienten Klone hervorzurufen. Die LGP2-defizienten Klone zeigten hier abermals eine reduzierte hIP-10-Expression (LGP2<sup>-/-</sup>: 211,1 pg/ml, Wildtyp hier 1353,3 pg/ml), was auf eine nicht essenzielle Rolle von LGP2 auf den MDA5-Signalweg hindeutet.



### Abbildung 13: LGP2-Defizienz führt zu verminderter Immunaktivität nach Stimulation mit synthetischen RLR-Liganden

a) Für jeden Zellklon wurden  $6 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 24-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit OH-RNA-CO<sub>4</sub> (200 ng/ml, nicht-immunogene 5'-OH-Kontroll-RNA), pppRNA (150 ng/ml; 5'-Triphosphat-RNA mit ds-Region durch *hairpin loop*, hergestellt durch *in vitro* Transkription) oder HMW poly(I:C) (1,5 ng/ml) mithilfe von 0,9  $\mu$ l Lipofectamine<sup>®</sup>RNAiMAX Transfektionsreagenz über 24 h stimuliert. Zur TLR3-Inhibition mit Chloroquin wurde das Zellmedium 2 h vor Stimulation gewechselt und mit 50  $\mu$ M Chloroquin versetzt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die kumulative hIP-10-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen.

b) wie a) aber poly(A:U) (5000 ng/ml) oder HMW poly(I:C) (5000 ng/ml) wurden ohne Transfektion direkt in das Zellmedium hinzugefügt und ebenfalls über 24 h inkubiert.

Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei, für MAVS<sup>-/-</sup> zwei, unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 3$  oder 4 unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , ns (nicht signifikant)  $p > 0.05$ .

Zur weiteren Untersuchung der TLR3-Aktivität nach vermeintlicher RLR-Stimulation der Zelllinien wurden die Zellklone mit HMW poly(I:C) ohne Transfektionsreagenz in größerer Konzentration (5000 ng/ml), sowie mit dem TLR3-dsRNA-Ligand poly(A:U) stimuliert (Abbildung 13b). Nach Stimulation mit HMW poly(I:C) zeigte sich eine vermeintlich RLR-unabhängige Stimulation, bei annähernd gleicher hIP-10-Expression der LGP2-defizienten Zellklone und der

Wildtyp-Zellen (LGP2<sup>-/-</sup>: 29777,4 pg/ml, WT:48572,7 pg/ml). Der vermutete TLR3-Effekt ließ sich allerdings durch vorherige TLR3-Inhibition durch Chloroquin nicht vollständig aufheben. Trotz stark reduzierter hIP-10-Induktion wiesen die Zellklone unter TLR3-Inhibition erhöhte Immunaktivitäten auf. Lediglich die Immunaktivität der MAVS-defizienten Klone wurde durch TLR3-Inhibition unterdrückt, was als promiskuöse Wirkung von HMW poly(I:C) auf MDA5 und RIG-I gewertet wurde. Diese Schlussfolgerung wird durch Stimulationsversuche mit poly(A:U), ebenfalls ohne Transfektionsreagenz, unterstützt (*Abbildung 13b*). Die Ergebnisse legen nahe, dass die TLR3-Aktivität in den *knockout* Zellklonen stärker als in den Wildtyp-Zellen ist, vermutlich aufgrund klonaler Varianz außerhalb der CRISPR/Cas9-Zielregion. Die LGP2-defizienten Klone zeigen hier eine 25-fach höhere hIP-10-Expression als die Wildtyp-Zellen (LGP2<sup>-/-</sup>: 459,9 pg/ml, WT: 18,34 pg/ml). Dieser Effekt lässt sich nahezu vollständig in allen Zellklonen durch die Vorinkubation mit Chloroquin unterdrücken (LGP2<sup>-/-</sup>: 15,61 pg/ml, WT: 9,1 pg/ml), was eine spezifische TLR3-Aktivierung durch nicht-transfizierte poly(A:U)-Stimulation nahelegt.

Die etwas erhöhte Immunaktivität der *knockout* Klone in der Kontroll-Transfektion mit der OH-RNA-CO<sub>4</sub> (*Abbildung 13a*) war zumindest für die LGP2-defizienten Klone nicht signifikant. Ein versuchter Einsatz von 2'-3'-cGAMP in Stimulationsversuchen als RLR-unabhängiger, zytosolischer Immunstimulator erwies sich als nicht zielführend. 2'-3'-cGAMP ist ein Ligand für STING und spielt eine zentrale Rolle als *second-messenger* des cGAS-STING Signalwegs, welcher eine bedeutende Rolle in der zytosolischen Erkennung von Fremd-DNA darstellt und über NF-κB und IRF3 die Produktion von Typ-I-Interferonen auslöst <sup>[139-141]</sup>. Darüber hinaus ist bekannt, dass STING auch direkt über zyklische Dinukleotide, die während einer bakteriellen Infektion entstehen, eine Immunreaktion auslösen kann <sup>[141]</sup>. Leider verliefen die Stimulationsversuche mit 2'-3'-cGAMP erfolglos und es konnte keine Immunaktivität in *knockout*- oder Wildtyp-Zellen gemessen werden. *Screening*-Ergebnisse von Christine Heuer (Medizinische Doktorandin, Arbeitsgruppe Rothenfußer, Abteilung für Klinische Pharmakologie, LMU München) zeigten, dass die cGAS-STING-Signalkaskade in den 1205lu-Zellen nicht exprimiert wird. Alternative Kontrollen wurden nicht weiter untersucht.

Zusammenfassend weisen die Stimulationversuche mit synthetischen RLR-Liganden auf eine Bedeutung von LGP2 als positiver Regulator sowohl im RIG-I-Signalweg, als auch im MDA5-Signalweg hin.

#### 4.4. LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Sendai Virus, VSV und Mengovirus

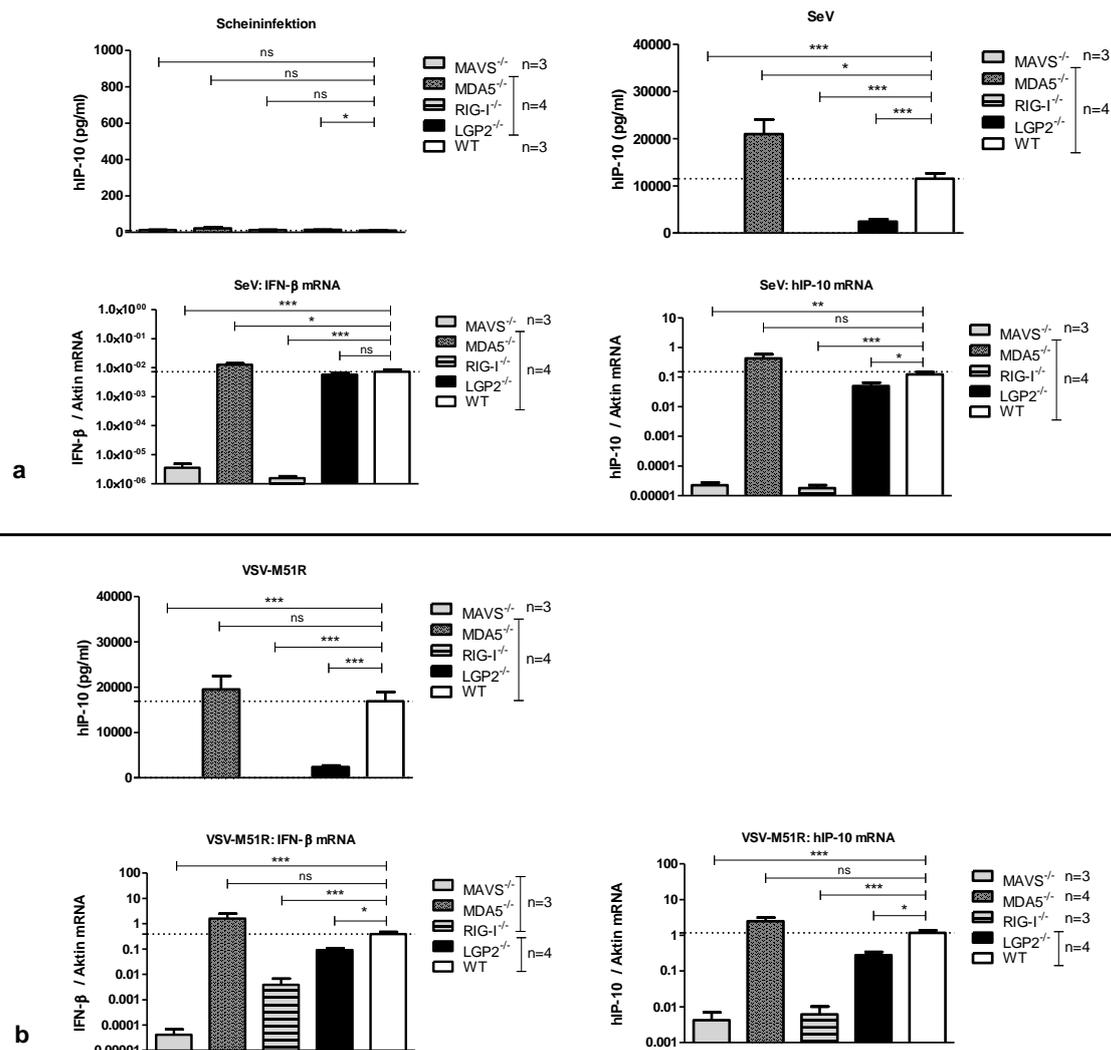
Aufgrund der physiologischen antiviralen Funktion der RLR wurden die *knockout* Zellklone mit Viren infiziert und die anschließende Immunaktivität gemessen, um den Einfluss von LGP2 auf die antivirale Funktion von RIG-I und MDA5 zu untersuchen. Hierfür wurden Infektionsexperimente mit drei RNA-Viren durchgeführt: Sendai Virus (SeV, *Abbildung 14a*), Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV, *Abbildung 14b*) und Mengovirus (Mengo, *Abbildung 15*). Als Kontrolle wurde eine Scheininfektion mit Opti-MEM Kulturmedium verwendet (*Abbildung 14a*).

Die Infektionsdosis kann bei Sendai Virus (SeV, Familie: *Paramyxoviridae*) aufgrund fehlender zytotoxischer Eigenschaften des Virus nicht anhand einer MOI angegeben werden, sondern wird nach Herstellerangaben in Einheiten/ml (U/ml) gemessen (Abschnitt 3.6.1). SeV löst eine RIG-I abhängige Immunreaktion aus <sup>[142]</sup>, was anhand der spärlichen hIP-10-Sekretion der RIG-I- und MAVS-defizienten Klone nach 24 Stunden, bei starker Immunaktivität der MDA5-defizienten Klone mit intaktem RIG-I-Rezeptor, widerspiegelt wird. SeV produziert als Paramyxovirus ein V-Protein, das die ATP-Hydrolyse von MDA5 inhibiert und die antivirale Funktion teilweise unterdrückt <sup>[72,143]</sup>. Die LGP2-defizienten Klone zeigten hier eine signifikant verminderte hIP-10-Sekretion (LGP2<sup>-/-</sup>: 2426,3 pg/ml, WT:11507,4 pg/ml).

Zur Klärung, ob sich der Einfluss von LGP2 auch auf die mRNA-Expression von Interferon- $\beta$  und Interferon-induzierten Genen (hier hIP-10) zeigt, wurden RT-qPCR-Untersuchungen (Abschnitt 3.5.1) aus extrahierter RNA ebenfalls 24 Stunden nach einer Virusinfektion analysiert und auf die Aktin-mRNA-Expression normiert (*Abbildung 14*; logarithmische Skala beachten). Diese Untersuchung spiegelt die vorhandene mRNA-Expression zum Zeitpunkt der RNA-Extraktion wider und ergänzt somit die Bestimmung der kumulativen hIP-10 Konzentration im Zellüberstand nach 24 Stunden. Die hIP-10-mRNA Expression entsprach weitestgehend der gemessenen hIP-10-Expression im ELISA (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,0503904 hIP-10/Aktin, WT: 0,123948 hIP-10/Aktin). Die Expression der Interferon- $\beta$ -mRNA zeigte übereinstimmende Ergebnisse mit der hIP-10-Expression für die RIG-I-, MDA5- und MAVS-defizienten Klone. Die LGP2-defizienten Klone wiesen jedoch bei dieser Analyse keine signifikante Reduktion der IFN- $\beta$ -mRNA-Expression auf (LGP2-KO: 0,00576833 IFN- $\beta$ /Aktin; WT: 0,00729667 IFN- $\beta$ /Aktin).

Zur Bestätigung der verminderten Immunreaktion der LGP2-defizienten Klone nach SeV-Infektion wurden die Zellklone mit dem Vesicular stomatitis Virus (VSV, Familie: *Rhabdoviridae*, MOI=0,1) infiziert, welches ebenfalls eine RIG-I-abhängige Immunreaktion auslöst <sup>[142]</sup>. Aufgrund der Unterdrückung einer Interferonproduktion durch das VSV Matrix (M)-Protein <sup>[144,145]</sup> wurde hier eine M-Protein-Mutante des Virus verwendet (VSV-M51R; Met->Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins und GFP-Expression), die nicht in der Lage ist die Interferonproduktion zu hemmen. Zunächst wurde die hIP-10-Expression im Zellüberstand 24 Stunden nach VSV-M51R-Infektion (MOI=0,1) gemessen (*Abbildung 14b*). Analog der SeV-Infektion zeigte die Infektion mit dem VSV-M51R einen RIG-I-spezifischen Phänotyp: die RIG-I- und MAVS-defizienten Klone zeigten eine spärliche Immunaktivität, während die MDA5-defizienten Klone eine Wildtyp-ähnliche Immunantwort aufwiesen. Auch die LGP2-defizienten Klone zeigten nach der VSV-M51R-Infektion eine verminderte hIP-10-Expression (LGP2<sup>-/-</sup>: 2365,79 pg/ml, WT: 16835,4 pg/ml). Dies war ebenfalls auf der mRNA-Expressionsebene von hIP-10 (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,281342 hIP-10/Aktin, WT: 1,18468 hIP-10/Aktin) und Interferon- $\beta$  (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,0923583 IFN- $\beta$ /Aktin, WT: 0,386392 IFN- $\beta$ /Aktin) nachweisbar (*Abbildung 14b*, logarithmische Skala beachten).

Zusammenfassend zeigten die SEV- und VSV-M51R-Infektionsversuche eine verminderte Immunaktivität der LGP2-defizienten Klone. In Zusammenschau mit den Stimulationsversuchen mit synthetischen RLR-Liganden in *Abbildung 13* zeigt sich eine positive, jedoch nicht essenzielle, Rolle von LGP2 im RIG-I Signalweg. Die spezifische RIG-I-Aktivierung ließ sich durch die verwendeten Kontrollen (RIG-I-, MDA5- und MAVS-defiziente Klone) validieren.



**Abbildung 14: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Viren die durch RIG-I detektiert werden**

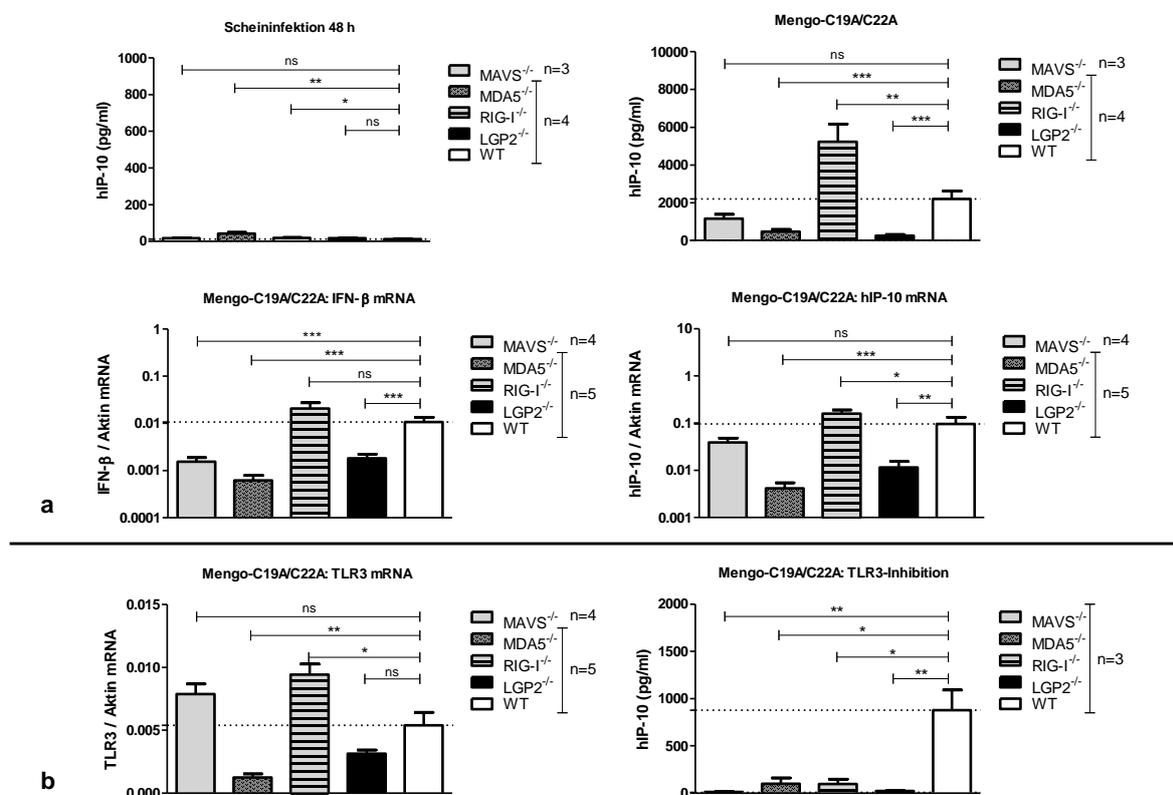
a) Für jeden Zellklon wurden 6x10<sup>4</sup> Zellen je well einer 24-well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit Sendai Virus infiziert (SeV; 8 U/ml) oder 50 µl virusfreiem Opti-MEM Kulturmedium behandelt (Scheininfektion). Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die kumulative hIP-10-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die mRNA-Expressionsanalyse erfolgte nach RNA-Isolation aus virusinfizierten Zellen mittels RT-qPCR mit entsprechenden Primern für IFN-β, hIP-10 oder β-Aktin und *universal probe library* Sonden. Die IFN-β- und hIP-10-mRNA-Expressionen wurden jeweils auf die Aktin-mRNA-Expression normiert.

b) Wie in a) bloß mit Infektion durch die Vesicular stomatitis Virus-Mutante VSV-M51R (MOI=0,1; Met->Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins zerstört dessen Interferon-inhibierende Funktion).

Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei, für MAVS<sup>-/-</sup> zwei, unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte +- SEM von n= 3 oder 4 unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001, ns (nicht signifikant) p > 0,05.

Zur Untersuchung, ob sich ein ähnlicher Einfluss von LGP2 auf die antivirale Aktivität von MDA5 zeigt, wurden die Zellklone mit Mengovirus infiziert. Das Mengovirus gehört zur Familie der *Picornaviridae* und zur Spezies der Encephalomyocarditis Viren (EMCV). Basierend auf Mausmodellen wurde Mengovirus als MDA5-abhängiges Virus charakterisiert <sup>[146]</sup>. Venkataraman et al. <sup>[87]</sup> und Satoh et al. <sup>[84]</sup> konnten eine Verminderung der Immunantwort nach Infektion mit EMCV oder Mengovirus bei LGP2-defizienten Mäusen nachweisen. Analog zu VSV wurde für Mengovirus-Infektionen eine Mutante des Wildtypvirus verwendet, dessen mutiertes *leader*-(L)-Protein eine messbare Interferonproduktion zulässt (Mutation: C19A/C22A) <sup>[147,148]</sup>. Um eine ausreichend starke Interferon-Induktion zu erreichen, wurden die Zellklone mit einer MOI=50 für 48 Stunden infiziert (Vergleich: 24 Stunden für SeV, VSV). Aufgrund der verlängerten Inkubationszeit erfolgte für das Mengovirus ebenfalls eine Scheininfektion mit Opti-MEM Kulturmedium für 48 Stunden. Die hIP-10-Expression nach Mengovirus Infektion ergab zunächst ein Bild einer MDA5-abhängige Immunreaktion: die MDA5-defizienten Klone zeigten eine stark reduzierte Immunantwort, während die RIG-I-defizienten Klone eine starke Immunantwort aufwiesen. Die LGP2-defizienten Klone wiesen nach Mengovirus-Infektion eine stark verminderten hIP-10-Expression auf (LGP2<sup>-/-</sup>: 247,5 pg/ml, WT: 2197,7 pg/ml), ähnlich der HMW poly(I:C)-Stimulationsversuche (*Abbildung 13*). Dieses Ergebnis ließ sich auch durch Messung der hIP-10-mRNA durch RT-qPCR bestätigen. *Abbildung 15a* zeigt eine verminderte hIP-10-mRNA Expression der LGP2-defizienten Klone (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,0116167 hIP-10/Aktin, WT: 0,0964007 hIP-10/Aktin). Auch die Interferon- $\beta$ -mRNA-Expression war in LGP2-defizienten Klonen signifikant reduziert (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,00183071 IFN- $\beta$ /Aktin, WT: 0,010678 IFN- $\beta$ /Aktin). Trotz der konsistenten Verminderung der Interferon und Interferon-induzierten Gene in LGP2-defizienten Zellen durch das Mengovirus blieb der Zweifel, ob das Mengovirus auch eine TLR3-abhängige Immunantwort auslöst und somit TLR3 als *confounder* den vermeintlichen LGP2-Effekt ausübt. Die Vermutung beruhte auf den Ergebnissen der MAVS-defizienten Klone, die nur gering reduzierte Immunaktivitäten nach Mengo-C19A/C22A-Infektion aufwiesen. Hierzu wurde die TLR3-mRNA-Expression der Zellklone nach Mengovirusinfektion mittels RT-qPCR gemessen (*Abbildung 15b*), welche eine ähnliche TLR3-Expression wie IFN- $\beta$ - und hIP-10-mRNA-Expressionen aufwies. Deshalb wurden die Mengovirus-Infektionsversuche mit einer TLR3-Inhibition durch Chloroquin wiederholt. Die Ergebnisse in *Abbildung 15b* zeigten eine verminderte hIP-10-Expression aller durch CRISPR/Cas9 Geneditierung erstellten Zellklone im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen. Die LGP2-defizienten Klone zeigten eine hIP-10-Expression von nur 2,8 % der Wildtypen-Zellen (LGP2<sup>-/-</sup>: 24,4 pg/ml, WT: 877.0 pg/ml, Vergleich: 11,3 % ohne TLR3-Inhibition). Besonders auffällig war die stark verminderte Immunantwort der RIG-I-defizienten Klone nach TLR3-Inhibition.

Zusammenfassend lässt sich aus diesen Ergebnissen ableiten, dass es sich bei den hier verwendeten Mengovirus-Infektionsversuchen nicht um einen reinen MDA5-abhängigen Viruseffekt handelt, sondern auch eine RIG-I-abhängige antivirale Immunaktivität nachweisbar war. Dieser Effekt wurde jedoch von der TLR3-Aktivität zunächst verschleiert. Unabhängig dieser TLR3-Interferenz und RLR-Spezifität des Mengovirus zeigen diese Ergebnisse einen einheitlichen LGP2-Phänotyp: die Immunantwort nach Mengovirusinfektion ist bei LGP2-Defizienz deutlich reduziert. Insgesamt zeigen die SeV, VSV und Mengovirus Infektionsexperimente, dass die LGP2-Defizienz nach Infektion mit Viren, die von RIG-I und/oder MDA-5 erkannt werden, zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen führt.



**Abbildung 15: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Viren die durch MDA5 detektiert werden sollen**

a) Für jeden Zellklon wurden  $6 \times 10^4$  Zellen je well einer 24-well-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit MOI=50 der Mengovirus-Mutante (C19A/C22A-Mutation im *leader*-(L)-Gen zerstört die Fähigkeit des *leader* Proteins die Expression von IFN- $\alpha/\beta$  zu inhibieren) infiziert oder mit 50  $\mu$ l virusfreiem Opti-MEM Kulturmedium behandelt (Scheininfektion). Nach weiteren 48 h Inkubation wurde die kumulative hIP-10-Konzentration im Zellüberstand mittels ELISA gemessen. Die mRNA-Expressionsanalyse erfolgte nach RNA-Isolation aus virusinfizierten Zellen mittels RT-qPCR mit entsprechenden Primern für IFN- $\beta$ , hIP-10 oder  $\beta$ -Aktin und *universal probe library* Sonden. Die IFN- $\beta$ - und hIP-10-mRNA-Expressionen wurden jeweils auf die Aktin-mRNA-Expression normiert.

b) RT-qPCR wie in a) allerdings Messung der TLR3-mRNA-Expression mit Primern für TLR3. Zusätzlich für TLR3-Inhibition Mengo-C19A/C22A-Infektion und hIP-10-ELISA wie in a). Zur TLR3-Inhibition mit Chloroquin wurde das Zellmedium 2 h vor Mengo-C19A/C22A Infektion gewechselt und mit 50  $\mu$ M versetzt.

Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei, für MAVS<sup>-/-</sup> zwei, unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte  $\pm$  SEM von n= 3, 4 oder 5 unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001, ns (nicht signifikant) p > 0.05.

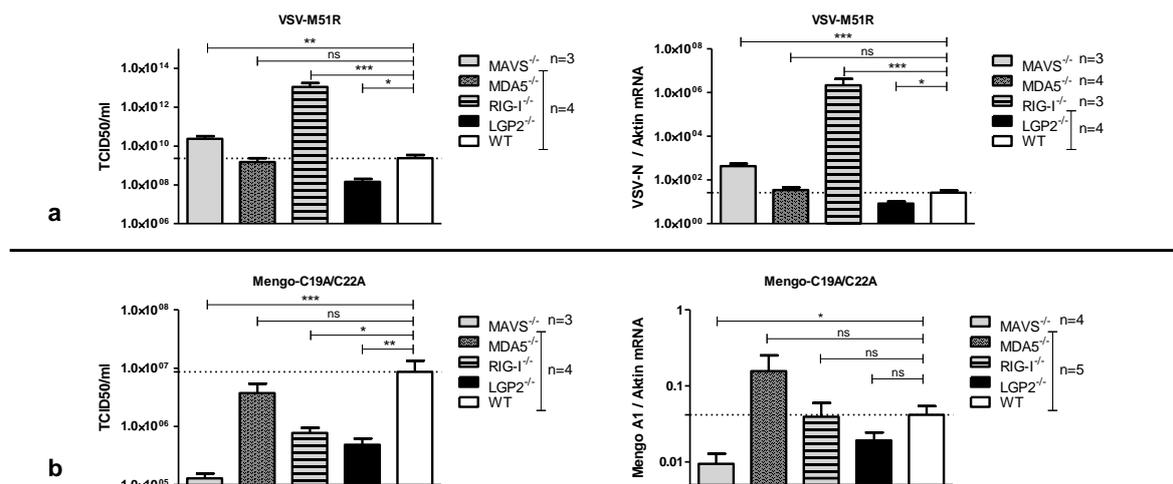
#### 4.5. LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Virusreplikation nach Infektion mit VSV in 1205lu Zellen

In *Abbildung 15* wurde gezeigt, dass die LGP2-Defizienz eine verminderte Immunreaktion nach Virusinfektion durch SeV, VSV-M51R und Mengo-C19A/C22A hervorruft. Zur Untersuchung, ob diese verminderte antivirale Immunaktivität auch einen Einfluss auf die Virusreplikation ausübt, wurden Proben der Zellüberstände aus *Abbildung 14* und *Abbildung 15* vor Inaktivierung asserviert und die Viruslast im Zellüberstand durch den TCID50 assay durch Infektion von BHK21-Zellen gemessen (Abschnitt 3.6.1). Dieser Assay ist jedoch nicht für das Sendai Virus geeignet, da dieses in humanen und Hamster-Zelllinien keine Zytotoxizität hervorruft. Des Weiteren wurden die RNA-Isolate aus den Infektionsversuchen auf Expression viraler mRNA für VSV-N- beziehungsweise Mengovirus A1-mRNA untersucht und ebenfalls auf die Aktin-mRNA-Expression normiert. Leider war eine SeV-mRNA-Expressionsanalyse erfolglos. Ähnliche negative Daten mit SeV hatten Johannes Rückel und Johannes Tossounidis unserer Arbeitsgruppe. Eine Ursache dieses wahrscheinlich primär technischen Problems konnte bisher nicht eruiert werden.

Die Ergebnisse der Virusreplikationsanalyse für VSV-M51R in *Abbildung 16a* zeigen erwartbare Ergebnisse eines RIG-I-spezifischen Virus. Während die MDA5-defizienten Klone Wildtyp-ähnliche Virustiter aufwiesen, zeigten die RIG-I- und MAVS-defizienten Klone bei verminderter Interferonproduktion eine stark erhöhte Viruslast im Zellüberstand und auf mRNA-Expressionsebene des VSV-N-Proteins, (*Abbildung 14b*). Diese Ergebnisse sind vereinbar mit einem publizierten Mausmodell, in dem ebenfalls eine erhöhte Viruslast in RIG-I-defizienten Zellen beschrieben wurde <sup>[146,149]</sup>. Daniel Böhmer (medizinischer Doktorand, Arbeitsgruppe Schnurr, Abteilung für Klinische Pharmakologie, LMU München) konnte mit denselben RIG-I-defizienten Klonen zeigen, dass die VSV-Replikation in Kokultur mit interferonproduzierenden Wildtyp-Zellen vermindert war. Überraschenderweise zeigten die LGP2-defizienten Klone, trotz verminderter Interferonproduktion, eine reduzierte Viruslast im Zellüberstand (LGP2<sup>-/-</sup>: 1,442x10<sup>8</sup> /ml; WT: 2,335x10<sup>9</sup> /ml) und auf mRNA-Expressionsebene des VSV-N-Proteins (LGP2<sup>-/-</sup>: 8,472 VSV-N/Aktin, WT: 26,248 VSV-N/Aktin).

Die Ergebnisse der Mengovirus-Replikation in *Abbildung 16b* zeigen auf den ersten Blick eine deutlich verminderte Viruslast im Überstand der LGP2-defizienten Klone im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,49x10<sup>6</sup> /ml, WT: 8,63x10<sup>6</sup> /ml). Allerdings hat wahrscheinlich keine Mengovirus-Replikation stattgefunden, da bereits eine Viruslast von 6x10<sup>6</sup> /ml zur Infektion verwendet wurde (entsprechend 3x10<sup>6</sup> Virionen bei MOI=50 für 6x10<sup>4</sup> Zellen in 500 µL Zellmedium). Ebenfalls konnte aufgrund replikationshemmender Nebenwirkungen von Chloroquin keine TLR3-Inhibition erfolgen <sup>[150]</sup>. Am ehesten wird von einer gesteigerten Interferonsensibilität der Mengo-C19A/C22A-Mutante ausgegangen. Durch die fehlende Fähigkeit zur Interferoninhibition findet bei bereits geringen Interferonmengen, gegebenenfalls durch TLR3 induziert, keine Replikation mehr statt <sup>[147]</sup>. Dies würde die verminderte Mengovirus A1-mRNA-Expression in MAVS-defizienten Klonen durch den in *Abbildung 15* beschriebenen TLR3-Effekt erklären. Ein LGP2-Effekt auf die Mengovirus-Replikation kann daher aufgrund fehlender Daten nicht abschließend geklärt werden.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die LGP2-Defizienz eine Verminderung der Virusreplikation der VSV-M51R in der 1205lu Zelllinie aufweist.



**Abbildung 16: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Virusreplikation von VSV-M51R in 1205lu Zellen**

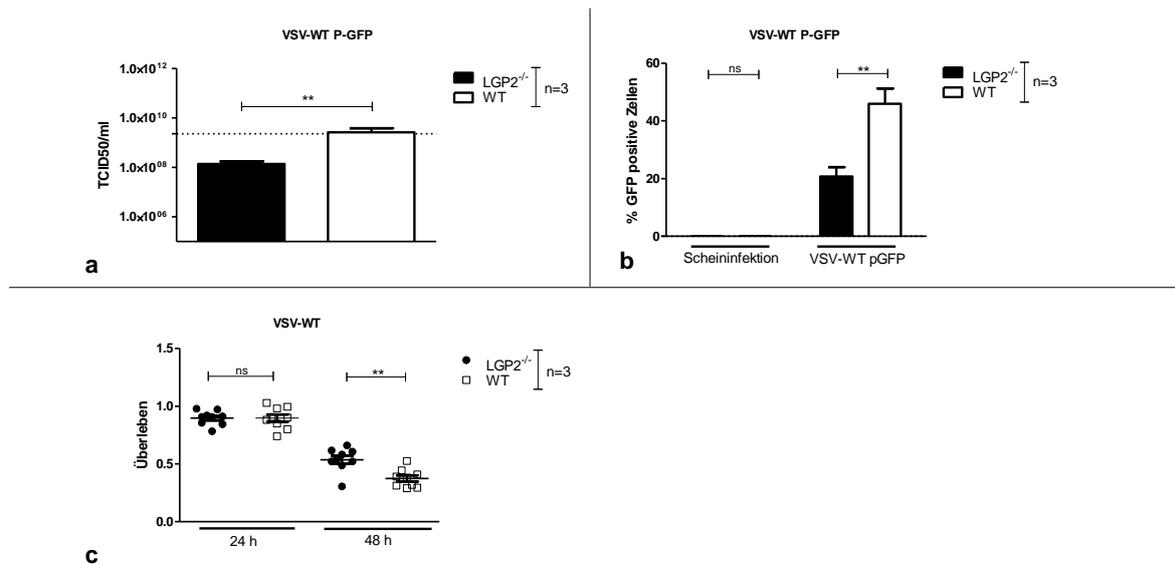
a) Für jeden Zellklon wurden  $6 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 24-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit MOI=0,1 der Vesicular stomatitis Virus-Mutante infiziert (VSV-M51R; Met->Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins zerstört dessen Interferon-inhibierende Funktion). Nach weiteren 24 h Inkubation wurde die Viruslast im Zellüberstand mittels TCID50 assay bestimmt. Die mRNA-Expressionsanalyse erfolgte nach RNA-Isolation aus virusinfizierten Zellen mittels RT-qPCR mit entsprechenden Primern für VSV-N oder  $\beta$ -Aktin. Die VSV-N-mRNA-Expression wurde auf die  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression normiert.

b) wie a) bloß Infektion mit MOI=50 Mengovirus-Mutante über 48 h (C19A/C22A-Mutation im *leader*-(L)-Gen zerstört die Fähigkeit des *leader* Proteins die Expression von IFN- $\alpha/\beta$  zu inhibieren) . mRNA-Expressionsanalyse wie in a) bloß mit Primern für Mengovirus A1. Die Mengovirus A1-mRNA-Expression wurde ebenfalls auf die  $\beta$ -Aktin-mRNA-Expression normiert.

Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei, für MAVS<sup>-/-</sup> zwei, unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte +- SEM von n=3, 4 oder 5 unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \* p  $\leq$  0.05, \*\* p  $\leq$  0.01, \*\*\* p  $\leq$  0.001, ns (nicht signifikant) p > 0.05.

#### 4.6. LGP2-Defizienz führt auch nach Infektion mit VSV-WT in 1205lu Zellen zu verminderter Virusreplikation und dies beruht nicht auf einer Reduktion der Zellvitalität

Zur Untersuchung, ob die Ergebnisse zur VSV-M51R Virusreplikation aus *Abbildung 16a* auch unter den Bedingungen einer durch das VSV-M-Protein inhibierten Interferonproduktion reproduzierbar sind, wurden die Untersuchungen der LGP2-defizienten Klone nach Infektion mit einem VSV-WT P-GFP Stamm wiederholt. Durch das intakte M-Protein ist dieses Virus in der Lage die antivirale Immunantwort zu unterdrücken [144,145] und kodiert zusätzlich ein GFP-markiertes P-Protein, dessen Expression für weitere Virusreplikationsanalysen verwendet wurde. Die VSV-Viruslast im Zellüberstand von Wildtyp-Zellen nach Infektion mit VSV-WT P-GFP (MOI=0,1, *Abbildung 17a*) ergab annähernd identische Werte wie nach VSV-M51R-Infektion (*Abbildung 16a*) (VSV-WT:  $2,626 \times 10^9$  /ml, VSV-M51R:  $2,335 \times 10^9$  /ml). LGP2-defiziente Klone wiesen ebenfalls vergleichbare Werte der Virusreplikation für VSV-WT und VSV-M51R auf (VSV-WT:  $1,385 \times 10^8$  /ml, VSV-M51R:  $1,442 \times 10^8$  /ml).



**Abbildung 17: LGP2-Defizienz führt auch nach Infektion mit VSV-WT in 1205lu Zellen zu verminderter Virusreplikation und beruht nicht auf einer Reduktion der Zellvitalität**

a) Für jeden Zellklon wurden  $6 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 24-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit  $\text{MOI}=0,1$  des Vesicular stomatitis Virus infiziert (VSV-WT P-GFP; GFP-gekoppeltes P-Protein). Nach 24 h Inkubation wurde die Viruslast im Zellüberstand mittels TCID50 assay bestimmt.

b) wie in a) Nach 24 h Inkubation wurden die Zellen in 4 % Paraformaldehyd (PFA) in PBS suspendiert und 5 min mit UV-Bestrahlung inaktiviert. Anschließend wurden jeweils  $2 \times 10^4$  Zellen in der Durchflusszytometrie auf deren GFP-Fluoreszenz analysiert. Das Ergebnis wird als Quotient der GFP-positiven Zellen an allen vitalen Zellen in Prozent angegeben.

c) *CellTiter Blue* Vitalitätsassay: Für jeden Zellklon wurden  $2 \times 10^4$  Zellen je *well* einer 96-*well*-Mikrotiterplatte ausgesät und nach 24 h Inkubation mit  $\text{MOI}=0,1$  Vesicular stomatitis Virus (VSV-WT) oder Opti-MEM Kulturmedium (Scheininfektion) infiziert. Nach weiteren 24 h und 48 h wurden 20  $\mu\text{L}$  des *CellTiter Blue* Reagenzes je *well* hinzugefügt und die Fluoreszenz nach 4 h bestimmt. Das Überleben wird als Fluoreszenzquotient aus VSV-WT und Scheininfektion angegeben.

Für jeden der angegebenen Genotypen wurden drei unterschiedliche *knockout* Klone separat untersucht und die Werte gemittelt. Gezeigt sind hier Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n=3$  unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments. Horizontale gestrichelte Linien entsprechen den Mittelwerten der Wildtyp-Zellen. Statistische Analysen wurden zwischen den angezeigten Bedingungen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ , ns (nicht signifikant)  $p > 0,05$ .

Diese Ergebnisse waren auch durch eine durchflusszytometrische Bestimmung der Viruslast über die GFP-Fluoreszenz reproduzierbar (*Abbildung 17b*). Die GFP-Expression als Parameter der Virusinfektion ist eine etablierte Methode, unter anderem verwendet von Yao et al. [137]. Die LGP2-defizienten Klone zeigten in der GFP-Expression eine deutlich verminderte Anzahl infizierter Zellen nach Infektion mit dem VSV-WT P-GFP (LGP2<sup>-/-</sup>: 20,73 %, WT: 45,97 %), entsprechend ungefähr einer Verdopplung infizierter Zellen nach 24 Stunden ( $\text{MOI}=0,1$  entspricht 10 % infizierte Zellen zu Beginn). Erwartungsgemäß war nach Scheininfektion mit Opti-MEM keine GFP-Expression nachweisbar. Diese Ergebnisse zeigen keinen deutlichen Effekt des intakten M-Proteins auf die Virusreplikation, obwohl von einer geringeren Interferonproduktion durch den VSV-WT Stamm im Vergleich zur VSV-M51R-Mutante ausgegangen werden kann [151]. Zum Ausschluss eines *confounding* Effektes durch den virusinduzierten Zelltod wurde ein Vitalitätsassay mittels *CellTiterBlue* assay (Abschnitt 3.6.2) nach Infektion der LGP2-defizienten Klone durchgeführt. Zur Vermeidung einer Interferenz der GFP-Expression mit der Resorufin-Fluoreszenzmessung wurde hierfür ein VSV-WT Stamm ohne GFP-Expression verwendet (VSV-WT,  $\text{MOI}=0,1$ ). Es erfolgte eine Analyse der Vitalität nach 24 und 48

Stunden, wobei die Ergebnisse jeweils auf die Werte einer Scheininfektion mit Opti-MEM Kulturmedium normiert wurden (*Abbildung 17c*). Die Normierung auf die Scheininfektion erlaubt eine Korrektur von Variationen der Zellteilung einzelner Zellklone. Die Ergebnisse zeigten, dass die LGP2-defizienten Klone nach 24 Stunden (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,898 xFluoreszenz, WT: 0,898 xFluoreszenz) und 48 Stunden (LGP2<sup>-/-</sup>: 0,537 xFluoreszenz, WT: 0,374 xFluoreszenz) eine gleiche oder höhere Vitalität im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen aufwiesen, vereinbar mit der in *Abbildung 17a/b* gezeigten Viruslast.

Zusammenfassend verifizieren die Infektionsversuche mit VSV-WT, dass die LGP2-Defizienz mit einer verminderten Virusreplikation von VSV in 1205lu Zellen einhergeht und dass dieser LGP2-Effekt nicht auf vermehrtem Zelltod beruht.

### 4.7. LGP2 zeigt keine Interaktion mit VSV-RNP im *electrophoretic mobility shift assay*

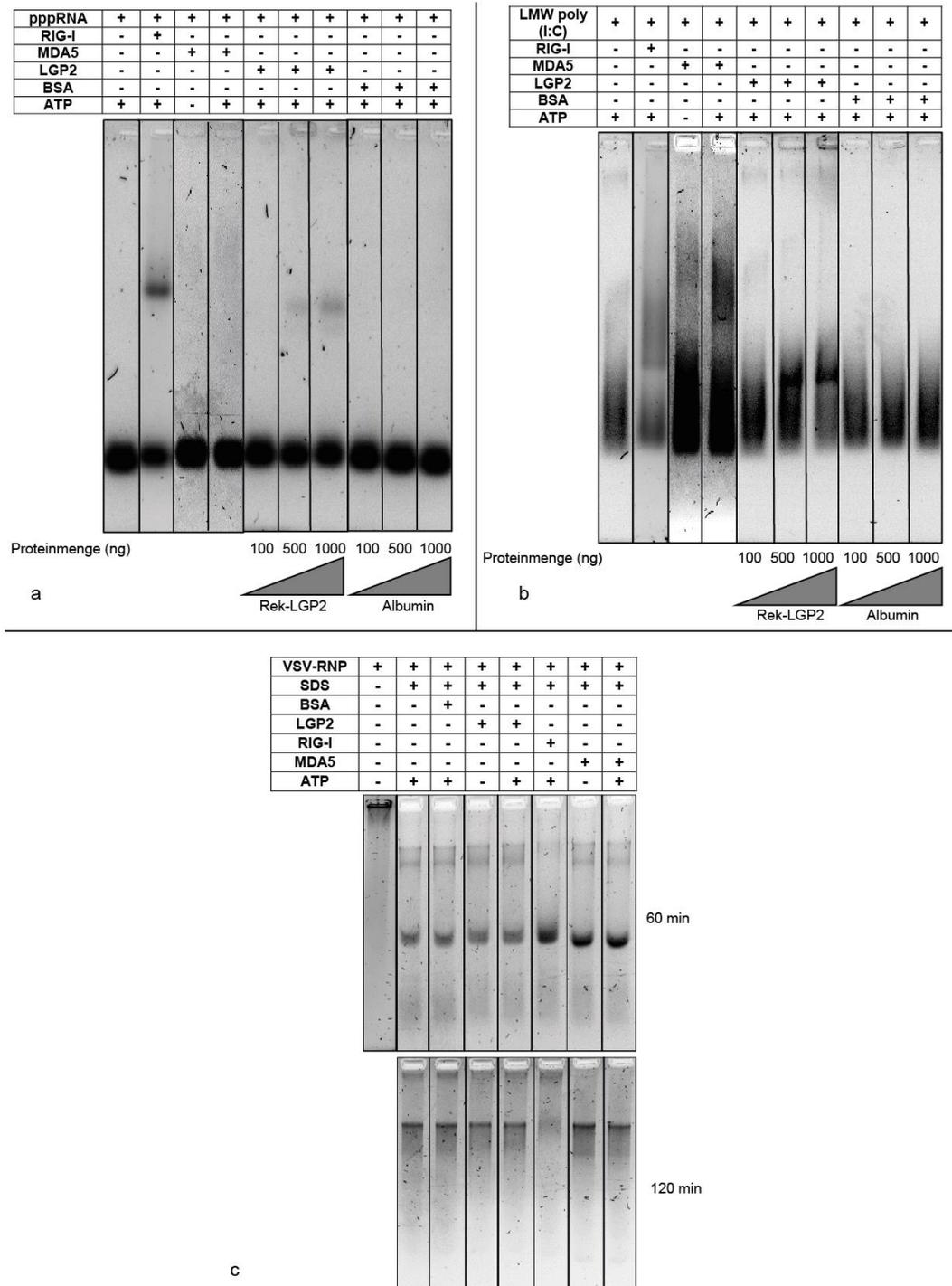
Wie zuvor beschrieben zeigen die phänotypischen Untersuchungen der LGP2-defizienten Klone eine verminderte Zytokinproduktion (reduziertes IP-10 im Zellüberstand, sowie reduzierte IFN- $\beta$ - und IP-10-mRNA-Expression) und eine verminderte Viruslast (reduzierte Viruslast im Überstand im TCID50 und reduzierte Zahl infizierter Zellen nach Infektion mit einem GFP-Reportervirus) nach Infektion mit VSV. Diese Ergebnisse ließen sich nicht durch einen gesteigerten Zelltod der LGP2-defizienten Klone erklären, weshalb eine spezifische Rolle von LGP2 in der VSV-Replikation vermutet wurde.

Als eine von vielen möglichen Ursachen wurde eine Effektorfunktion von LGP2 durch eine direkte Interaktion mit viralen Proteinen und Nukleinsäuren unabhängig von der antiviralen Signalkaskade der RLRs vermutet. Eine solche Funktion wurde von Yao et al. für RIG-I und MDA5 nachgewiesen <sup>[137]</sup>. Durch PAMP-Sequestrierung verhindert die Bindung viraler Proteine an dsRNA einen PKR-abhängigen Verdau der dsRNA. Diese PKR-Inhibition konnte durch die Interaktion von RIG-I und MDA5 mit den viralen Proteinen verhindert werden. Insbesondere war auch für CARD-deletiertes-RIG-I/MDA5 eine Interaktion mit viralen Proteinen nachweisbar <sup>[137]</sup>. Aufgrund der Sequenzhomologie von LGP2 und den verwendeten CARD-deletierten RIG-I- und MDA5-Proteinen wurde eine ähnliche Interaktion von LGP2 mit viralen Proteinen vermutet. Eine mögliche Interaktion von LGP2 mit viralen Proteinen kann in Ribonukleoprotein Komplexen (RNP) stattfinden. RNP bestehen aus viraler RNA, die mit viralen Proteinen besetzt ist <sup>[137]</sup>. Solche Protein-RNA-Komplexe lassen sich im *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA, Abschnitt 3.4.5) durch unterschiedliches Elektrophorese-Verhalten in einer nativen Agarose-Elektrophorese nachweisen. Die in dieser Arbeit verwendeten VSV-RNP wurden durch Maximilian Gradel und Johannes Raps unserer Arbeitsgruppe aus VSV-WT isoliert, basierend auf der Ultrazentrifugation denaturierter, hochtitriger und DI-Genom-armer Virusbestände. Für eine ausführliche Beschreibung der Methode wird auf die Promotionsarbeiten von Johannes Raps verwiesen <sup>[152]</sup>.

Zur Etablierung der Methode wurden zunächst rekombinante RLR-Proteine (zur Verfügung gestellt durch Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner, Genzentrum, LMU München) mit den etablierten synthetischen Liganden pppRNA und LMW poly(I:C) inkubiert. Erwartungsgemäß zeigte RIG-I eine Interaktion mit pppRNA (40 Basen), was durch den *shift* der RNA-Bande nachweisbar war (*Abbildung 18a*). Auch LGP2 zeigte in

steigender Konzentration eine Interaktion mit der pppRNA, die im Vergleich zu RIG-I jedoch qualitativ schwächer ausfiel. Eine schwache Interaktion von LGP2 mit pppRNA ist am ehesten auf Interaktion mit dem dsRNA-PAMP zurückzuführen. Eine Interaktion von LGP2 mit dsRNA unabhängig eines Triphosphat-Rests ist beschrieben [77,78,153]. MDA5 und Albumin zeigten erwartungsgemäß keine Interaktion mit pppRNA. HMW poly(I:C) konnte aufgrund der Molekülmasse (1,5 – 8,0 kb) nicht in das 1,2 % native Agarosegel wandern (Daten nicht gezeigt), weshalb hier LMW poly(I:C) verwendet wurde. LMW poly(I:C) zeigte aufgrund der undefinierten Länge (0,2 – 1 kb) im Gegensatz zur pppRNA keine definierte Bande, sondern einen Schmier (*Abbildung 18b*). MDA5 wies eine Interaktion durch einen *shift* des poly(I:C)-Schmiers auf. Dies ist vereinbar mit publizierten EMSA-Daten zur Fibrillenbildung von MDA5 an poly(I:C) von Berke & Modis [68]. Die MDA5-Bindung an LMW poly(I:C) war sowohl mit als auch ohne ATP sichtbar, vereinbar mit dem dynamischen MDA5-Bindungsmodell [50,71]. Die Promiskuität von poly(I:C) wird durch die Interaktion mit RIG-I auch im EMSA gezeigt. Nach Inkubation mit rekombinantem LGP2 war im EMSA ebenfalls ein *shift* mit klar definierter Bande im Agarosegel nachzuweisen. Dieser Effekt war in Analogie zu den pppRNA-Versuchen auch für LMW poly(I:C) von der LGP2-Konzentration abhängig. Diese direkte Interaktion wurde bereits 2005 von Rothenfußer et al. durch Immunopräzipitation von LGP2 mit poly(I:C) beschrieben [36] und unterstützt eine Rolle von LGP2 in der MDA5-abhängigen Erkennung von poly(I:C) (*Abbildung 13a*). Erwartungsgemäß war keine Interaktion zwischen Albumin und LMW poly(I:C) nachweisbar.

Die EMSA-Versuche mit pppRNA und LMW poly(I:C) zeigten die Validität der Methode für die folgenden Versuche mit VSV-RNP (*Abbildung 18c*). Analog zu HMW poly(I:C) war die Elektrophorese der VSV-WT-RNP im 1,2 % Agarosegel aufgrund der hohen Molekülmasse zunächst nicht möglich. Hierzu wurden die VSV-RNP Proben für 30 Minuten mit 0,05 % SDS vor-inkubiert, um einen Anteil der gebundenen Proteine zu lösen. Anschließend wurden die Proben wie zuvor mit rekombinanten RLR-Proteinen oder Albumin inkubiert. Als methodische Anpassung erfolgte hier die Färbung mit *DNA Stain Clear G*. Diese erlaubt neben der karzinogen-freien Arbeit die Fortführung der Elektrophorese nach einer Zwischen-Auswertung nach 24 Stunden, da keine aufwändige Färbung mit *SYBR-Green-II* notwendig war. Die Elektrophorese wurde für 60 Minuten und 120 Minuten durchgeführt. Die Ergebnisse der VSV-RNP-EMSA zeigten für RIG-I ein leicht verändertes Bandenmuster mit verschmiertem Aspekt der mittleren Bande, besonders nach 120 Minuten. Dies entspricht möglicherweise einer Interaktion zwischen RIG-I und VSV-RNP. Für LGP2, MDA5 und BSA zeigten sich allerdings keine veränderten Bandenmuster. Allerdings sollten die methodischen Einschränkungen dieser Versuchsreihe anhand des notwendigen SDS-Verdau der VSV-RNP vor Inkubation mit den rekombinanten RLR-Proteinen beachtet werden. Dieser SDS-Verdau ermöglichte zwar die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel, könnte jedoch Protein-RNA-Strukturen innerhalb der RNP auflösen oder eine Interaktion zwischen RLR-Proteinen und RNP-Proteinen behindern. Alternative Fragmentierungsansätze durch enzymatische Degradation oder Ultraschall-Verdau waren erfolglos (Daten nicht gezeigt). Daher lässt sich anhand dieser Ergebnisse keine direkte Interaktion zwischen LGP2 und den VSV-RNP nachweisen.



**Abbildung 18: LGP2 zeigt keine Interaktion mit VSV-RNP im *electrophoretic mobility shift assay***

Die unten beschriebenen Proben wurden in EMSA-Puffer (20 nM Hepes, 150 nM NaCl, 3 nM MgCl<sub>2</sub>, 1 nM DTT, pH 7,5) verdünnt, 60 min bei 37 °C inkubiert und dann auf ein 1,2 % natives Agarosegel mithilfe von 5 % Glycerol aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 100 V in 1x TAE-Puffer für 60 min durchgeführt und in a) und b) anschließend mit *SYBR-Green-II* gefärbt. Rekombinante RLR-Proteine wurden durch Prof. Dr. Karl-Peter Hopfner zur Verfügung gestellt.

a) Triphosphat-RNA-EMSA: 400 ng pppRNA (5'-Triphosphat-RNA mit ds-Region und *hairpin loop*; hergestellt durch *in vitro* Transkription) wurden mit Albumin (BSA, 100 ng, 500 ng oder 1000 ng) oder rekombinanten RLR-Proteinen LGP2 (100 ng, 500 ng oder 1000 ng) oder 1000 ng RIG-I oder MDA5 mit/ohne ATP (100 μM) inkubiert.

b) Poly (I:C)-EMSA: 400 ng LMW poly(I:C) wurden mit Albumin (BSA, 100 ng, 500 ng oder 1000 ng) oder rekombinanten RLR-Proteinen LGP2 (100 ng, 500 ng oder 1000 ng) oder 1000 ng RIG-I oder MDA5 mit/ohne ATP (100 μM) inkubiert.

c) VSV-WT-RNP-EMSA: 300ng VSV-WT-RNP wurden zunächst in 0,05 % SDS für 30 min bei Raumtemperatur verdaut und anschließend mit 1000 ng Albumin (BSA) oder rekombinanten RLR-Proteinen (100 ng LGP2, 1000 ng RIG-I oder 2500 ng MDA5) mit/ohne ATP (100  $\mu$ M) inkubiert und mit *DNA Stain Clear G* nach Herstellerangaben gefärbt. oben: 60 min Elektrophorese, unten: 120 min Elektrophorese.  
Die gezeigten EMSA entsprechen repräsentativen Ergebnissen aus drei unabhängigen Wiederholungen dieses Experiments.

## 5. Diskussion

Zur Klärung der Rolle von LGP2 im RLR-Signalweg wurden mithilfe der CRISPR/Cas9 Geneditierung drei LGP2-defiziente Klone der Melanomzelllinie 1205lu generiert. Die LGP2-Defizienz der *knockout* Klone wurde dabei durch Fehlen einer LGP2-Expression im *westernblot* und Nachweis bialleler *frameshift* Mutationen in der Sangersequenzierung für jeden der Klone bestätigt. In folgenden Untersuchungen wurden die LGP2-defizienten Zellklone in funktionellen Experimenten eingesetzt, um die Rolle von LGP2 im RLR-Signalweg zu untersuchen. Zunächst konnte durch die Stimulation der Zellklone auf unterschiedlichen Ebenen im RLR-Signalweg durch Interferon- $\beta$ -Reporter-Untersuchungen eine Rolle von LGP2 auf oder oberhalb der Ebene von RIG-I und MDA5 gezeigt werden. Die positive Interferon-*feedback*-Schleife war dabei durch das Fehlen von LGP2 nicht beeinflusst. Als Nächstes konnte gezeigt werden, dass die LGP2-Defizienz eine reduzierte Immunaktivität nach Stimulation mit den synthetischen RLR-Liganden Triphosphat-RNA und HMW poly(I:C) hervorruft. Dafür wurde mittels ELISA die IP-10 Konzentration im Zellüberstand nach 24 Stunden bestimmt. Des Weiteren führte die LGP2-Defizienz zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit SeV, der VSV-M51R-Mutante und der Mengovirus-C19A/C22A-Mutante. Dies zeigte sich in der mittels ELISA im Zellüberstand bestimmten IP-10 Konzentration nach 24 Stunden und der zum selben Zeitpunkt mittels RT-qPCR gemessenen Expression von IFN- $\beta$ - und IP-10-mRNA. Somit weist das vorliegende *loss of function* Modell eine modulierende, allerdings nicht essenzielle Rolle von LGP2 im antiviralen Signalweg von RIG-I und MDA5 auf. Das Fehlen von LGP2 führte unerwarteterweise zu einer verminderten Virusreplikation von VSV und Mengovirus in 1205lu Zellen. Dies konnte durch Bestimmung der Viruslast im Zellüberstand mittels TCID<sub>50</sub>, Expression viraler mRNA mittels RT-qPCR und für VSV durch durchflusszytometrische Bestimmung der infizierten Zellen nach Infektion mit einem GFP-exprimierendem VSV-Stamm bestimmt werden. Zumindest für VSV konnte gezeigt werden, dass die verminderte Virusreplikation nicht durch erhöhten Zelltod der LGP2-defizienten Klone hervorgerufen wird. Eine Interaktion zwischen LGP2 und VSV-Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP) als möglicher Mechanismus einer Rolle von LGP2 konnte durch EMSA nicht gezeigt werden.

Diese Ergebnisse müssen kritisch unter Berücksichtigung einiger Störfaktoren interpretiert werden. Die Verwendung einer genetisch instabilen Melanomzelllinie (hier 1205lu) beruhte vorwiegend auf Praktikabilitätsgründen: der starken Expression der RLR in dieser Zelllinie, sowie einfacher Zellkultur-Handhabung, guter Transfizierbarkeit mit Plasmiden oder RNA-Molekülen und langjähriger Etablierung der Zelllinie in der Arbeitsgruppe. Die Zugehörigkeit aller verwendeten Zellklone zur 1205lu-Zelllinie konnte durch die STR-Analyse bewiesen werden. Der Versuch der zusätzlichen Etablierung von LGP2-defizienten Klonen der Zelllinien HEK-293T und A549 blieb erfolglos (Daten nicht gezeigt). Bereits die Generierung der *knockout* Klone durch Heranzüchten klonierter Einzelzellklone nach der CRISPR/Cas9 Geneditierung bedarf einer relevanten Anzahl an Zellteilungen, bis man mit ihnen experimentieren kann. Aufgrund der bei jeder Zellteilung zufällig vorkommenden Mutationen kann dies zu einer genetischen und phänotypischen Divergenz von *knockout* Klonen und der Wildtyp-Zelllinien in Merkmalen außerhalb des Zielgens führen <sup>[154,155]</sup>. Die phänotypische Instabilität zeigte sich in dieser Arbeit vereinzelt bei *knockout* Klonen, die aufgrund uneinheitlicher biologischer Replikate aus Versuchsreihen ausgeschlossen werden mussten (Daten nicht gezeigt). Die MDA5-defizienten Klone

wiesen eine gesteigerte Reaktion nach Kontrolltransfektion mit OH-RNA-CO<sub>4</sub>, Scheininfektionen und Virusinfektion mit SeV und VSV auf. Eine Kontamination des Opti-MEM Kulturmediums konnte durch weitere Ergebnisse ausgeschlossen werden. Ebenfalls konnte die Analyse der Einzelzellergebnisse bestätigen, dass dies nicht auf einem Einzelzell-Effekt oder Ausreißerdaten beruhte. Leider konnte aufgrund fehlender STING-Expression in 1205lu keine Stimulation des ebenfalls zytosolischen cGAS-STING-Signalweges zur besseren Charakterisierung dieses Phänotyps und als Negativkontrolle einer RLR-Stimulation verwendet werden.

Im Rahmen der *knockout*-Validierung wurde keine Untersuchung möglicher *off-target* Effekte der CRISPR/Cas9 Geneditierung durchgeführt. Obwohl das System als sehr zuverlässig gilt, kann die *guide*RNA theoretisch auch an Loci außerhalb des Zielgens binden und dort Mutationen hervorrufen. In einer Studie von Kim et al. waren allerdings nur wenige genomische Loci von solchen *off-target*-Mutationen betroffen <sup>[156]</sup>. Ferner können neuerdings durch die Verwendung modifizierter *guide*RNAs die Nebenwirkungen minimiert werden <sup>[156]</sup>. Ob mögliche *off-target* Mutationen letztendlich den Phänotyp der hier verwendeten *knockout* Klone beeinflusst haben oder für observierte phänotypische Instabilität verantwortlich sind, bleibt ungeklärt.

Zusätzlich muss bei der Interpretation der Daten die relativ kleine Anzahl an Klonen jedes Genotyps berücksichtigt werden: Die sehr geringe Ausbeute tatsächlicher *knockout* Klone im Vergleich zur Zahl der gezüchteten Einzelzellklonen war hierbei der am stärksten limitierende Faktor. Beispielsweise waren von 90 gezüchteten Einzelzellklonen nur drei biallelische LGP2-defiziente Klone etablierbar. Der beschriebene Effekt beruht daher auf zusammengefassten Ergebnissen mehrerer Untersuchungen von zwei bis drei Klonen je Genotyp. Die mögliche Verzerrung des wahren biologischen Effekts durch gepoolte Daten im Vergleich zu Daten aus Mischkulturen bleibt ebenfalls ungeklärt. Für diese Arbeit wurde die aufwendigere Einzelzellanalyse bevorzugt, da sie individuelle Schwankungen wie Unterschiede in Wachstumsverhalten vermeintlich besser widerspiegelt. Durch eine Mischkultur der Einzelzellklone zu Beginn jedes Versuches könnte das Wachstumsverhalten oder phänotypische Variabilität eines Einzelzellklons bei starker Ausprägung den Effekt anderer Klone überdecken und somit den wahren biologischen Effekt verbergen. Dieser Begründung unterliegt auch die Verwendung von zwei Wildtyp-Einzelzellklonen zusätzlich zur Wildtyp-Mischpopulation.

Neben der durchgeführten genotypischen (biallelische *frameshift*-Mutation in der Sangersequenzierung) und phänotypischen (fehlende Proteinexpression im *westernblot*) Validierung der LGP2-Defizienz, konnte die LGP2-Defizienz nicht auf transkriptioneller Ebene verifiziert werden. Entgegen der Erwartung wies die Messung der LGP2-mRNA-Expression mittels RT-qPCR nach Stimulation von LGP2-defizienten Klonen mit HMW poly(I:C) erhöhte Werte auf (Daten nicht gezeigt). Dies ist für ein Interferon-stimuliertes Gen (ISG) zu erwarten, allerdings für *knockout* Zellen zunächst überraschend. Eine mögliche Erklärung bietet der *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD), durch den fehlerhafte mRNA in Zellen degradiert wird. Dieser Mechanismus beschreibt den Abbau „defekter“ mRNA bei Vorliegen eines vorzeitigen Stopp-Codons in der Umgebung einer Splicestelle <sup>[157-161]</sup>. Trotz bialleler *frameshift*-Mutationen und folglich funktionslosem Protein wäre es denkbar, dass aufgrund der Lokalisation des Stopp-Codons innerhalb der mRNA-Sequenz keine Degradation dieser mRNA durch das NMD erfolgt. Theoretisch könnte es hierdurch zu einer Translation der defekten mRNA kommen. Aufgrund der gewählten *guide*RNA Zielsequenz im vorderen Genabschnitt (Nukleotidpositionen 163-184, Exon 1) käme

es durch das vorzeitige Stopp-Codon zur Translation eines funktionslosen Peptids, welches anschließend anderweitig abgebaut wird (z.B. im Proteasom). Die verwendeten RT-qPCR-Primer sind hingegen mittig im LGP2-Gen lokalisiert, an den Nukleotidpositionen 795-815 (*forward* Primer). Es erscheint daher nachvollziehbar, dass die Amplifikation dieses Abschnitts bei möglicherweise nicht degradiert mRNA erfolgreich verlief. Aufgrund des kombinierten Nachweises einer genotypischen und phänotypischen LGP2-Defizienz konnten die Zellklone trotz erhöhter LGP2-mRNA-Expression eindeutig als *knockout* verifiziert werden.

Die Untersuchung der Rolle von LGP2 auf den MDA5-Signalweg wurde durch das Fehlen eines MDA5-spezifischen Liganden und der Stimulation von TLR3 durch poly(I:C) und Mengovirus erschwert. TLR3 erkennt ebenfalls das dsRNA-PAMP und führt zur Produktion von Typ-I-Interferonen, wird allerdings membrangebunden und vorwiegend endosomal exprimiert [32]. Unter TLR3-Inhibition und Transfektion von HMW poly(I:C) war dennoch eine MDA5-spezifische RLR-Stimulation mit positiv modulierendem, nicht essenziellem Einfluss von LGP2 im MDA5-Signalweg nachweisbar. Diese Ergebnisse sind vorwiegend kongruent zur Fachliteratur [83,162], allerdings widersprüchlich zu Ergebnissen von Parisien et al., die in LGP2-defizienten HEK293-Zellen eine erhöhte IFN- $\beta$ -Expression 6 Stunden nach Stimulation mit poly(I:C) zeigten [82]. Bruns et al. zeigten die Bedeutung von LGP2 in der frühen Erkennung von dsRNA durch MDA5, allerdings mit dichotomer, konzentrationsabhängiger Wirkung: In geringer Konzentration unterstützt LGP2 die effiziente MDA5-Filamentbildung entlang poly(I:C) [77,79]. In höherer Konzentration wirkt LGP2 allerdings hemmend auf MDA5, beispielsweise durch PAMP-Sequestrierung bei kompetitiver Bindung der dsRNA [79].

Im Mausmodell von Satoh et al. ging die LGP2-Defizienz mit einer gesteigerten Viruslast nach Infektion mit dem EMCV einher, das durch MDA5 detektiert wird [84]. Ähnliche LGP2-Effekte konnten in der vorliegenden Arbeit für das mit EMCV-verwandte Mengovirus nicht etabliert werden, wahrscheinlich aufgrund fehlender Virusreplikation bei gesteigerter Interferonsensibilität der in dieser Arbeit verwendeten Mengo-C19A/C22A-Mutante [147]. Diese könnte zum einen durch die Bildung von *defective interfering*-(DI)-Genomen als Stimulus für eine Interferon-Induktion beruhen und dem selektiven *sensing* einer Mengovirusinfektion durch MDA5 entgegenstehen. DI-Genome entstehen als verkürzte, defekte Produkte der Replikation bei hoher MOI (in den vorgestellten Experimenten wurde mit einer MOI=50 eine hohe MOI verwendet) und wirken durch bestimmte Strukturelemente als eigenständiges PAMP [163-165], das neben MDA5 insbesondere auch RIG-I aktivieren kann [50,151]. Andererseits konnte eine interferierende Rolle durch gesteigerte TLR3-Aktivität nachgewiesen werden. Die TLR3-Aktivität war in den Stimulationsversuchen durch Chloroquin unterdrückbar, allerdings kann Chloroquin aufgrund Beeinflussung der Virusreplikation (beispielsweise Flaviviren, Retroviren, Coronaviren und Picornaviren) in Virusinfektionsexperimenten nur unter Vorbehalt verwendet werden [150,166]. Die Etablierung stabiler TLR3-MDA5- bzw. TLR3-LGP2-defizienter Zelllinien durch erneute CRISPR/Cas9 Geneditierung war aufgrund des großen Aufwandes nicht realisierbar. Die Chloroquin-Inhibition wurde einer transienten TLR3-Stilllegung mittels siRNA aufgrund möglicher immunstimulatorischer Aktivität vorgezogen. Ferner könnte die Stilllegung von TLR3 die RLR-Aktivität beeinflussen. Eine synergistische Rolle von TLR3 und MDA5/RIG-I zur Eindämmung bestimmter Virusinfektionen (beispielsweise Dengue Virus) sind beschrieben [167]. Zudem könnte eine TLR3-abhängige

Vorstimulation durch Expression von RLR als ISG konzentrationsabhängige Effekte vermitteln.

Eine negative regulatorische Funktion von LGP2 auf RIG-I-induzierte Immunaktivitäten ist in der Fachliteratur am gängigsten verbreitet<sup>[36]</sup>. In dieser Arbeit lag allerdings bei LGP2-Defizienz eine Verminderung der Immunantwort nach Stimulation mit RIG-I-spezifischen Liganden (Triphosphat-RNA) und Viren (VSV und SeV) vor. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit Infektionsexperimenten mit SeV und VSV in einem LGP2-defizienten Mausmodell von Satoh et al., in dem LGP2 eine nicht essenzielle, aber adjuvante Rolle für die Immunantwort ausübte<sup>[84]</sup>. Zudem sind sie kongruent zu unveröffentlichten Daten von Maximilian Gradel unserer Arbeitsgruppe, der eine kumulativ verminderte Immunantwort nach Infektion mit VSV und SeV in durch siRNA generierter, transient LGP2-defizienter HEK293T-Zelllinien zeigte. Diese zu früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, insbesondere von Rothenfuß et al.<sup>[36]</sup> und der Dissertationsarbeit von Johannes Helmuth<sup>[168]</sup>, vermeintlich widersprüchlichen Ergebnisse lassen sich durch mögliche Auswirkungen des Konzentrationsverhältnisses zwischen LGP2 zu RIG-I erklären. Die beschriebenen inhibitorischen Funktionen von LGP2 in der Erkennung von Triphosphat-RNA durch RIG-I<sup>[168]</sup> oder in der TLR-unabhängigen IFN- $\beta$ -Induktion nach Infektion mit SeV und Newcastle Disease Virus (NDV)<sup>[36]</sup> basierten auf einer Überexpression von LGP2 in LGP2-kompetenten Zellen. Eine mögliche konzentrationsabhängige Rolle von LGP2 im RIG-I-Signalweg durch PAMP-Sequestrierung bei LGP2-Überexpression<sup>[77]</sup>, analog zur Rolle von LGP2 im MDA5-Signalweg, könnte die hier vorliegenden Ergebnisse mit denen der Fachliteratur in Einklang bringen. Zudem weisen neue Erkenntnisse von Quicke et al. auf RNA-unabhängige Effekte von LGP2 auf RIG-I hin. Die Hemmung der RIG-I-Ubiquitylierung durch die Interaktion von LGP2 mit TRIM25 führt zur Destabilisierung der aktiven RIG-I-Konformation und folglich reduzierter Immunaktivität nach Stimulation des RIG-I-Signalweges<sup>[81]</sup>. Neue Ergebnisse von Parisien et al. weisen eine erhöhte IFN- $\beta$ -Expression in LGP2-defizienten HEK293-Zellen 24 Stunden nach Infektion mit SeV auf<sup>[82]</sup>. Diese Ergebnisse sind widersprüchlich zu den in dieser Arbeit vorliegenden Daten und konnten aufgrund des fehlenden Erfolgs bei der Generierung von LGP2-defizienten HEK293T-Zellen nicht überprüft werden.

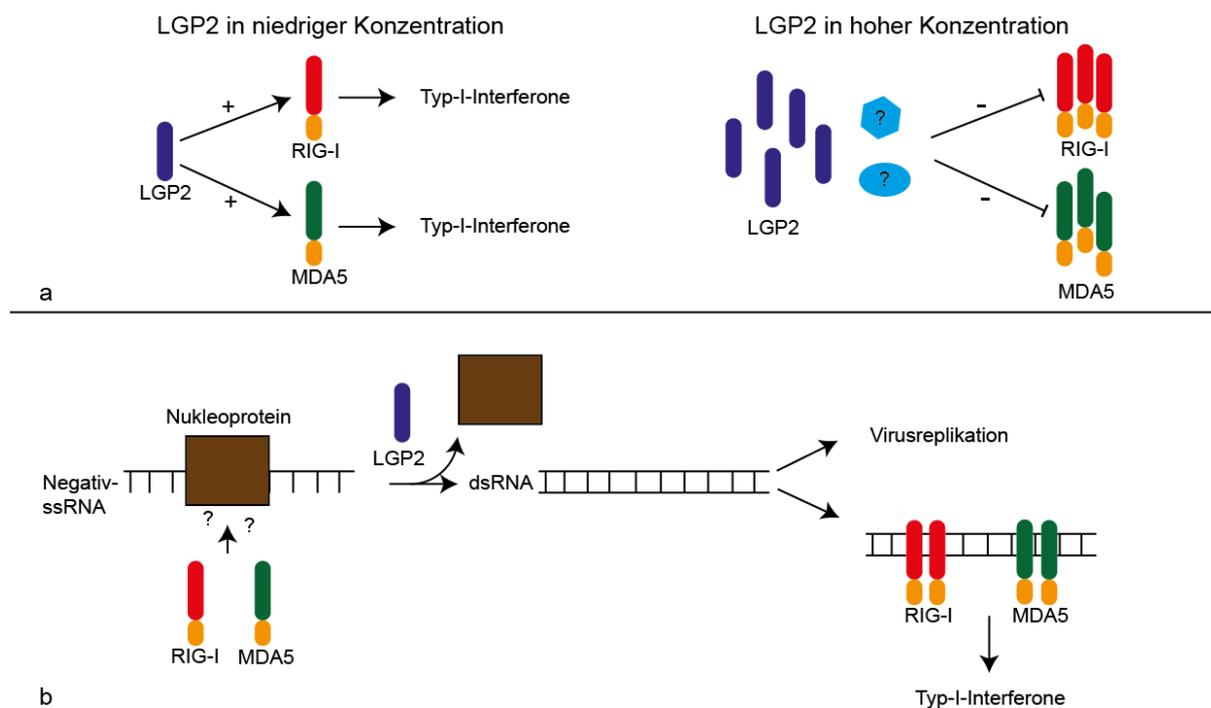
Trotz verminderter Immunaktivität nach Infektion mit der VSV-M51R-Mutante wiesen die LGP2-defizienten Klone überraschenderweise eine verminderte Virusreplikation, sowohl für die VSV-M51R-Mutante als auch nach VSV-WT-Infektion, auf. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit publizierten Daten eines LGP2-defizienten Mausmodells von Venkataraman et al., die eine vermehrte Resistenz der LGP2-defizienten Mauszellen nach Infektion mit VSV zeigten<sup>[87]</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte ein gesteigerter Zelltod nach VSV-Infektion als mögliche Ursache der reduzierten Virusreplikation in LGP2-defizienten Klonen ausgeschlossen werden. Als eine von vielen möglichen Erklärungen der reduzierten Viruslast in LGP2-defizienten Zellen ist eine direkte Interaktion von LGP2 mit Proteinen innerhalb des VSV-RNP möglich. Ähnliche Effektorfunktionen über Sensorfunktionen hinaus sind für RIG-I und MDA5 beschrieben<sup>[169]</sup>, beispielsweise eine RIG-I-Interaktion mit Nukleokapsiden für das Influenzavirus<sup>[170]</sup> und das Hepatitis-B-Virus<sup>[171]</sup>. Besonders beruhten diese Überlegungen auf den Ergebnissen von Yao et al., die eine Interaktion zwischen RIG-I und MDA5 mit dsRNA-gebundenen viralen Proteinen zeigten, wodurch die Virusreplikation gehemmt wurde<sup>[137]</sup>. Hier konnte gezeigt werden, dass virale Proteine (NS1 und E3L) durch PAMP-Sequestrierung den Verdau der viralen RNA durch PKR unterdrücken. Die hierdurch hervorgerufene PKR-Inhibition konnte durch

Verschiebung der Virusproteine durch RIG-I und MDA5 verhindert werden <sup>[137]</sup>. Dabei war auch für CARD-deletiertes-RIG-I/MDA5 eine Interaktion mit viralen Proteinen nachweisbar, die zur Verschiebung der Proteine auf viraler dsRNA führte. Aufgrund der Strukturhomologie zwischen den CARD-deletierten RIG-I/MDA5 Proteinen und LGP2 bestand die Vermutung, dass diese und weitere Ergebnisse von Yao et al. auch auf LGP2 zutreffen <sup>[137]</sup>. Zum Beispiel konnte eine ATP-abhängige Suppression viraler Replikation durch CARD-deletiertes RIG-I/MDA5 auf bestimmte RNA-Viren (Sindbis, Gelbfieber, Coxsackie B, Sendai, Influenza A und Parainfluenza 3 Viren) nachgewiesen werden <sup>[137]</sup>, ähnlich der in dieser Arbeit verminderten VSV-Virusreplikation in LGP2-defizienten Klonen. Zusätzlich wies die Ko-Expression von Vollängen-MDA5 und CARD-deletiertem RIG-I in Anwesenheit von Protein-besetzter dsRNA eine Steigerung der Signalaktivität von MDA5 auf, wodurch eine Kooperation zwischen MDA5 und CARD-deletierten RIG-I durch Umstrukturierung von RNP naheliegend erscheint. Diese Ergebnisse konnten erstmalig eindeutige Interaktionen zwischen RLR- und RNP-Proteinen, sowie Virus-Evasionsmechanismen durch dsRNA-Sequestrierung mit Hilfe von Nukleoproteinen nachweisen. Bemühungen unserer Arbeitsgruppe die Ergebnisse von Yao et al. zu CARD-deletiertem RIG-I/MDA5 für LGP2 zu reproduzieren blieben aber bisher erfolglos und eine solche Interaktion zwischen LGP2 und VSV-RNP konnte auch in dieser Arbeit mittels EMSA nicht nachgewiesen werden, unter Vorbehalt der methodischen Einschränkungen, die der notwendige SDS-Verdau der RNP vor Inkubation mit rekombinantem LGP2 mit sich bringt. Der Mechanismus, über den LGP2 in die Replikation von VSV eingreift, bleibt somit weiterhin ungeklärt.

In Zusammenschau der Fachliteratur und der vorliegenden Ergebnisse wird folgendes hypothetisches Modell für LGP2 formuliert: Meiner Ansicht nach lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit in das konzentrationsabhängige Modell von Bruns & Horvath <sup>[30]</sup> eingliedern (*Abbildung 19a*). Demnach besitzt LGP2 in basaler Konzentration eine adjuvante Funktion auf die RLR-Signalwege <sup>[49]</sup>. Nach Aktivierung einer antiviralen Immunantwort mit Produktion von Typ-I-Interferonen akkumuliert LGP2 als ISG intrazellulär. In höherer Konzentration wirkt LGP2 inhibitorisch auf die RLR-Signalwege, beispielsweise durch PAMP-Sequestrierung <sup>[30,77]</sup>. Diese inhibitorische Funktion kann als Kontrollmechanismus für RIG-I und MDA5 fungieren, um eine überschießende Immunantwort zu vermeiden <sup>[84,172]</sup>. Eine mögliche Erklärung der *upstream* Effekte von LGP2, neben den beschriebenen Effekten auf die Fibrillenbildung von RLR, bietet für Negativstrang-Viren (wie SeV und VSV) die Interaktion und Umstrukturierung der viralen RNP (*Abbildung 19b*). Durch Freilegung viraler RNA innerhalb der RNP mithilfe von LGP2 und anschließender Bildung von dsRNA während der Virusreplikation wäre eine Erkennung durch RIG-I oder MDA5 erleichtert. Dies bietet eine Erklärung für die beobachtete adjuvante Funktion von LGP2 auf beide RLR-Signalwege. Des Weiteren könnte dieses Modell die vorliegenden Ergebnisse zur Abhängigkeit der VSV-Replikation von der LGP2-Expression erklären, indem eine LGP2-abhängige RNP-Umstrukturierung die Virusreplikation zulässt. Ähnliche Funktionen von Helikasen zur Umstrukturierung von RNP sind bekannt <sup>[48]</sup>. Fullam & Schroder berichteten ebenfalls über die Abhängigkeit der viralen Replikation von Wirt-DEXD/H-box-Helikasen, welche von Viren aktiv zur Umstrukturierung ihres Genoms rekrutiert werden <sup>[173]</sup>. Über eine solche Effektorfunktion von LGP2 wurde bereits von Moresco & Beutler <sup>[174]</sup> und Satoh et al. als mögliche *upstream* regulatorische Funktion von LGP2 spekuliert <sup>[84]</sup>. Allerdings scheint LGP2 vor allem in der Frühphase einer Virusinfektion, wenn noch wenig Virus-RNA vorhanden ist und die RLR in basaler Konzentration vorliegen, positiv

regulierende Funktionen auszuüben, während zu späteren Zeitpunkten durch Akkumulation von LGP2 und Verschiebung des Verhältnisses zwischen RIG-I/MDA5 und LGP2 vorwiegend inhibitorische Funktionen auftreten [77].

Die hier vorliegenden Daten zeigen eine positiv modulierende, aber nicht essenzielle Rolle von LGP2 im RLR-Signalweg auf Höhe oder oberhalb von RIG-I und MDA5. Die Verwendung eines *loss of function* Modells mit durch CRISPR/Cas9 Geneditierung hergestellten LGP2-defizienten Klonen der humanen Zelllinie 1205lu kann allerdings nur die Auswirkung von fehlendem LGP2 aufzeigen. Eine Rekonstitution der verwendeten LGP2-defizienten Zellen, beispielsweise durch eine stabile lentivirale Transfektion, wurde nicht durchgeführt. Die vermutete konzentrationsabhängige Wirkung von LGP2 und die Bedeutung des Verhältnisses zwischen LGP2 und RIG-I/MDA5 zu verschiedenen Zeitpunkten einer Virusinfektion limitieren allerdings die Aussagekraft von Rekonstitutionsversuchen. Dies mag ursächlich für die mehrfach genannten Diskrepanzen zwischen bisherigen LGP2-defizienten- und LGP2-Überexpressionsmodellen sein. Die vorliegende Arbeit trägt aber hoffentlich einen Beitrag zur Klärung der biologischen Funktion des mysteriösen Immunrezeptors LGP2 bei.



**Abbildung 19: Erweitertes hypothetisches Modell für LGP2 nach Bruns & Horvath**

a) Während der Frühphase einer Virusinfektion liegt LGP2 in basaler Konzentration vor und besitzt in diesem Verhältnis zu RIG-I und MDA5 positive Einflüsse auf deren Signalwege. In späteren Phasen einer Virusinfektion kommt es durch die Interferonexpression zur Akkumulation von LGP2 als ISG. Hierdurch verschiebt sich das Verhältnis zwischen LGP2 und RIG-I/MDA5 und führt zu negativen Einflüssen auf deren Funktion, beispielsweise durch PAMP-Sequestrierung oder durch Interaktionen zwischen LGP2 und weiteren Proteinen (Blaue Formen mit Fragezeichen). Dies mag zur Kontrolle einer überschießenden Immunantwort dienen.

b) In diesem hypothetischen Modell bindet LGP2 an Nukleoproteinen des viralen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes. Die Umstrukturierung der RNP ermöglicht die Virusreplikation der Negativstrang-ssRNA-Viren unter Bildung von dsRNA. Hierdurch ermöglicht LGP2 eine optimale Viruserkennung durch RIG-I und MDA5 in der Frühphase einer Virusinfektion. Allerdings ermöglicht die RNP-Umstrukturierung ebenfalls eine effizientere Virusreplikation. (Modifiziert nach Bruns & Horvath [30])

## 6. Zusammenfassung

Die RIG-I-*like* Rezeptoren (RLR) bilden eine Gruppe zytosolischer Mustererkennungsrezeptoren, die in der angeborenen antiviralen Immunabwehr nach Erkennung viraler doppelsträngiger RNA, eine Signalkaskade auslösen und zur Aktivierung eines antiviralen Genprogramms führen. Hierzu interagieren die aktivierten RLR Rezeptoren RIG-I und MDA5 mithilfe der CARD-Domänen mit dem Adaptermolekül MAVS und führen unter anderem zur Expression von Typ-I-Interferonen. Die Rolle des dritten Rezeptors der RLR-Gruppe, LGP2, ist noch ungeklärt. Durch das Fehlen einer CARD-Domänen kann LGP2 nicht selbstständig eine Signalkaskade auslösen. Im RIG-I-Signalweg werden in der Fachliteratur weitestgehend negative Einflüsse von LGP2 beschrieben, während eine dichotome Rolle im MDA5-Signalweg mit positiver Modulation in basaler Konzentration und inhibitorischer Funktion in gesteigerter Konzentration beschrieben ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Klärung der Rolle von LGP2 im RLR-Signalweg mithilfe der CRISPR/Cas9 Geneditierung drei LGP2-defiziente Klone der 1205lu Melanomzelllinie generiert, über das Fehlen einer LGP2-Proteinexpression und den Nachweis bialleler *frameshift* Mutationen validiert und anschließend in Stimulations- und Infektionsversuchen untersucht.

Zunächst konnte durch Stimulation der Zellklone auf unterschiedlichen Ebenen im RLR-Signalweg eine Rolle von LGP2 auf oder oberhalb von RIG-I- und MDA5 gezeigt werden. Die positive Interferon-*feedback*-Schleife war durch das Fehlen von LGP2 nicht beeinflusst. Die LGP2-Defizienz führte zu einer reduzierten Immunaktivität nach Stimulation mit den synthetischen RLR-Liganden Triphosphat-RNA und HMW poly(I:C) und zu reduzierter Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit SeV, VSV-M51R und Mengovirus-C19A/C22A. Somit weist das vorliegende *loss of function* Modell eine modulierende, allerdings nicht essenzielle Rolle von LGP2 in den Signalwegen von RIG-I und MDA5 auf. Das Fehlen von LGP2 führte unerwarteterweise zu einer verminderten Virusreplikation von VSV in 1205lu Zellen, wobei gezeigt werden konnte, dass dies nicht auf erhöhten Zelltod der LGP2-defizienten Klone beruhte. Eine Interaktion zwischen LGP2 und VSV-Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP) als möglicher Mechanismus einer Rolle von LGP2 konnte durch EMSA nicht gezeigt werden.

Diese Ergebnisse lassen sich in ein hypothetisches konzentrationsabhängiges Modell für LGP2 einordnen. In unstimulierter basaler Konzentration übernimmt LGP2 eine positive Rolle in den Signalwegen von RIG-I und MDA5. In höherer Konzentration wirkt LGP2 inhibitorisch auf RIG-I und MDA5, zum Beispiel durch PAMP-Sequestrierung. Insbesondere scheinen der Zeitpunkt während einer Virusinfektion und das Verhältnis von LGP2 und RIG-I/MDA5 die Rolle von LGP2 zu beeinflussen und dessen dichotome Wirkung zu erklären.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Peter, H., Pichler, W. J., Müller-Ladner, U., *Klinische Immunologie (3. Auflage)*. 2012, Munich: Urban & Fischer.
2. Murphy, K. and Weaver, C., *Janeway Immunologie*. 9. Auflage ed. 2018: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
3. Medzhitov, R. and Janeway, C.A., *Innate Immunity: The Virtues of a Nonclonal System of Recognition*. *Cell*, 1997. **91**(3): p. 295-298.
4. Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O., *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
5. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
6. Rink, L., Kruse, A., Haase, H., *Immunologie für Einsteiger*. 2015: Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
7. Medzhitov, R. and Janeway, C.A., *Innate immunity: impact on the adaptive immune response*. *Current Opinion in Immunology*, 1997. **9**(1): p. 4-9.
8. Burnet, F.M., *A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection*. *CA Cancer J Clin*, 1976. **26**(2): p. 119-21.
9. Medzhitov, R. and Janeway Jr, C.A., *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses*. *Seminars in Immunology*, 1998. **10**(5): p. 351-353.
10. Iwasaki, A. and Medzhitov, R., *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. *Science*, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
11. Modrow S., F.D., Truyen U., Schätzl H., *Molecular Virology*. 2013, Springer, Berlin, Heidelberg.
12. Suerbaum S., B.G.-D., Kaufmann S., Schulz T., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2016: Springer, Berlin, Heidelberg.
13. Tsai, B., *Penetration of nonenveloped viruses into the cytoplasm*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2007. **23**: p. 23-43.
14. Alcami, A. and Koszinowski, U.H., *Viral mechanisms of immune evasion*. *Immunology Today*, 2000. **21**(9): p. 447-455.
15. Ma, D.Y. and Suthar, M.S., *Mechanisms of innate immune evasion in re-emerging RNA viruses*. *Curr Opin Virol*, 2015. **12**: p. 26-37.
16. Findlay, G.M. and MacCallum, F.O., *An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses*. *The Journal of Pathology and Bacteriology*, 1937. **44**(2): p. 405-424.
17. Isaacs, A. and Lindenmann, J., *Virus interference. I. The interferon*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1957. **147**(927): p. 258-67.
18. Schoggins, J.W. and Rice, C.M., *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. *Current opinion in virology*, 2011. **1**(6): p. 519-525.
19. Negishi, H., Taniguchi, T., and Yanai, H., *The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018. **10**(11).
20. Michalska, A., Blaszczyk, K., Wesoly, J., and Bluysen, H.A.R., *A Positive Feedback Amplifier Circuit That Regulates Interferon (IFN)-Stimulated Gene Expression and Controls Type I and Type II IFN Responses*. *Frontiers in Immunology*, 2018. **9**(1135).
21. Ivashkiv, L.B. and Donlin, L.T., *Regulation of type I interferon responses*. *Nature reviews. Immunology*, 2014. **14**(1): p. 36-49.
22. Schneider, W.M., Chevillotte, M.D., and Rice, C.M., *Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses*. *Annual review of immunology*, 2014. **32**: p. 513-545.
23. Honda, K., Yanai, H., Takaoka, A., and Taniguchi, T., *Regulation of the type I IFN induction: a current view*. *International Immunology*, 2005. **17**(11): p. 1367-1378.
24. Ma, F., Li, B., Yu, Y., Iyer, S.S., Sun, M., and Cheng, G., *Positive feedback regulation of type I interferon by the interferon-stimulated gene STING*. *EMBO reports*, 2015. **16**(2): p. 202-212.
25. Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., and Tanaka, N., *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7*. *FEBS Letters*, 1998. **441**(1): p. 106-110.
26. Sato, M., Suemori, H., Hata, N., Asagiri, M., Ogasawara, K., Nakao, K., Nakaya, T., Katsuki, M., Noguchi, S., Tanaka, N., and Taniguchi, T., *Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction*. *Immunity*, 2000. **13**(4): p. 539-48.

27. Marié, I., Durbin, J.E., and Levy, D.E., *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. *Embo j*, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
28. Jacobs, B.L. and Langland, J.O., *When Two Strands Are Better Than One: The Mediators and Modulators of the Cellular Responses to Double-Stranded RNA*. *Virology*, 1996. **219**(2): p. 339-349.
29. Brubaker, S.W., Bonham, K.S., Zanoni, I., and Kagan, J.C., *Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective*. *Annu Rev Immunol*, 2015. **33**: p. 257-90.
30. Bruns, A.M. and Horvath, C.M., *Activation of RIG-I-like receptor signal transduction*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2012. **47**(2): p. 194-206.
31. Takeuchi, O. and Akira, S., *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell*, 2010. **140**(6): p. 805-20.
32. Takeda, K. and Akira, S., *Toll-like receptors in innate immunity*. *Int Immunol*, 2005. **17**(1): p. 1-14.
33. Greulich, W., Wagner, M., Gaidt, M.M., Stafford, C., Cheng, Y., Linder, A., Carell, T., and Hornung, V., *TLR8 Is a Sensor of RNase T2 Degradation Products*. *Cell*, 2019. **179**(6): p. 1264-1275.e13.
34. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis e Sousa, C., *Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA*. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1529-1531.
35. Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3*. *Nature*, 2001. **413**(6857): p. 732-738.
36. Rothenfusser, S., Goutagny, N., DiPerna, G., Gong, M., Monks, B.G., Schoenemeyer, A., Yamamoto, M., Akira, S., and Fitzgerald, K.A., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-1*. *J Immunol*, 2005. **175**(8): p. 5260-8.
37. Liu, L., Botos, I., Wang, Y., Leonard, J.N., Shiloach, J., Segal, D.M., and Davies, D.R., *Structural Basis of Toll-Like Receptor 3 Signaling with Double-Stranded RNA*. *Science*, 2008. **320**(5874): p. 379-381.
38. Diebold, S.S., Montoya, M., Unger, H., Alexopoulou, L., Roy, P., Haswell, L.E., Al-Shamkhani, A., Flavell, R., Borrow, P., and Reis e Sousa, C., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. *Nature*, 2003. **424**(6946): p. 324-8.
39. López, C.B., Moltedo, B., Alexopoulou, L., Bonifaz, L., Flavell, R.A., and Moran, T.M., *TLR-Independent Induction of Dendritic Cell Maturation and Adaptive Immunity by Negative-Strand RNA Viruses*. *The Journal of Immunology*, 2004. **173**(11): p. 6882-6889.
40. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S., and Fujita, T., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses*. *Nat Immunol*, 2004. **5**(7): p. 730-737.
41. Y.W., S., *RIG-I, a human homolog gene of RNA helicase, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell, in Shanghai Institute of Hematology, Rui-Jin Hospital*. 1997, Shanghai Second Medical University.
42. Cui, Y., Li, M., Walton, K.D., Sun, K., Hanover, J.A., Furth, P.A., and Hennighausen, L., *The Stat3/5 locus encodes novel endoplasmic reticulum and helicase-like proteins that are preferentially expressed in normal and neoplastic mammary tissue*. *Genomics*, 2001. **78**(3): p. 129-34.
43. Kang, D.C., Gopalkrishnan, R.V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A.M., and Fisher, P.B., *mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(2): p. 637-42.
44. Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.M., Gale, M., Jr., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., and Fujita, T., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity*. *J Immunol*, 2005. **175**(5): p. 2851-8.
45. Berke, I.C., Li, Y., and Modis, Y., *Structural basis of innate immune recognition of viral RNA*. *Cell Microbiol*, 2013. **15**(3): p. 386-94.
46. Bruns, A.M. and Horvath, C.M., *Antiviral RNA recognition and assembly by RLR family innate immune sensors*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014. **25**(5): p. 507-12.

47. Saito, T., Hirai, R., Loo, Y.M., Owen, D., Johnson, C.L., Sinha, S.C., Akira, S., Fujita, T., and Gale, M., Jr., *Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(2): p. 582-7.
48. Pyle, A.M., *Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases*. Annu Rev Biophys, 2008. **37**: p. 317-36.
49. Rodriguez, K.R., Bruns, A.M., and Horvath, C.M., *MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction*. J Virol, 2014. **88**(15): p. 8194-200.
50. Brisse, M. and Ly, H., *Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like Receptors: RIG-I and MDA5*. Frontiers in immunology, 2019. **10**: p. 1586-1586.
51. Loo, Y.M. and Gale, M., Jr., *Immune signaling by RIG-I-like receptors*. Immunity, 2011. **34**(5): p. 680-92.
52. Goubau, D., Deddouche, S., and Reis e Sousa, C., *Cytosolic sensing of viruses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 855-69.
53. McWhirter, S.M., Tenover, B.R., and Maniatis, T., *Connecting mitochondria and innate immunity*. Cell, 2005. **122**(5): p. 645-7.
54. Hou, F., Sun, L., Zheng, H., Skaug, B., Jiang, Q.X., and Chen, Z.J., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
55. Schlee, M., Roth, A., Hornung, V., Hagmann, C.A., Wimmenauer, V., Barchet, W., Coch, C., Janke, M., Mihailovic, A., Wardle, G., Juranek, S., Kato, H., Kawai, T., Poeck, H., Fitzgerald, K.A., Takeuchi, O., Akira, S., Tuschl, T., Latz, E., Ludwig, J., and Hartmann, G., *Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus*. Immunity, 2009. **31**(1): p. 25-34.
56. Goubau, D., Schlee, M., Deddouche, S., Pruijssers, A.J., Zillinger, T., Goldeck, M., Schuberth, C., Van der Veen, A.G., Fujimura, T., Rehwinkel, J., Iskarpatyoti, J.A., Barchet, W., Ludwig, J., Dermody, T.S., Hartmann, G., and Reis e Sousa, C., *Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates*. Nature, 2014. **514**(7522): p. 372-375.
57. Hornung, V., Ellegast, J., Kim, S., Brzozka, K., Jung, A., Kato, H., Poeck, H., Akira, S., Conzelmann, K.K., Schlee, M., Endres, S., and Hartmann, G., *5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I*. Science, 2006. **314**(5801): p. 994-7.
58. Schmidt, A., Schwerd, T., Hamm, W., Hellmuth, J.C., Cui, S., Wenzel, M., Hoffmann, F.S., Michallet, M.C., Besch, R., Hopfner, K.P., Endres, S., and Rothenfusser, S., *5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(29): p. 12067-72.
59. Kato, H., Takeuchi, O., Mikamo-Satoh, E., Hirai, R., Kawai, T., Matsushita, K., Hiiragi, A., Dermody, T.S., Fujita, T., and Akira, S., *Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-1 and melanoma differentiation-associated gene 5*. J Exp Med, 2008. **205**(7): p. 1601-10.
60. Weber, M., Gawanbacht, A., Habjan, M., Rang, A., Borner, C., Schmidt, A.M., Veitinger, S., Jacob, R., Devignot, S., Kochs, G., Garcia-Sastre, A., and Weber, F., *Incoming RNA virus nucleocapsids containing a 5'-triphosphorylated genome activate RIG-I and antiviral signaling*. Cell Host Microbe, 2013. **13**(3): p. 336-46.
61. Kowalinski, E., Lunardi, T., McCarthy, A.A., Louber, J., Brunel, J., Grigorov, B., Gerlier, D., and Cusack, S., *Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 423-35.
62. Myong, S., Cui, S., Cornish, P.V., Kirchhofer, A., Gack, M.U., Jung, J.U., Hopfner, K.P., and Ha, T., *Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA*. Science, 2009. **323**(5917): p. 1070-4.
63. Peisley, A., Wu, B., Yao, H., Walz, T., and Hur, S., *RIG-I forms signaling-competent filaments in an ATP-dependent, ubiquitin-independent manner*. Mol Cell, 2013. **51**(5): p. 573-83.
64. Jiang, X., Kinch, L.N., Brautigam, C.A., Chen, X., Du, F., Grishin, N.V., and Chen, Z.J., *Ubiquitin-induced oligomerization of the RNA sensors RIG-I and MDA5 activates antiviral innate immune response*. Immunity, 2012. **36**(6): p. 959-73.
65. Feng, Q., Hato, S.V., Langereis, M.A., Zoll, J., Virgen-Slane, R., Peisley, A., Hur, S., Semler, B.L., van Rij, R.P., and van Kuppeveld, F.J., *MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells*. Cell Rep, 2012. **2**(5): p. 1187-96.
66. Triantafilou, K., Vakakis, E., Kar, S., Richer, E., Evans, G.L., and Triantafilou, M., *Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 20): p. 4761-9.

67. Berke, I.C., Yu, X., Modis, Y., and Egelman, E.H., *MDA5 assembles into a polar helical filament on dsRNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(45): p. 18437-41.
68. Berke, I.C. and Modis, Y., *MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA*. EMBO J, 2012. **31**(7): p. 1714-26.
69. Peisley, A., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Liu, M., Walz, T., and Hur, S., *Cooperative assembly and dynamic disassembly of MDA5 filaments for viral dsRNA recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(52): p. 21010-5.
70. Takahashi, K., Kumeta, H., Tsuduki, N., Narita, R., Shigemoto, T., Hirai, R., Yoneyama, M., Horiuchi, M., Ogura, K., Fujita, T., and Inagaki, F., *Solution structures of cytosolic RNA sensor MDA5 and LGP2 C-terminal domains: identification of the RNA recognition loop in RIG-I-like receptors*. J Biol Chem, 2009. **284**(26): p. 17465-74.
71. Peisley, A., Jo, M.H., Lin, C., Wu, B., Orme-Johnson, M., Walz, T., Hohng, S., and Hur, S., *Kinetic mechanism for viral dsRNA length discrimination by MDA5 filaments*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(49): p. E3340-9.
72. Andrejeva, J., Childs, K.S., Young, D.F., Carlos, T.S., Stock, N., Goodbourn, S., and Randall, R.E., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
73. Bamming, D. and Horvath, C.M., *Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2*. J Biol Chem, 2009. **284**(15): p. 9700-12.
74. Funabiki, M., Kato, H., Miyachi, Y., Toki, H., Motegi, H., Inoue, M., Minowa, O., Yoshida, A., Deguchi, K., Sato, H., Ito, S., Shiroishi, T., Takeyasu, K., Noda, T., and Fujita, T., *Autoimmune Disorders Associated with Gain of Function of the Intracellular Sensor MDA5*. Immunity. **40**(2): p. 199-212.
75. Miner, J.J. and Diamond, M.S., *MDA5 and autoimmune disease*. Nat Genet, 2014. **46**(5): p. 418-9.
76. Komuro, A. and Horvath, C.M., *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12332-42.
77. Pippig, D.A., Hellmuth, J.C., Cui, S., Kirchofer, A., Lammens, K., Lammens, A., Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K.P., *The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(6): p. 2014-25.
78. Li, X., Ranjith-Kumar, C.T., Brooks, M.T., Dharmaiyah, S., Herr, A.B., Kao, C., and Li, P., *The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA*. J Biol Chem, 2009. **284**(20): p. 13881-91.
79. Bruns, A.M., Leser, G.P., Lamb, R.A., and Horvath, C.M., *The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly*. Mol Cell, 2014. **55**(5): p. 771-81.
80. Zhu, Z., Zhang, X., Wang, G., and Zheng, H., *The laboratory of genetics and physiology 2: emerging insights into the controversial functions of this RIG-I-like receptor*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 960190.
81. Quicke, K.M., Kim, K.Y., Horvath, C.M., and Suthar, M.S., *RNA Helicase LGP2 Negatively Regulates RIG-I Signaling by Preventing TRIM25-Mediated Caspase Activation and Recruitment Domain Ubiquitination*. Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 2019. **39**(11): p. 669-683.
82. Parisien, J.-P., Lenoir, J.J., Mandhana, R., Rodriguez, K.R., Qian, K., Bruns, A.M., and Horvath, C.M., *RNA sensor LGP2 inhibits TRAF ubiquitin ligase to negatively regulate innate immune signaling*. EMBO reports, 2018. **19**(6): p. e45176.
83. Childs, K.S., Randall, R.E., and Goodbourn, S., *LGP2 plays a critical role in sensitizing mda-5 to activation by double-stranded RNA*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e64202.
84. Satoh, T., Kato, H., Kumagai, Y., Yoneyama, M., Sato, S., Matsushita, K., Tsujimura, T., Fujita, T., Akira, S., and Takeuchi, O., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
85. Parisien, J.P., Bamming, D., Komuro, A., Ramachandran, A., Rodriguez, J.J., Barber, G., Wojahn, R.D., and Horvath, C.M., *A shared interface mediates paramyxovirus interference with antiviral RNA helicases MDA5 and LGP2*. J Virol, 2009. **83**(14): p. 7252-60.
86. Rodriguez, K.R. and Horvath, C.M., *Paramyxovirus V protein interaction with the antiviral sensor LGP2 disrupts MDA5 signaling enhancement but is not relevant to LGP2-mediated RLR signaling inhibition*. J Virol, 2014. **88**(14): p. 8180-8.

87. Venkataraman, T., Valdes, M., Elsby, R., Kakuta, S., Caceres, G., Saijo, S., Iwakura, Y., and Barber, G.N., *Loss of DExDH Box RNA Helicase LGP2 Manifests Disparate Antiviral Responses*. J Immunol, 2007(178): p. 6444-6455.
88. Suthar, M.S., Ramos, H.J., Brassil, M.M., Netland, J., Chappell, C.P., Blahnik, G., McMillan, A., Diamond, M.S., Clark, E.A., Bevan, M.J., and Gale, M., Jr., *The RIG-I-like receptor LGP2 controls CD8(+) T cell survival and fitness*. Immunity, 2012. **37**(2): p. 235-48.
89. Widau, R.C., Parekh, A.D., Ranck, M.C., Golden, D.W., Kumar, K.A., Sood, R.F., Pitroda, S.P., Liao, Z., Huang, X., Darga, T.E., Xu, D., Huang, L., Andrade, J., Roizman, B., Weichselbaum, R.R., and Khodarev, N.N., *RIG-I-like receptor LGP2 protects tumor cells from ionizing radiation*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014. **111**(4): p. E484-E491.
90. Liu, Y., Qu, L., Liu, Y., Roizman, B., and Zhou, G.G., *PUM1 is a biphasic negative regulator of innate immunity genes by suppressing LGP2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(33): p. E6902-e6911.
91. Narita, R., Takahashi, K., Murakami, E., Hirano, E., Yamamoto, S.P., Yoneyama, M., Kato, H., and Fujita, T., *A novel function of human Pumilio proteins in cytoplasmic sensing of viral infection*. PLoS Pathog, 2014. **10**(10): p. e1004417.
92. van der Veen, A.G., Maillard, P.V., Schmidt, J.M., Lee, S.A., Deddouche-Grass, S., Borg, A., Kjær, S., Snijders, A.P., and Reis e Sousa, C., *The RIG-I-like receptor LGP2 inhibits Dicer-dependent processing of long double-stranded RNA and blocks RNA interference in mammalian cells*. Embo j, 2018. **37**(4).
93. Takahashi, T., Nakano, Y., Onomoto, K., Yoneyama, M., and Ui-Tei, K., *LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection*. Nucleic acids research, 2020. **48**(3): p. 1494-1507.
94. Schmidt, A., Rothenfusser, S., and Hopfner, K.P., *Sensing of viral nucleic acids by RIG-I: from translocation to translation*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(1): p. 78-85.
95. Ebert, O., Shinozaki, K., Kournioti, C., Park, M.S., García-Sastre, A., and Woo, S.L., *Syncytia induction enhances the oncolytic potential of vesicular stomatitis virus in virotherapy for cancer*. Cancer Res, 2004. **64**(9): p. 3265-70.
96. Ebert, O., Shinozaki, K., Huang, T.G., Savontaus, M.J., García-Sastre, A., and Woo, S.L., *Oncolytic vesicular stomatitis virus for treatment of orthotopic hepatocellular carcinoma in immune-competent rats*. Cancer Res, 2003. **63**(13): p. 3605-11.
97. Gstraunthaler, G. and Lindl, T., *Zell- und Gewebekultur: Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*. Vol. 7. Auflage. 2013: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
98. Hierholzer, J.C. and Killington, R.A., *2 - Virus isolation and quantitation A2 - Mahy, Brian WJ*, in *Virology Methods Manual*, H.O. Kangro, Editor. 1996, Academic Press: London. p. 25-46.
99. Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J., *Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes*. Science, 2008. **321**(5891): p. 960-4.
100. Horvath, P. and Barrangou, R., *CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea*. Science, 2010. **327**(5962): p. 167-70.
101. Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A., *RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea*. Nature, 2012. **482**(7385): p. 331-8.
102. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A., *Nucleotide Sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in E.coli and identification of the gene product*. J. Bacteriol. , 1987. **169**(12): p. 5429-5433.
103. Jansen, R., Gaastra, W., van Embden, J.D.A., and Schouls, L.M., *Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes*. Mol Microbiol., 2002. **43**(6): p. 1565–1575.
104. Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., Soria, E., and Juez, G., *Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria*. Mol Microbiol., 2000. **36**(1): p. 244-246.
105. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
106. Mullis, K.B., *The Unusual Origin of Polymerase Chain Reaction*. Scientific American, 1990: p. 56-65.
107. Ishino, S. and Ishino, Y., *DNA polymerases as useful reagents for biotechnology - the history of developmental research in the field*. Front Microbiol, 2014. **5**: p. 465.
108. Mülhardt, C., *Der Experimentator - Molekularbiologie Genomics*. 6. Auflage ed. 2009: © Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg.

109. Huang, M.C., Cheong, W.C., Lim, L.S., and Li, M.H., *A simple, high sensitivity mutation screening using Ampligase mediated T7 endonuclease I and Surveyor nuclease with microfluidic capillary electrophoresis*. *Electrophoresis*, 2012. **33**(5): p. 788-96.
110. Sakurai, T., Watanabe, S., Kamiyoshi, A., Sato, M., and Shindo, T., *A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice*. *BMC Biotechnol*, 2014. **14**: p. 69.
111. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
112. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
113. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J., *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(9): p. 4350-4354.
114. Burnette, W.N., *"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A*. *Anal Biochem*, 1981. **112**(2): p. 195-203.
115. Southern, E.M., *Detection of Specific Sequences Among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis*. *Journal of Molecular Biology*, 1975. **98**(3): p. 503-517.
116. Kurien, B.T. and Scofield, R.H., *Western blotting*. *Methods*, 2006. **38**(4): p. 283-93.
117. Maizel, J.V., *Acrylamide-Gel Electrophorograms by Mechanical Fractionation: Radioactive Adenovirus Proteins*. *Science*, 1966. **151**(3713): p. 988.
118. Shapiro, A.L., Vinuela, E., and Maizel, J.V., Jr., *Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967. **28**(5): p. 815-20.
119. Fried, M. and Crothers, D.M., *Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis*. *Nucleic Acids Research*, 1981. **9**(23): p. 6505-6525.
120. Revzin, A., Ceglarek, J.A., and Garner, M.M., *Comparison of nucleic acid-protein interactions in solution and in polyacrylamide gels*. *Anal Biochem*, 1986. **153**(1): p. 172-7.
121. Hellman, L.M. and Fried, M.G., *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(8): p. 1849-61.
122. de Wet, J.R., Wood, K.V., DeLuca, M., Helinski, D.R., and Subramani, S., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. *Molecular and Cellular Biology*, 1987. **7**(2): p. 725-737.
123. Gould, S.J. and Subramani, S., *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. *Analytical Biochemistry*, 1988. **175**(1): p. 5-13.
124. Millar, A.J., Short, S.R., Hiratsuka, K., Chua, N.-H., and Kay, S.A., *Firefly luciferase as a reporter of regulated gene expression in higher plants*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1992. **10**(4): p. 324-337.
125. Derveaux, S., Vandesompele, J., and Hellemans, J., *How to do successful gene expression analysis using real-time PCR*. *Methods*, 2010. **50**(4): p. 227-230.
126. Baltimore, D., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses*. *Nature*, 1970. **226**(5252): p. 1209-11.
127. Temin, H.M. and Mizutani, S., *RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus*. *Nature*, 1970. **226**(5252): p. 1211-3.
128. Spiegelman, S., Watson, K.F., and Kacian, D.L., *Synthesis of DNA Complements of Natural RNAs: A General Approach*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1971. **68**(11): p. 2843-2845.
129. Taylor, S., Wakem, M., Dijkman, G., Alsarraj, M., and Nguyen, M., *A practical approach to RT-qPCR—Publishing data that conform to the MIQE guidelines*. *Methods*, 2010. **50**(4): p. S1-S5.
130. Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., and Wolf, D.E., *Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. **85**(23): p. 8790-8794.
131. Tellmann, G. and Geulen, O., *LightCycler 480 Real-Time PCR System: Innovative Solutions for Relative Quantification*. *Biochemica*, 2006. **4**: p. 16-18.
132. Reed, L.J. and Muench, H., *A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS*. *American Journal of Epidemiology*, 1938. **27**(3): p. 493-497.
133. Lanier, L.L., *Just the FACS*. *J Immunol*, 2014. **193**(5): p. 2043-4.
134. Sweet, R.G., *High Frequency Recording with Electrostatically Deflected Ink Jets*. *Review of Scientific Instruments*, 1965. **36**(2): p. 131-136.

135. Fulwyler, M.J., *Electronic Separation of Biological Cells by Volume*. Science, 1965. **150**(3698): p. 910-911.
136. Hulett, H.R., Bonner, W.A., Barrett, J., and Herzenberg, L.A., *Cell Sorting: Automated Separation of Mammalian Cells as a Function of Intracellular Fluorescence*. Science, 1969. **166**(3906): p. 747-749.
137. Yao, H., Dittmann, M., Peisley, A., Hoffmann, H.H., Gilmore, R.H., Schmidt, T., Schmid-Burgk, J.L., Hornung, V., Rice, C.M., and Hur, S., *ATP-dependent effector-like functions of RIG-I-like receptors*. Mol Cell, 2015. **58**(3): p. 541-8.
138. Groom, J.R. and Luster, A.D., *CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions*. Immunology and cell biology, 2011. **89**(2): p. 207-215.
139. Ablasser, A., Goldeck, M., Cavlar, T., Deimling, T., Witte, G., Rohl, I., Hopfner, K.P., Ludwig, J., and Hornung, V., *cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING*. Nature, 2013. **498**(7454): p. 380-4.
140. Cai, X., Chiu, Y.-H., and Chen, Zhijian J., *The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling*. Molecular Cell, 2014. **54**(2): p. 289-296.
141. Xiao, T.S. and Fitzgerald, Katherine A., *The cGAS-STING Pathway for DNA Sensing*. Molecular Cell, 2013. **51**(2): p. 135-139.
142. Goubau, D., Deddouche, S., and Reis e Sousa, C., *RLR-Ligands Overview*. Immunity, 2013. **38**.
143. Motz, C., Schuhmann, K.M., Kirchofer, A., Moldt, M., Witte, G., Conzelmann, K.K., and Hopfner, K.P., *Paramyxovirus V proteins disrupt the fold of the RNA sensor MDA5 to inhibit antiviral signaling*. Science, 2013. **339**(6120): p. 690-3.
144. Black, B.L. and Lyles, D.S., *Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell-directed transcription of target genes in vivo*. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4058-64.
145. Ferran, M.C. and Lucas-Lenard, J.M., *The vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits transcription from the human beta interferon promoter*. J Virol, 1997. **71**(1): p. 371-7.
146. Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K.J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., and Akira, S., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. Nature, 2006. **441**(7089): p. 101-105.
147. Hato, S.V., Ricour, C., Schulte, B.M., Lanke, K.H.W., de Bruijn, M., Zoll, J., Melchers, W.J.G., Michiels, T., and van Kuppeveld, F.J.M., *The mengovirus leader protein blocks interferon- $\alpha/\beta$  gene transcription and inhibits activation of interferon regulatory factor 3*. Cellular Microbiology, 2007. **9**(12): p. 2921-2930.
148. Zoll, J., Melchers, W.J., Galama, J.M., and van Kuppeveld, F.J., *The mengovirus leader protein suppresses alpha/beta interferon production by inhibition of the iron/ferritin-mediated activation of NF-kappa B*. J Virol, 2002. **76**(19): p. 9664-72.
149. Kato, H., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Uematsu, S., Matsui, K., Tsujimura, T., Takeda, K., Fujita, T., Takeuchi, O., and Akira, S., *Cell Type-Specific Involvement of RIG-I in Antiviral Response*. Immunity, 2005. **23**(1): p. 19-28.
150. Savarino, A., Boelaert, J.R., Cassone, A., Majori, G., and Cauda, R., *Effects of chloroquine on viral infections: an old drug against today's diseases*. The Lancet Infectious Diseases, 2003. **3**(11): p. 722-727.
151. Linder, A., Bothe, V., Linder, N., Schwarzmueller, P., Dahlström, F., Bartenhagen, C., Dugas, M., Pandey, D., Thorn-Seshold, J., Boehmer, D.F.R., Koenig, L.M., Kobold, S., Schnurr, M., Raedler, J., Spielmann, G., Karimzadeh, H., Schmidt, A., Endres, S., and Rothenfusser, S., *Defective Interfering Genomes and the Full-Length Viral Genome Trigger RIG-I After Infection With Vesicular Stomatitis Virus in a Replication Dependent Manner*. Frontiers in Immunology, 2021. **12**(1302).
152. Raps, J., *Modulation der Viruserkennung durch die RNA-Helikase LGP2*, in *Dissertation, LMU München*. 2020, LMU München: Medizinische Fakultät.
153. Bamming, D. and Horvath, C.M., *Regulation of Signal Transduction by Enzymatically Inactive Antiviral RNA Helicase Proteins MDA5, RIG-I, and LGP2*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(15): p. 9700-9712.
154. Geraghty, R.J., Capes-Davis, A., Davis, J.M., Downward, J., Freshney, R.I., Knezevic, I., Lovell-Badge, R., Masters, J.R.W., Meredith, J., Stacey, G.N., Thraves, P., and Vias, M., *Guidelines for the use of cell lines in biomedical research*. British Journal of Cancer, 2014. **111**(6): p. 1021-1046.

155. Saito, S., Morita, K., Kohara, A., Masui, T., Sasao, M., Ohgushi, H., and Hirano, T., *Use of BAC array CGH for evaluation of chromosomal stability of clinically used human mesenchymal stem cells and of cancer cell lines*. Hum Cell, 2011. **24**(1): p. 2-8.
156. Kim, D., Bae, S., Park, J., Kim, E., Kim, S., Yu, H.R., Hwang, J., Kim, J.-I., and Kim, J.-S., *Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells*. Nat Meth, 2015. **12**(3): p. 237-243.
157. Conti, E. and Izaurralde, E., *Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species*. Current Opinion in Cell Biology, 2005. **17**(3): p. 316-325.
158. Holbrook, J.A., Neu-Yilik, G., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E., *Nonsense-mediated decay approaches the clinic*. Nat Genet, 2004. **36**(8): p. 801-808.
159. Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M.J., *The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay*. The EMBO Journal, 2001. **20**(17): p. 4987-4997.
160. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay in mammals*. Journal of Cell Science, 2005. **118**(9): p. 1773-1776.
161. Baker, K.E. and Parker, R., *Nonsense-mediated mRNA decay: terminating erroneous gene expression*. Current Opinion in Cell Biology, 2004. **16**(3): p. 293-299.
162. Hei, L. and Zhong, J., *LGP2 plays an essential role in HCV infection-induced interferon responses*. Hepatology, 2017.
163. Mura, M., Combredet, C., Najburg, V., Sanchez David, R.Y., Tangy, F., and Komarova, A.V., *Nonencapsidated 5' Copy-Back Defective Interfering Genomes Produced by Recombinant Measles Viruses Are Recognized by RIG-I and LGP2 but Not MDA5*. J Virol, 2017. **91**(20).
164. McClure, M.A., Holland, J.J., and Perrault, J., *Generation of defective interfering particles in picornaviruses*. Virology, 1980. **100**(2): p. 408-18.
165. Radloff, R.J. and Young, S.A., *Defective interfering particles of encephalomyocarditis virus*. J Gen Virol, 1983. **64** (Pt 7): p. 1637-41.
166. Carrillo, E.C., Giachetti, C., and Campos, R., *Early steps in FMDV replication: Further analysis on the effects of chloroquine*. Virology, 1985. **147**(1): p. 118-125.
167. Nasirudeen, A.M., Wong, H.H., Thien, P., Xu, S., Lam, K.P., and Liu, D.X., *RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(1): p. e926.
168. Hellmuth, J.C., *Über die LGP2-vermittelte Signal-Modulation der Proteine RIG-I und MDA5, in Dissertation, LMU München*. 2014, LMU München: Medizinische Fakultät.
169. Ahmad, S. and Hur, S., *Helicases in Antiviral Immunity: Dual Properties as Sensors and Effectors*. Trends in Biochemical Sciences, 2015. **40**(10): p. 576-585.
170. Weber, M., Sediri, H., Felgenhauer, U., Binzen, I., Banfer, S., Jacob, R., Brunotte, L., Garcia-Sastre, A., Schmid-Burgk, J.L., Schmidt, T., Hornung, V., Kochs, G., Schwemmle, M., Klenk, H.D., and Weber, F., *Influenza virus adaptation PB2-627K modulates nucleocapsid inhibition by the pathogen sensor RIG-I*. Cell Host Microbe, 2015. **17**(3): p. 309-19.
171. Sato, S., Li, K., Kameyama, T., Hayashi, T., Ishida, Y., Murakami, S., Watanabe, T., Iijima, S., Sakurai, Y., Watashi, K., Tsutsumi, S., Sato, Y., Akita, H., Wakita, T., Rice, C.M., Harashima, H., Kohara, M., Tanaka, Y., and Takaoka, A., *The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus*. Immunity, 2015. **42**(1): p. 123-32.
172. Bruns, A.M., Pollpeter, D., Hadizadeh, N., Myong, S., Marko, J.F., and Horvath, C.M., *ATP hydrolysis enhances RNA recognition and antiviral signal transduction by the innate immune sensor, laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)*. J Biol Chem, 2013. **288**(2): p. 938-46.
173. Fullam, A. and Schroder, M., *DExD/H-box RNA helicases as mediators of anti-viral innate immunity and essential host factors for viral replication*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(8): p. 854-65.
174. Moresco, E.M. and Beutler, B., *LGP2: positive about viral sensing*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1261-2.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines Virions .....	3
Abbildung 2: Intrazelluläre Signalkaskade der Typ-I-Interferone .....	6
Abbildung 3: Vereinfachte Darstellung der Mustererkennungsrezeptor Signalkaskade .....	7
Abbildung 4: Aufbau der RIG-I-like Rezeptoren.....	10
Abbildung 5: Signalkaskade der RIG-I-like Rezeptoren.....	11
Abbildung 6: CRISPR/Cas-Gen-Aufbau .....	29
Abbildung 7: Funktionsweise der CRISPR/Cas9 Geneditierung.....	30
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines T7E1-Assays .....	33
Abbildung 9: Sandwich ELISA.....	39
Abbildung 10: Durchflusszytometrie .....	46
Abbildung 11: Generierung und Validierung von LGP2-defizienten 1205lu Zelllinien durch CRISPR/Cas9 Geneditierung .....	49
Abbildung 12: LGP2 beeinflusst die RLR-Signalwege auf Höhe oder oberhalb von RIG-I und MDA5 .....	51
Abbildung 13: LGP2-Defizienz führt zu verminderter Immunaktivität nach Stimulation mit synthetischen RLR-Liganden .....	53
Abbildung 14: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Viren die durch RIG-I detektiert werden.....	56
Abbildung 15: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Expression von Interferon und Interferon-induzierten Genen nach Infektion mit Viren die durch MDA5 detektiert werden sollen .....	58
Abbildung 16: LGP2-Defizienz führt zu einer reduzierten Virusreplikation von VSV-M51R in 1205lu Zellen.....	60
Abbildung 17: LGP2-Defizienz führt auch nach Infektion mit VSV-WT in 1205lu Zellen zu verminderter Virusreplikation und beruht nicht auf einer Reduktion der Zellvitalität .....	61
Abbildung 18: LGP2 zeigt keine Interaktion mit VSV-RNP im electrophoretic mobility shift assay .....	64
Abbildung 19: Erweitertes hypothetisches Modell für LGP2 nach Bruns & Horvath .....	71

## 9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl humaner Mustererkennungsrezeptoren.....	8
Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	26
Tabelle 3: Ausgesäte Zellzahl .....	27
Tabelle 4: Verwendete Transfektionsreagenzien.....	27
Tabelle 5: Verwendete guideRNA Zielsequenzen .....	29
Tabelle 6: Verwendetes Programm zur DNA-Extraktion .....	30
Tabelle 7: Verwendetes PCR-Protokoll.....	31
Tabelle 8: Verwendete PCR-Primer für die Amplifikation des Genabschnittes mit den guideRNA-Zielsequenzen.....	31
Tabelle 9: Verwendete PCR-Programme zur CRISPR/Cas9-Klon-Analyse .....	32
Tabelle 10: Zusammensetzung des RIPA-Lyse-Puffers.....	35
Tabelle 11: Zusammensetzung des Lämmli-Puffers (1x).....	36
Tabelle 12: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Elektrophoreseegel .....	36
Tabelle 13: Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers.....	37
Tabelle 14: Zusammensetzung des wet-/ Transfer-Buffers .....	37
Tabelle 15: Zusammensetzung des TBST-Puffers .....	38
Tabelle 16: Antikörper-Verdünnung zur Protein-Detektion .....	38
Tabelle 17: Zusammensetzung des EMSA-Puffers .....	40
Tabelle 18: Verwendetes firefly-Luciferasesubstrat.....	41
Tabelle 19: Zusammensetzung eines Luciferase-Transfektions-Ansatzes .....	41
Tabelle 20: Zusammensetzung des reversen Transkriptionsansatzes .....	42
Tabelle 21: Verwendetes Temperatur-Programm für die reverse Transkription.....	43
Tabelle 22: Verwendete Primer und Sonden für RT-qPCR-Assays .....	43
Tabelle 23: Zusammensetzung eines RT-qPCR-Ansatzes.....	44
Tabelle 24: Protokoll der RT-qPCR .....	44
Tabelle 25: Mutationsanalyse der LGP2-defizienten Klone.....	48

## 10. Abkürzungsverzeichnis

### A

APZ Antigenpräsentierende Zelle

### C

CARD *Caspase activation and recruitment domain*;  
Signaldomäne der RLR (Abschnitt 1.5)  
CRISPR *Clustered Regularly Interspaced Short Pallindromic Repeats*;  
neuartige Genschere zur Generierung von *knockout* Zellklonen (Abschnitt 3.2.1)  
CTB *CellTiter Blue*;  
Vitalitätsassay (Abschnitt 3.6.2)  
CTD C-terminale Domäne; Regulatorische Domäne der RLR mit Funktionen zur  
Erkennung der dsRNA und Regulation der Bindung (Abschnitt 1.5)

### D

DAMP *Danger-associated molecular pattern*  
DC *Dendritic cell* = dendritische Zelle  
DNA Desoxyribonukleinsäure  
dsRNA Doppelsträngige RNA

### E

ELISA *Enzyme-linked immunosorbant assay*;  
Assay zur Quantifizierung einer Proteinmenge in einer Probe (Abschnitt 3.4.4)  
EMCV *Encephalomyocarditis Virus* (Abschnitt 2.8.2)  
EMSA *Electrophoretic mobility shift assay*;  
Methode zum Nachweis einer Interaktion zwischen Proteinen und RNA  
(Abschnitt 3.4.5)

### G

GFP *Green-fluorescent Protein*

### H

hIP-10 Humanes IP-10; Verwendetes Zytokin als Marker der Immunaktivität  
HMW *High molecular weight*, hochmolekular

### I

IFN Interferon (Abschnitt 1.3)  
IFN- $\alpha$  Interferon Alpha (Abschnitt 1.3)  
IFN- $\beta$  Interferon Beta (Abschnitt 1.3)  
IFN- $\gamma$  Interferon gamma (Abschnitt 1.3)  
ISG *Interferon-stimulated Genes* (Abschnitt 1.3)

### K

KO *Knockout*;  
die durch CRISPR/Cas9 Geneditierung erstellten Zellklone sind LGP2-, RIG-I-,  
MDA5- oder MAVS-defizient

### L

LGP2 *Laboratory of Genetics and Physiology 2*;  
RLR und Protagonist der vorliegenden Promotionsarbeit (Abschnitt 1.5.3)

## Abkürzungsverzeichnis

---

LMW	<i>Low molecular weight</i> , niedermolekular
<b>M</b>	
MAMP	<i>microbe associated molecular pattern</i> ; s.a. PAMP
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i> , auch IPS1, VISA oder CARDIF; Mitochondrial lokalisiertes Adaptermolekül für RIG-I und MDA5 (Abschnitt 1.5)
MDA5	<i>Melanoma Differentiation Associated gene 5</i> ; RLR (Abschnitt 1.5.2)
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i> ; Quantifizierungsparameter für Virusinfektionen (Abschnitt 3.1.3)
<b>N</b>	
NMD	<i>Nonsense-mediated mRNA decay</i> ; Komplex zum Abbau defekter mRNA
<b>P</b>	
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i> ; Evolutionär konservierte molekulare Muster von Pathogenen, die dem angeborenen Immunsystem zur Erkennung dienen (Abschnitt 1.1.1)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Methode zur Replikation bestimmter DNA-Abschnitte (Abschnitt 3.3.2)
pppRNA	Triphosphat-RNA (Abschnitt 2.8.1)
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> = Mustererkennungsrezeptor (Abschnitt 1.4)
<b>R</b>	
RD	Regulatorische Domäne der RLR (CTD)
RIG-I	<i>Retinoic acid Inducible Gene I</i> ; RLR (Abschnitt 1.5.1)
RLR	RIG-I-like Rezeptor; Gruppe zytosolischer antiviraler Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems (Abschnitt 1.5)
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein Komplex (Abschnitt 1.2)
<b>S</b>	
SeV	<i>Sendai Virus</i> (Abschnitt 2.8.2)
siRNA	<i>Small-interfering RNA</i>
<b>T</b>	
TLR	Toll-like Rezeptoren (Abschnitt 1.4)
<b>V</b>	
VSV	Vesicular stomatitis Virus (Abschnitt 2.8.2)
VSV-p-GFP	Vesicular stomatitis Virus mit GFP-markiertem P-Protein (Abschnitt 2.8.2)
VSV-M51R	Vesicular stomatitis Virus mit Mutation im M-Protein (Abschnitt 2.8.2)
<b>W</b>	
WT	Wildtyp

## 11. Veröffentlichungen

Ausschnitte dieser Arbeit wurden in folgenden wissenschaftlichen Publikationen, Posterpräsentationen und Vorträgen veröffentlicht:

### Publikationen:

Linder A, Bothe V, Linder N, Schwarzlmüller P, Dahlström F, Bartenhagen C, Dugas M, Pandey D, Thorn-Seshold J, Boehmer DFR, Koenig LM, Kobold S, Schnurr M, **Raedler J**, Spielmann G, Karimzadeh H, Schmidt A, Endres S and Rothenfusser S (2021): *Defective Interfering Genomes and the Full-Length Viral Genome Trigger RIG-I After Infection With Vesicular Stomatitis Virus in a Replication Dependent Manner*. Front. Immunol. 12:595390. doi: 10.3389/fimmu.2021.595390

### Posterpräsentationen:

Raps J., Gradel M., **Rädler J.**, Pandey D., Schmidt A., Rothenfusser S.  
*Modulation of virus recognition by the innate RNA receptor LGP-2*  
Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie, Bonn, September 2014

Raps J., Gradel M., **Rädler J.**, Pandey D., Schmidt A., Rothenfusser S.  
*Modulation of virus recognition by the innate RNA receptor LGP*  
First International Symposium "Immunofest", Graduiertenkolleg 1202 der DFG, München, September 2014

### Vorträge:

*Erkennung viraler Nukleokapside durch das angeborene Immunsystem - gibt es eine Rolle für LGP2?*

Wochenendseminar Promotionsstudium „Molekulare Medizin“ der LMU München, Herrsching, Mai 2015

## 12. Danksagung

Fundamentaler Dank dieser Promotionsarbeit geht an die Arbeitsgruppe Rothenfuß der Abteilung für Klinische Pharmakologie der LMU München unter der Leitung von **Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß**, unter dessen Aufsicht dieses Forschungsprojekt durchgeführt wurde. Prof. Rothenfuß hat dieses Projekt ermöglicht und durch seine wissenschaftliche Penibilität maßgeblich meinen Sinn für korrekte wissenschaftliche Arbeit geschult. Diese Kernkompetenz ist für mich als Nachwuchsforscher von unermesslichem Wert, von der ich über dieses Projekt hinaus profitieren werde.

**Dr. rer. biol. hum. Dharmendra Pandey** stand als Betreuer an vorderster Pipetten-Front stets für Fragen zur Verfügung und war mit schier endloser Geduld an der Entwicklung wissenschaftlicher und methodischer Fähigkeiten beteiligt.

Die gesamte Abteilung für Klinische Pharmakologie unter der Leitung von **Prof. Dr. med. Stefan Endres** war maßgeblich am Erfolg dieser Arbeit beteiligt. Neben der Bereitstellung aller Forschungseinrichtungen bereitete der persönliche und wissenschaftliche Austausch mit sämtlichen Mitarbeitern der Abteilung ein spannendes und angenehmes Arbeitsklima.

Die finanziellen Mittel dieser Forschungsarbeit wurden durch das „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) im Promotionsstudiengang „Molekulare Medizin“ der Medizinischen Fakultät der LMU München zur Verfügung gestellt und durch zusätzliche Mittel des Förderprogramms „Lehre@LMU“ unterstützt.

Die wissenschaftlichen Grundsteine dieser Arbeit und ursprüngliche Förderbewilligung durch die DFG wurden von **Dr. rer. nat. Andreas Schmidt** etabliert. Aufgrund dessen Einsatzes konnten die Vorgänger-Doktoranden **Johannes Raps** und **Maximilian Gradel** das Projekt aufbauen.

Für die Bereitstellung der RIG-I- und MDA5-*knockout* Klone danke ich **Simone Wilms**, sowie **Viktoria Bothe** für die MAVS-*knockout* Klone.

Besonderer Dank gebührt auch **Johannes Rückel** (gemeinsamer medizinischer Doktorand der Arbeitsgruppe) für die enge Zusammenarbeit und den ständigen Austausch.

Zuletzt danke ich **Caroline Brauer** für die unermessliche Unterstützung während der Forschungsarbeiten und ihrer wertvollen Korrekturen bei Entstehung dieser Promotionsarbeit.