
Aus der
Abteilung für Klinische Pharmakologie
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

**Charakterisierung des
mitochondrial antiviral-signaling protein Interaktionspartners Optineurin**

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



vorgelegt von
Clarissa Anja Felicitas Zappe
aus Heidelberg

Jahr
2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Heiko Adler

PD Dr. Maximilian Muenchhoff

Prof. Dr. Anne Krug

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Dharmendra Pandey

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2024

Erklärung nach § 7 Abs. 4 der Promotionsordnung vom 16. Juli 2010

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation selbstständig angefertigt wurde, ich mich außer den angegebenen Hilfsmitteln keiner weiteren bedient habe und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen sind.

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

München, den 05.12.2024

Clarissa Zappe

.....

Clarissa Zappe

Inhalt

1. Einleitung	11
1.1 Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem	11
1.1.1 <i>RIG-I-like-receptors</i>	13
1.1.2 Mustererkennung durch <i>RIG-I-like-receptors</i>	13
1.1.3 RIG-I-Signalübertragung und Regulation	15
1.1.4 <i>Mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS)</i>	16
1.1.5 Funktion und Regulation von MAVS.....	21
1.1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum MAVS-Interaktom	24
1.2 Optineurin.....	24
1.2.1 Struktur, Expression und Lokalisation	24
1.2.3 Optineurin in humanen Pathologien	29
1.2.4 Optineurin im NF- κ B -Signalweg.....	31
1.2.5 Optineurin im RLR- und Interferonsignalweg.....	31
1.3 Fragestellung	35
2. Material und Methoden.....	37
2.1 Material	37
2.1.1 Geräte.....	37
2.1.2 Kits	37
2.1.3 Chemikalien	38
2.1.4 Puffer.....	40
2.1.5 Materialien für die Zellkultur.....	41
2.1.6 Antibiotika.....	41
2.1.7 Zelllinien	42
2.1.8 Viren.....	42
2.1.9 Reagenzien für Transfektionen	43
2.1.10 Enzyme und Komponenten für Molekularbiologische Methoden	43
2.1.11 Farbstoffe und Marker.....	45
2.1.12 Plasmide	46
2.1.13 <i>Single-guide-RNAs</i>	49
2.1.14 Primer.....	49
2.1.15 Antikörper	51
2.1.16 Software.....	52

2.1.17 Statistik	52
2.1.18 Sonstiges	53
2.2 Methoden der Zellbiologie	54
2.2.1. Zellkultur	54
2.2.1.1 Kulturbedingungen	54
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen	54
2.2.1.3 Zellen wegfrieren und auftauen	55
2.2.2 Stimulation von RIG-I	55
2.2.3 Virusinfektion	56
2.2.4 <i>Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay (ELISA)</i>	56
2.2.5 Durchflusszytometrie	56
2.2.6 Transfektion von DNA-Plasmiden	57
2.2.7 Stabile Integration von Plasmid-DNA in 1205Lu-Zellen	57
2.2.8 Generation von Optineurin- <i>knock-out</i> -Zellen mit der CRISPR/Cas9-Methode	58
2.3 Methoden der Proteinbiochemie	60
2.3.1 Erstellen von Zelllysaten für Western-Blots	60
2.3.2 Messung der Proteinkonzentration	60
2.3.3 <i>Sodium dodecyl sulfate</i> Polyacrylamid-Gelelektrophorese	61
2.3.4 Western-Blot	61
2.3.5 Ko-Immunpräzipitation	62
2.3.6 Luciferase-Assay	63
2.4 Methoden der Molekularbiologie	64
2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion	64
2.4.2 DNA-Gelelektrophorese	65
2.4.3 DNA Aufreinigung	66
2.4.4 Restriktionsverdau	66
2.4.5 Ligation	67
2.4.6 <i>In-Fusion-Cloning</i>	67
2.4.7 Transformation von DNA in kompetente Bakterien	69
2.4.8 Plasmid Purifikation	70
2.4.9 cDNA-Gewinn und <i>Real-time-quantitative-PCR</i>	70
3. Ergebnisse	73
3.1 Optineurin hat einen negativen Einfluss auf den RLR-Signalweg	73

3.1.1 Optineurin-defiziente Zellen zeigen eine gesteigerte Expression antiviraler Zytokine nach RIG-I-Stimulation	73
3.1.2 1205Lu-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression von Optineurin nach RIG-I-Stimulation.....	74
3.1.3 Die Rekonstitution des Optineurin- <i>knock-outs</i> führt zur Suppression der antiviralen Zytokinantwort nach RIG-I Stimulation	76
3.1.4 Optineurin hat einen negativen Einfluss auf die Aktivierung der Signalmoleküle stromabwärts von MAVS	77
3.1.5 Optineurin- <i>knock-out-batches</i> weisen eine Amplifikation des RIG-I-induzierten Signalwegs auf	81
3.2 Optineurin interagiert mit MAVS	86
3.2.1 Optineurin lässt sich in Ko-Immunpräzipitationen mit MAVS ausfällen	86
3.2.2 Optineurin nimmt auf MAVS oder TBK1 <i>upstream</i> von IRF3 Einfluss auf den RLR-Signalweg	87
3.3 Die Relevanz von TBK1 bei der Einflussnahme von Optineurin auf MAVS	91
3.3.1 Optineurin-Mutanten zeigen weiterhin eine Interaktion mit MAVS in Ko-Immunpräzipitationen	91
3.3.2 Die Hemmung der MAVS-Aggregation in Hek293T Zellen ist abhängig von TBK1	92
4. Diskussion.....	94
4.1 Optineurin ist ein negativer Regulator der RIG-I-getriggerten Immunantwort in 1205Lu-Zellen.....	94
4.2 Optineurin nimmt <i>upstream</i> von NF- κ B und IRF-3 Einfluss auf das antivirale Signaling.....	97
4.3 Optineurin interagiert mit MAVS	98
4.4 Die Relevanz der TBK1-Bindedomäne von Optineurin.....	101
4.6 Mögliche Mechanismen der negativen Regulation von MAVS durch Optineurin.....	104
5. Zusammenfassung	108
6. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme	109

7. Referenzen 113

8. Danksagung 127

1. Einleitung

Virale Infektionen lösen eine Reihe immunologischer Prozesse aus. Die Reaktion des angeborenen Immunsystems ist die erste Abwehrreaktion des Körpers und somit entscheidend für den Verlauf viraler Erkrankungen. Ein Abwehr-Mechanismus des angeborenen Immunsystems ist die Sekretion von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), der zur Zelltodinduktion in infizierten Zellen führt, und so zur Eindämmung der Virusverbreitung beiträgt. Li et al. entdeckten 1998 ein Protein, das den *Escape*-Mechanismus eines adenoviralen Proteins, welches den TNF- α induzierten Zelltod inhibiert, aufhebt (1). Es handelte sich hierbei um das Protein Optineurin (OPTN), welches Gegenstand dieser Arbeit ist. Seit seiner Entdeckung wurde die Rolle von Optineurin in unterschiedlichen zellulären Signalwegen beschrieben, in denen es unter anderem Einfluss auf das angeborene Immunsystem nimmt (2–6). Die Frage, ob Optineurin hier einen positiven oder negativen Einfluss auf die antivirale Abwehr hat, ist nicht abschließend geklärt. Da Mutationen von Optineurin mit unterschiedlichen humanen Pathologien assoziiert sind, bei denen die Immunantwort verändert ausfällt (7–9), ist es von Interesse, dessen Rolle innerhalb des angeborenen Immunsystems weiter zu charakterisieren.

1.1 Mustererkennung durch das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem umfasst die ersten Keimbahn-kodierten Erkennungs- und Abwehrmechanismen des Körpers auf potenzielle Pathogene. Es schützt vor dem Eindringen und löst eine erste Reaktion auf Erreger aus, wodurch es Infektionen verhindert und eine Brücke zum adaptiven Immunsystem schlägt. Das angeborene Immunsystem ist ein heterogenes System, welches sich aus verschiedensten Elementen zusammensetzt. Das Vermögen, zwischen Selbst und Fremd zu unterscheiden, ist dabei die Grundlage, die zu einer stabilen und effektiven Immunantwort führt. Charles Janeway stellte 1998 die Idee von *pattern recognition receptors* (PRRs) vor, die diese Fähigkeit durch das Immunsystem vermitteln (10). Wie das adaptive Immunsystem, kann auch das angeborene Immunsystem in einen humoralen und zellulären Teil gegliedert werden. Der humorale Teil umfasst das Komplementsystem, Zytokine, Akute-Phase-Proteine,

antimikrobielle Peptide, natürliche Antikörper und vieles mehr. Der zelluläre Teil besteht aus verschiedenen Zelltypen, zu denen unter anderem NK-Zellen, Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen zählen. Auch andere, nicht primär dem Immunsystem zugehörige Zellen wie Epithelzellen, Fibroblasten und endotheliale Zellen tragen zur angeborenen Immunantwort bei. Den Zellen ist gemein, sogenannte *pathogen-associated microbial pattern* (PAMPs) durch ihre PRRs zu erkennen und eine Immunreaktion auszulösen (11). PAMPs sind heterogene Moleküle, die in der Evolution hochkonservierte Struktur motive potenzieller Krankheitserreger von beispielsweise Bakterien, Viren und Pilzen darstellen. Sie ermöglichen dem angeborenen Immunsystem die Distinktion von Eigen und Fremd. Die Erkennung von PAMPs durch Mustererkennungsrezeptoren sorgt für eine größere Anpassungsfähigkeit und Spezifität, als dem angeborenen Immunsystem zunächst zugeschrieben wurde (10).

Die ersten entdeckten Mustererkennungsrezeptoren waren die „*Toll-like-Rezeptoren*“ (TLR). Der Bedeutung des namensgebenden Toll Rezeptors für das Immunsystem wurde zunächst von *Jules Hoffmann* 1996 in der Fliege beschrieben, als er feststellte, dass die Aktivierung des Rezeptors in Taufliegen zu einer immunologischen Reaktion führte (12). Charles Janeway, Ruslan Medzhitov und Bruce Beutler entdeckten den ersten *Toll-like-Rezeptor* als analoges System in Vertebraten (13, 14). TLRs sind Transmembranproteine, die über ihre intrazelluläre Toll-IL1-Rezeptor-(TIR) Domäne eine proinflammatorische Zytokinantwort induzieren. Sie sind insofern eine heterogene Rezeptorgruppe, als sie verschiedene bakterielle Proteine, Saccharide sowie fremde Ribonukleinsäure (RNA) und Desoxyribonukleinsäure (DNA) erkennen und an verschiedenen Membranen der Zelle lokalisiert sind. TLR1, 2 und 6 befinden sich an der äußeren Zellmembran und erkennen bakterielle Lipoproteine. TLR4, ebenfalls an der äußeren Zellmembran lokalisiert, erkennt Lipopolysaccharide gramnegativer Bakterien. TLR5 dient als Rezeptor für Flagellin, einem Strukturprotein von Bakteriengeißeln. TLR 3, 7, 8 und 9 erkennen fremde Nukleinsäuren und sind in der Membran der Endosomen verankert (15, 16).

Neben den TLRs gibt es weitere Klassen an PRRs. Die *C-type lectine receptors* (CLRs) sind eine Rezeptorgruppe, die v.a. Kohlenhydrate wie Glucane, Mannose- oder Fruktosereste erkennen und in der Abwehr von Pilzen, aber auch Bakterien, Viren, Helminthen und Protozoen relevant sind (17, 18).

Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors (NOD-like receptors, NLRs) sind 22 im Menschen bekannte Proteine, die im Zytosol vorkommen, und verschiedene PAMPs erkennen. Zu diesen gehören unter anderem bakterielle Peptide, Glucane sowie virale RNA. Auch verschiedene *damage-associated molecular-patterns* (DAMPs) wie beispielsweise Adenosintriphosphat (ATP), Cholesterin oder Asbest werden erkannt. Bei NLR-Aktivierung kommt es, je nach NLR und dessen Ligand, zur Inflammasomformation, Autophagieinduktion, Aktivierung von *nuclear-factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B), Aktivierung der *mitogen-activated protein kinase* oder zur Transkriptionsinduktion der *major histocompatibility complex* (MHC)-I und -II Proteine. (19, 20). Zytosolische DNA wird durch *absent in melanoma 2 (AIM2)-like receptors* und den c-GAS-STING-Signalweg (*cyclic-GMP-AMP synthase; stimulator of interferon genes*) detektiert. Sie aktivieren das Immunsystem über das Inflammasom und über die Aktivierung der *TANK-binding kinase 1* (TBK1) und *interferon regulatory factor 3* (IRF3) vermittelten Interferon-(IFN)-Produktion (21, 22). Eine weitere Rezeptorgruppe für die Mustererkennung sind die *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptors* (RLRs). Diese ist für diese Arbeit vordergründig, weshalb sie im folgenden Abschnitt genauer beschrieben wird.

1.1.1 *RIG-I-like-receptors*

1.1.2 Mustererkennung durch *RIG-I-like-receptors*

RLRs bilden eine Rezeptorfamilie, die die Erkennung von RNA-Viren und die darauffolgende Initiierung der antiviralen Immunantwort gewährleistet. RLRs gehören zu den DExD/H-box-RNA-Helikasen und die Familie besteht aus drei Rezeptoren (*RIG-I*, *melanoma differentiation-associated factor-5* (MDA-5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2)). Sie sind zytosolische Mustererkennungsrezeptoren, die virale Nukleinsäuren erkennen, die in das Zytosol eingedrungen sind, woraufhin sie über das gemeinsame Adapterprotein *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) die Transkription antiviraler Zytokine vermitteln (siehe Abbildung 1) (23).

Die RLRs werden in allen Geweben exprimiert und nach Interferon-Stimulation hochreguliert (24). RIG-I und MDA-5 besitzen N'-terminal zwei *caspase activating and recruiting domains* (CARDs), gefolgt von zwei Helikasedomänen (Hel1 und Hel2) mit ATPase Aktivität und einer Insertionsdomäne (Hel2i). Am Carboxyterminus schließt sich die C-terminale-Domäne an (25, 26). Die Aktivierung von RIG-I und MDA5 folgt nach der Bindung von fremden Nukleinsäuren an die C- und die Helikasedomänen.

RIG-I erkennt RNAs, die im Replikationszyklus einzelsträngiger RNA-Viren wie Paramyxoviren, Rhabdoviren, Orthomyxoviren und Flaviviren entstehen. Hingegen erkennt MDA5 RNAs von beispielsweise Picornaviren (27). Die Unterscheidung von Eigen- und Fremdnukleinsäuren beruht dabei auf verschiedenen Mechanismen. Man betrachte beispielsweise den am besten charakterisierten RIG-I Liganden: kurze doppelsträngige RNA mit 5'-Triphosphat Rest (28). Eukaryontische *messenger RNA* (mRNA), die eine 5'-Triphosphatgruppe trägt, wird vor Verlassen des Zellkerns mit einem sogenannten *Cap* versehen, einer Methylguanosingruppe, wodurch diese mRNA nicht von RIG-I erkannt wird (15). Da die Transkription viraler RNA u.a. im Zytosol stattfindet, bleibt die 5'-Triphosphatgruppe beispielweise bei diesem Prozess exponiert, sodass während der Replikation doppelsträngige RNA mit 5'-Triphosphatgruppe entsteht. Viren, die ihren 5'-Terminus maskieren, entgehen der Erkennung durch RIG-I (29). Weitere posttranslationale Modifizierungen von eukaryontischer RNA wie Monomethylphosphat-*caps* (30), oder 2'-O-Methylierung (31, 32) tragen zur Unterscheidung zwischen Eigen und Fremd bei. Trotz ihrer ähnlichen Struktur erkennen RIG-I und MDA5 unterschiedliche Liganden. RIG-I erkennt, wie bereits erwähnt, bevorzugt kurze (<300 Basenpaare) doppelsträngige RNA mit einem 5'-Triphosphat Rest (33). Außerdem wurde gezeigt, dass auch RNA mit einem 5'-Diphosphat und zirkuläre RNAs erkannt werden können (34, 34, 35). Der typische MDA-5-Ligand ist hingegen weniger gut charakterisiert. Bekannt ist, dass MDA5 lange (>1000 Basenpaare) doppelsträngige RNA mit *blunt ends* erkennt (36, 37).

1.1.3 RIG-I-Signalübertragung und Regulation

Während RLR-Defizienz zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl an Viren führt, wie beispielsweise dem Hepatitis-C-Virus (38), Rhinoviren (39) oder Influenza-Viren (40–42), kommt es bei Überaktivierung zu Interferonopathien bzw. Autoimmunerkrankungen wie Systemischem Lupus erythematoses, Morbus Basedow und IgA-Defizienz (43–45). Auch fulminant verlaufende Erkrankungen wie das Aicardi-Goutières Syndrom, bei welchem eine MDA-5-Mutation zu einer frühkindlichen Enzephalopathie führt (46) oder das Singleton-Merten Syndrom, einer Multisystemerkrankung, bei welchem es u.a. zu Pathologien der Zähne, Blutgefäße und Knochen kommt, werden u.a. durch Mutationen der RLR-Rezeptoren, die zu einer Überaktivierung führen, verursacht (47). Eine enge Regulation und Spezifität der Aktivierung des Signalwegs ist folglich unabdingbar für die Homöostase des Organismus.

Ist kein Ligand an RIG-I oder MDA5 gebunden, befinden sich diese in einem inaktiven, „geschlossenen“ Zustand, bei dem die CARD-Domänen für Protein-Protein-Interaktion nicht zugänglich sind (48). Für MDA-5 ist beschrieben, dass sich das Protein in einem dynamischen Zustand zwischen offener und geschlossener Form befindet, wobei nach Bindung doppelsträngiger DNA der offene Zustand mit höherer Wahrscheinlichkeit vorliegt (49). Bindet ein RIG-I-Ligand an dessen C-terminale Domäne, kommt es zu einer Konformationsänderung, die die Heliasedomänen der RNA und ATP zugänglich machen. Nach ATP-Hydrolyse werden die CARD-Domänen exponiert (50–52). Außerdem sorgt die ATP-Hydrolyse dafür, dass RIG-I an der RNA transloziert und so Platz für weitere RIG-I-Moleküle geschaffen wird. RIG-I-Moleküle oligomerisieren an der RNA, wodurch die Interferoninduktion amplifiziert wird (53).

RIG-I wird anschließend von der E3-Ubiquitin-Ligase *tripartite motif-containing protein 25* (TRIM25) an seinen CARD-Domänen K-63-assoziiert ubiquitinyliert, was den stromabwärts gelegenen Signalweg amplifiziert (54). Weitere Ubiquitinylierungen werden von der Ubiquitin-Ligase Riplet/RNF135 am C-terminalen Ende vorgenommen, was die TRIM25-Ubiquitinylierung von RIG-I fördert bzw. deren Voraussetzung ist (55–57). Eine weitere Ubiquitin Ligase *homo sapiens ring finger protein 125* (RNF125) stellt hingegen einen negativen Regulator der RIG-I-induzierten Interferonantwort dar. RNF125 nimmt K48-assoziierte Ubiquitinylierungen vor, was zum proteasomalen Abbau von RIG-I führt (58). Neben

Ubiquitin-Ligasen gibt es weitere Enzyme, die RIG-I deubiquitinylieren und so zur Regulation der RIG-I-Aktivität beitragen (59). Neben Ubiquitinylierung spielen weitere posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen, in der Regulation der Signalkaskade eine Rolle. Beispielsweise zeigt die Phosphorylierung der CARD-Domäne von RIG-I an Tyrosin 170 einen negativen Einfluss, da dadurch RIG-I in seinem inaktiven Zustand gehalten wird und dessen Ubiquitinylierung unterdrückt wird (60, 61). Nach Konformationsänderung mit daraus resultierender CARD-Exposition werden Phosphatasen zu den phosphorylierten CARD-Domänen rekrutiert, wodurch diese nach erfolgter Dephosphorylierung für Ubiquitinylierung zugänglich sind (62).

Nach Aktivierung bildet RIG-I eine tetramere Struktur mittels seiner CARD-Domänen. Diese Struktur (sogenannte *Lock-washer*-Struktur) erlaubt die stabile Interaktion mit den in identischer Formation befindlichen CARD-Domänen von MAVS. Die CARD-Domänen bilden eine ringartige Struktur, wodurch die stromabwärts gelegene Signalübertragung angestoßen wird (63).

LGP2, dem die CARD-Domäne fehlt, löst keine Interferonantwort aus. Seine Funktion bleibt unklar. Dieser Rezeptor wurde unter anderem als negativer Feedback-Regulator beschrieben, der durch virale Infektion und Interferon induziert wird und den RIG-I- bzw. MDA-5-Liganden maskiert (64, 65). Andere Arbeitsgruppen zeigten LGP2 als positiven Regulator, der von RIG-I- bzw. MDA5-abhängigen antiviralen Immunantworten auf RNA-Viren *in vivo* (66).

1.1.4 Mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS)

MAVS ist das zentrale Adapterprotein, über das RIG-I und MDA5 die antivirale Immunantwort induzieren. MAVS ist ein ca. 75 kDa großes Protein, das in den meisten Geweben exprimiert wird (67). N-terminal besitzt es eine CARD-Domäne, über die MAVS mit RIG-I und MDA5 interagiert. Es folgen eine Prolinreiche Region, drei TRAF-Interaktions-Motive (TIMs) und die C-terminale Transmembrandomäne (67, 68). Über die Transmembrandomäne ist MAVS innerhalb der Membran verschiedener Zellorganellen verankert. Zu diesen gehören die äußere Mitochondrienmembran, *mitochondria-associated membranes* und Peroxisomen (67, 69–71).

Nach der Aktivierung durch RIG-I bzw. MDA5 formieren sich MAVS-Moleküle über ihre CARD-Domänen zu großen, prionenartigen Aggregaten. Die Aggregate dienen als Signalplattform, über die weitere Signalmoleküle rekrutiert werden (72).

Ubiquitinligasen der *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF)-Familie (inklusive TRAF2, 3, 5 und 6) translozieren an MAVS und synthetisieren Ubiquitinketten und induzieren so redundant die stromabwärts gelegene Signalübertragung (73, 74). Hier spaltet sich der Signalweg in zwei Arme auf. Die von TRAF 2, 5 und 6 synthetisierten Ubiquitinketten aktivieren NF- κ B, während die von TRAF 3 synthetisierten Ubiquitinketten das Signal an TBK1 und *I-kappa-B-kinase-epsilon* (IKK ϵ) weiterleiten (73–75). Abgesehen von der Abhängigkeit der NF- κ B bzw. TBK1-Aktivierung von den TRAF Molekülen selbst, wurde von Shi et al. gezeigt, dass verschiedene Regionen innerhalb der TIMs, an denen die Ubiquitinketten synthetisiert werden, ausschlaggebend für die Spezifität der stromabwärts gelegenen Signalübertragung sind (76).

Die Ubiquitinketten ermöglichen die Rekrutierung der *downstream* gelegenen Signalmoleküle (77). Wie genau die Interaktion von MAVS und TBK1 gewährleistet wird, bleibt jedoch umstritten. Nach einem Modell wird TBK1 durch einen Komplex aus *NF- κ B essential modulator* (NEMO) und *TRAF family member-associated NF- κ B activator* (TANK) rekrutiert (78). Wobei hier die Fähigkeit NEMOs Ubiquitinketten zu binden, eine entscheidende Rolle spielt (78, 79). Andere gehen von einer Rekrutierung durch *NAK-associated protein* (NAP1) oder/und *similar to NAP1 TBK1 adaptor* (SINTBAD) und TANK aus (80, 81). Eine weitere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass TBK1, unabhängig von oben genannten Interaktionspartnern, über einen vorher bereits assoziierten TRAF-TBK1-Komplex an oligomerisierte MAVS-Moleküle bindet (77).

Den TBK1 Adapterproteinen NEMO, NAP1, SINTBAD und Optineurin ist gemein, eine TBK1-Bindedomäne und eine Ubiquitinbindedomäne zu besitzen. Auch wenn der Ablauf der Rekrutierung zu MAVS im Einzelnen nicht abschließend geklärt werden konnte, lässt sich festhalten, dass die Adaptermoleküle zur Rekrutierung von TBK1 zu unterschiedlichen Lokalisationen in der Zelle führen, und so die Signalwegsspezifität von TBK1 vermitteln (82).

Denn TBK1 ist eine Kinase, die in verschiedenen Signalwegen eine Rolle spielt. Hierzu gehören Signalwege des angeborenen Immunsystems (83), die

Autophagie (84), Zellwachstum und Zellproliferation (85). Neben der Kinasedomäne besitzt TBK1 eine Ubiquitin-ähnliche Domäne (86), und eine Dimerisationsdomäne. Nach Rekrutierung zu MAVS gruppieren sich TBK1 Moleküle. Es kommt zur Autophosphorylierung und zur Transautophosphorylierung, was die Signalantwort amplifiziert (87). TBK1 phosphoryliert MAVS, so dass eine negativ geladene Oberfläche entsteht. Mit seiner positiv geladenen Domäne bindet IRF3 (welcher sich im Zytosol in inaktiven Zustand befindet) an die negativ geladene Oberfläche von MAVS (88). Hier kommt IRF3 in räumliche Nähe zu TBK1 und wird daraufhin ebenfalls phosphoryliert. IRF3 dimerisiert u.a. mit IRF7, es bilden sich Homo- und Heterodimere (89) und translozieren daraufhin in den Zellkern (88, 88, 90, 91). Hier dienen sie als Transkriptionsfaktoren und induzieren zusammen mit dem Kostimulationsprotein *cREB-binding-protein/p300* über die Bindung an das *IFN-stimulated response element*, Typ-I-Interferone (90).

Der zweite Arm des Signalwegs, der von MAVS ausgeht, führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. NF- κ B-Dimere befinden sich in inaktivem Zustand im Zytosol. Sie werden durch die Bindung der inhibitorischen Moleküle der I κ B-Familie (*inhibitor of nuclear factor kappa B*) in diesem Zustand gehalten. Durch die an MAVS gebundenen K-63 assoziierten Ubiquitinketten (92) und die Rekrutierung von TANK (93) kommt es zur Aktivierung des trimeren I κ B-Kinase-Komplexes (IKK), der sich aus IKK α , IKK β und NEMO zusammensetzt (94, 95). Dieser phosphoryliert I κ B α , eine Untereinheit von I κ B, was zu dessen Ubiquitynylierung und proteasomalen Degradierung führt. Das frei gewordene NF- κ B transloziert in den Zellkern und stimuliert die Transkription inflammatorischer Zytokine (96).

NF- κ B und IRF3 binden kooperativ mit weiteren Transkriptionsfaktoren an Promotorsequenzen des IFN- β -Gens, was die effektive Expression von IFN- β sowie antiviraler (*interferon-stimulated gene 15* (ISG15), Interleukin-1 β (IL-1 β)) und proinflammatorischer (TNF- α , IL6) Zytokine gewährleistet (97–100).

Typ-I-Interferone (unter anderem IFN- α und - β) versetzen die Zelle in einen Status, der die Virusreplikation hemmt. Sie modulieren die Immunantwort und aktivieren das adaptive Immunsystem. IFN- α und - β binden an den transmembranen Interferon- α -Rezeptor. Dieser gibt das Signal über die rezeptorassoziierten Tyrosinkinase Januskinase 1 und Tyrosinkinase 2 weiter. *Signal transducer and*

activator of transcription (STAT)-Moleküle werden aktiviert. Diese fungieren als Transkriptionsfaktoren für die Induktion der sogenannten *interferon-stimulated genes* (ISGs) (101). ISGs ist eine heterogene Gruppe mit einer Vielzahl an kodierten Proteinen, die die antivirale Wirkung des Signalwegs auf unterschiedlichste Weise vermitteln (102). Mustererkennungsrezeptoren (und somit auch RLRs) zählen zu den ISGs, was für eine Sensibilisierung der Zellen für Fremd-DNA- und RNA-Erkennung sorgt und eine positive Rückkopplung darstellt (103). Andere ISGs verhindern den Eintritt des Virus in die Zelle, die Translation viraler Proteine oder das Zusammenfügen der Virushülle (103). Die Brücke zur adaptiven Immunantwort wird u.a. durch die Hochregulation der antigenpräsentierenden Moleküle MHC I und -II geschlagen (104).

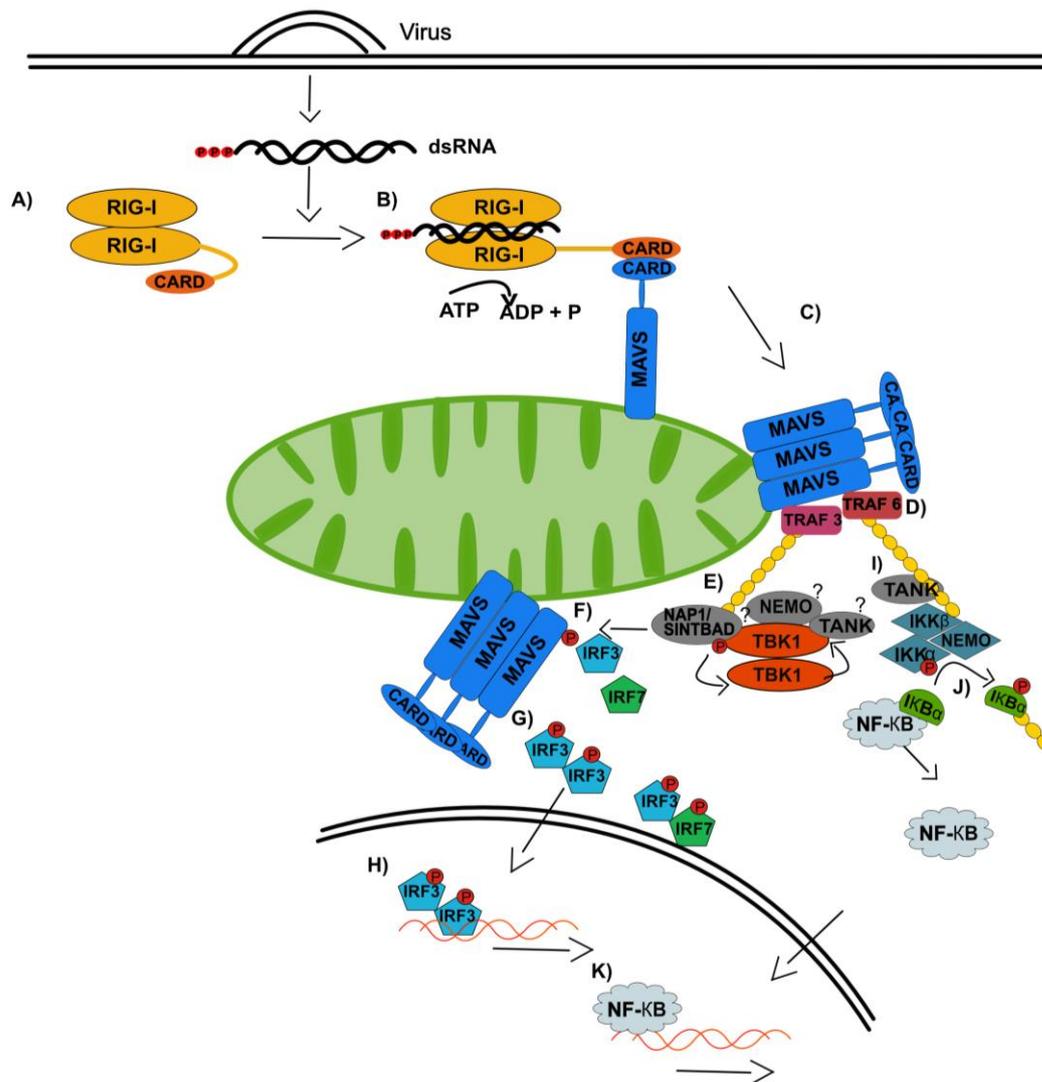


Abbildung 1: Der RIG-I-Signalweg: (A) RIG-I befindet sich im Zytosol, in geschlossenem, inaktivem Zustand. (B) Nach Bindung doppelsträngiger RNA mit Triphosphatrest und ATP-Hydrolyse werden die CARD-Domänen exponiert. (C) Die hierüber stattfindende Interaktion mit MAVS führt zu dessen Aggregation an der äußeren Mitochondrienmembran. (D) TRAF3 und -6 binden an MAVS und synthetisieren Ubiquitinketten an MAVS. (E) TBK1 wird durch nicht vollständig geklärte Interaktionspartner zu MAVS rekrutiert. (F) TBK1 phosphoryliert MAVS, worüber IRF3 an MAVS assoziiert. (G) TBK1 phosphoryliert IRF3. (H) IRF3 bildet Homo- und Heterodimere mit IRF7, transloziert in den Zellkern und sorgt für die Transkription antiviraler Zytokine. (I) TANK aktiviert den IKK-Komplex. (J) Der IKK-Komplex phosphoryliert die Untereinheit IKB α des IKB-Komplexes, der NF- κ B inaktivem Zustand hält. Der IKB-Komplex wird daraufhin proteasomal degradiert. (K) NF- κ B transloziert in den Zellkern und treibt die Transkription proinflammatorischer Zytokine.

1.1.5 Funktion und Regulation von MAVS

Wie erwähnt, ist die Balance der Immunantwort von Bedeutung, da eine Vielzahl an Erkrankungen durch deren Dysregulation hervorgerufen werden. In einer kürzlich veröffentlichten *Whole-Genome-Sequenzanalyse* zeigte sich beispielsweise ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf bei Infektion mit dem Influenzavirus H1N1 in Assoziation mit Einzelnukleotidpolymorphismen im Locus des MAVS-Gens (105).

Pothlichet et al. konnten zeigen, dass Mutationen von MAVS zur Pathogenese der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematoses beitragen (106). Durch einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) des Proteins wurde die antivirale proinflammatorische Immunantwort signifikant vermindert, und in Patientenproben erniedrigte Typ-I-Interferone gemessen. Im Gegensatz hierzu stehen Ergebnisse einer Arbeitsgruppe, die eine *Gain-of-function*-Mutation eines über MAVS signalisierenden Proteins berichten. Die Mutation führte zu einer Erhöhung basaler Interferon-Typ-I-Level und induzierte Lupus-ähnliche Symptome im Mausmodell (107). Somit scheint die Intensität der Interferoninduktion ausschlaggebend zu sein, so dass es wenig verwunderlich ist, dass auch die Regulation auf der Ebene von MAVS – dem zentralen Signalknotenpunkt – durch eine Vielzahl an Mechanismen bestimmt wird.

MAVS-mRNA ist policistronisch und besitzt sechs Methionine, die den Transkriptionsstart initiieren könnten (108). Die Isoformen sind N-terminal trunziert und besitzen keine CARD-Domäne. Qi et al. zeigten, dass eine trunzierte Variante über ihre Transmembrandomänen mit dem nicht trunzierten MAVS-Protein interagiert und so die spontane Aggregation und Signaltransduktion ausgehend von MAVS verhindert (108). Daneben berichteten Brubaker et al. ebenfalls von einer trunzierten MAVS-Variante, die durch kompetitive Inhibition mittels Rekrutierung der TRAF-Moleküle den *downstream* gelegenen Signalweg hemmte (109).

Neben der Expression der trunzierten Isoformen existieren mehrere posttranslationale Regulationsmechanismen.

Zentral ist hier die Ubiquitylierung von MAVS. Es wurde von verschiedenen E3-Ubiquitinligasen berichtet, die K48-assoziierte Ubiquitinketten an MAVS

synthetisieren und zu dessen proteasomaler Degradierung führen. Zu ihnen gehören Smurf 1 und 2, *membrane-associated ring finger (C3HC4) 5* (MARCH5), *atrophin interacting protein 4* (AIP4), TRIM25 und *Ring-Finger-Protein-5* (110). Beispielsweise wird MARCH5 nach RIG-I-Stimulation hochreguliert und zielt auf aktivierte MAVS-Oligomere ab, was ein negatives Feedback ermöglicht (111).

Neben den Ligasen sind Adapterproteine bekannt, die wiederum die Aktivität der Ubiquitinligasen modulieren. Das *tax1 binding-protein 1* beispielsweise bindet nach Virusinfektion an die CARD-Domäne von MAVS und rekrutiert so die E3-Ubiquitinligase AIP4 (112).

Neben K48-assoziiierter Ubiquitylierung, die zum proteasomalen Abbau führt, gibt es K63-assoziierte Ubiquitinketten, die zwar nicht direkt die *downstream* gelegenen Signalmoleküle rekrutieren wie oben beschrieben, die Signalantwort aber dennoch amplifizieren. TRIM31 ist ein solches Beispiel. Es synthetisiert K63-assoziierte Ubiquitinketten an MAVS, was in der verstärkten Induktion antiviraler Zytokine resultiert (113). Die Inhibition von TRIM31 blockiert dessen positiven Einfluss auf die Zytokininduktion, was u.a. von Dai. et al. gezeigt wurde, die das Protein *FAS-associated factor 1* als kompetitiven Inhibitor von TRIM31 identifizierten (114).

Auch die Deubiquitylierung von MAVS kann die Interferonantwort hemmen. Die Deubiquitinase YOD1 wurde von Liu et al. als negativer Regulator beschrieben, der nach RNA-Virusinfektion K-63-assoziierte Ubiquitinketten von MAVS abspaltet (115).

Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Molekülen ist ein weit verbreiteter Mechanismus, der die Aktivität von Signalmolekülen beeinflusst. Auch im RLR-Signalweg und insbesondere bei der Regulation von MAVS ist er von Bedeutung. Neben der oben beschriebenen Phosphorylierung durch Proteine des Signalwegs wie TBK1 bzw. IKK ϵ führt die Phosphorylierung von MAVS beispielsweise auch zur Rekrutierung der Polo-like-Kinase 1, die den MAVS-TRAF3-Komplex stört und die Interferonantwort inhibiert (116), während auf der anderen Seite die c-ABL-Kinase über die CARD-Domäne an MAVS bindet, MAVS phosphoryliert und zu einer positiven Regulation des MAVS-Signaling beiträgt (117). Weiwen et al. zeigen, dass die Phosphatase *protein phosphatase magnesium-dependent*

1A sowohl MAVS, als auch TBK1 und IKK ϵ dephosphoryliert und so die Signaltransduktion inhibiert (118).

Das MAVS-Signaling wird auch durch direkte Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst. Proteine wie *CARD and membrane-associated guanylate kinase-like protein 3* (CARMA3) und *G patch domain-containing protein 3* (GPATCH3) hemmen beispielsweise die Bildung von MAVS-Aggregaten durch die Bindung an MAVS, was zu deren Disruption führt (119, 120).

Autophagie ist ein homöostatischer Prozess, der der Zelle dazu dient, fehlerhafte Proteine oder auch Zellorganellen und Pathogene zu entsorgen. Hierzu wird die Fracht durch Ubiquitinketten markiert und über ein Adapterprotein, welches eine Ubiquitin- und eine LC3-Bindedomäne besitzt, mit dem LC3-tragenden Lysosom verlinkt. Die Fracht wird aufgenommen, es bildet sich ein Autophagolysosom, und die Fracht wird degradiert. Autophagie scheint auch im antiviralen Signaling eine Rolle zu spielen. Wie Shouheng et al. zeigten, rekrutiert das Protein Tetherin eine Ubiquitinligase zu MAVS, woraufhin MAVS ubiquitinyliert wird. Das Adapterprotein *nuclear dot protein 52kDa* (NDP52) verlinkt MAVS mit dem Autophagolysosom und vermindert so die Immunantwort (121). Die pathophysiologische Relevanz der Autophagie wird in einer Arbeit von Xia et al. hervorgehoben. Sie zeigten, wie attenuierte Masernviren die RLR-vermittelte Immunantwort über Induktion von Mitophagie (einem Autophagieprozess, bei dem Mitochondrien beseitigt werden) inhibieren (122).

Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, die miteinander verschmelzen und sich teilen. An diesem Prozess beteiligt sind die GTPasen Mitofusin-1 und Mitofusin-2, die wie MAVS in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert sind (123). Onoguchi et al. zeigten einen positiven Einfluss von Mitofusin-1 auf das antivirale Signaling durch Redistribution aktivierter MAVS-Moleküle zwischen den Mitochondrien (124). Yasukawa et al. konnten verzeichnen, dass Mitofusin-2 MAVS in einem hochmolekularen Komplex hält, und so einen negativen Einfluss nimmt (125). Neben den genannten Veröffentlichungen gibt es weitere, die die Rolle von Mitofusin-1 und -2 untersuchen. Die Ergebnisse sind teilweise diskrepant. Festhalten lässt sich, dass die Dynamik der Mitochondrien und des mitochondrialen Netzes Einfluss auf das antivirale Signaling nimmt.

1.1.6 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zum MAVS-Interaktom

Die hier aufgeführten Regulationen der MAVS-Aktivität stellen kein vollständiges Bild dar, sondern heben nur beispielhaft Mechanismen hervor. Es lässt sich feststellen, dass die Aktivierung von MAVS zur Rekrutierung einer Vielzahl von Proteinen und Molekülen führt. Diese werden in ihrer Gesamtheit auch als MAVS-Interaktom bezeichnet. *Viktoria Bothe* hat in ihrer Arbeit eine Methode entwickelt, deren Ziel es war, das MAVS-Interaktom weiter zu charakterisieren. Dazu verwendete sie eine Ascorbat-Peroxidase (APEX), die in Gegenwart von Wasserstoffperoxid, Phenol in Phenoxylradikale oxidieren kann. Diese binden kovalent an elektronenreiche Aminosäuren. Sie sind durch ihre kurze Überlebenszeit (< 1 ms) auf einen Radius von ca. 20 nm beschränkt (126). Die Kopplung von Phenol mit Biotin erlaubt es, ein Biotin-Tag an Proteine in der Umgebung von APEX anzubringen und diese über einen magnetischen Streptavidin-*Pulldown* anzureichern. Für die Identifikation neuer MAVS-Interaktionspartner im RLR-Signalweg wurde ein MAVS-APEX-Fusionsprotein kloniert, welches APEX nach seiner Transmembrandomäne exprimierte (APEX₅₁₀MAVS). Das Fusionsprotein wurde in 1205Lu-MAVS-*knock-out*-Zellen transduziert. Die Zellen wurden mit 5'-pppRNA (einem RIG-I spezifischen Liganden) stimuliert und nach 15 und 60 Minuten die Biotinylierung, durch Zugabe von Wasserstoffperoxid, induziert. Die biotinylierten Proteine wurden via Streptavidin-*pulldown* angereichert und per Massenspektrometrie analysiert. 31 Proteine waren nach 60 Minuten signifikant angereichert, von denen ca. die Hälfte bereits beschriebene MAVS-Interaktionspartner sind (127). Eines der bisher nicht als MAVS-Interaktionspartner beschriebenen Proteine ist das Protein Optineurin, welches Gegenstand dieser Arbeit ist.

1.2 Optineurin

1.2.1 Struktur, Expression und Lokalisation

Optineurin (OPTN), wurde – wie anfangs erwähnt – 1998 erstmals beschrieben, als Interaktionspartner des adenoviralen TNF- α inhibierenden Proteins E3 14.7-kDa-*protein* (1). Namensgebend war die Entdeckung, dass Mutationen von Optineurin – eine Wortneuschöpfung aus *optic neuropathy inducing* – mit dem

primärem Offenwinkelglaukom bei Erwachsenen assoziiert sind (128). Optineurin ist außerdem unter den Namen *NEMO-related protein*, *huntingtin-interacting protein 7*, *huntingtin yeast partner L*, und *transcription factor-III α interacting protein* bekannt.

Optineurin ist ein ca. 67 kDa schweres Protein, das in den meisten Geweben exprimiert wird (1, 128). Es hat multiple Domänen: Mehrere *Coiled-coil*-Motive, ein Leucin-Zipper, eine *LC3-Interacting-region* (LIR), eine Ubiquitinbindedomäne (UBD) und eine Zinkfingerdomäne (129). Zusätzlich verfügt es über posttranslational modifizierbare Elemente wie mehrere Phosphorylierungsstellen und eine Ubiquitylierungsstelle (130) (Abbildung 2).

Das Gen, das OPTN kodiert, befindet sich auf Chromosom 10p13. Es enthält drei nicht-translatierte Exons in der 5'-UTR (Untranslatierte Region). Die 5'-UTR sorgt für vier mRNA-Isoformen mit identischem offenen Leserahmen, welche unterschiedliche Expressionsmuster in verschiedenen Geweben aufweisen (131–133). Die Optineurinexpression wird durch den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interferone verstärkt, was damit zusammenhängt, dass dem Optineuringen ein NF- κ B -regulierter Promotor innewohnt (130, 134, 135).

Endogen exprimiertes Optineurin findet sich sowohl am Golgi-Apparat als auch frei im Zytosol (136, 137).

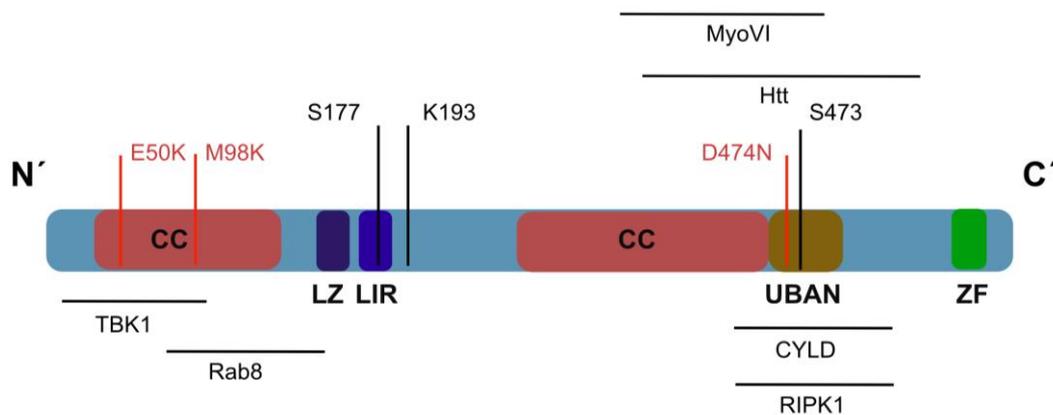


Abbildung 2. Struktur, Interaktionspartner und häufige Mutationen von Optineurin. OPTN ist ein ca. 67kDa schweres Protein. Es besitzt mehrere *Coiled-coil*-Motive (CC), einen Leucin-Zipper (LZ), eine LCR-Interacting-Region (LIR), eine Ubiquitinbindedomäne (UBD) und einen Zink-Finger (ZF). Bekannte Interaktionspartner sind u.a. *TANK-binding-kinase-1* (TBK1), Rab8, *Cylindromatosis* (CYLD), *Huntingtin* (Htt), *Myosin VI* und *Receptor-interacting-protein-kinase 1* (RIPK1). Posttranslationale Modifikationen werden an Serin 177 und 473 (S177, S473) vorgenommen, und Ubiquitylierung findet an Lysin 193 (K193) statt. Häufig beschriebene Mutationen sind die E50K- und M98K-Mutationen der TBK1-Bindedomäne, sowie die D474N-Mutation der UBD.

1.2.2 Optineurin in unterschiedlichen zellulären Signalwegen

Die oben beschriebenen Domänen des Optineurin sorgen für seine multiplen Funktionen in unterschiedlichen Signalwegen. Zu den bekanntesten Signalwegen zählen das NF- κ B-Signaling, das IFN-Signaling, Autophagie und der Vesikel-Transport (Abbildung 3).

Makroautophagie (von hier an Autophagie genannt) dient dazu, größere Massen, sei es an Proteinen, Zellorganellen oder Pathogenen, zu degradieren. Obwohl zunächst angenommen wurde, dass es sich um einen unselektiven Prozess handelt, ist die Bedeutung der Selektivität von Autophagie für die zelluläre Homöostase mittlerweile in den Vordergrund gerückt. Die Selektivität wird durch Adapterproteine vermittelt, zu denen auch Optineurin zählt (138). Autophagie beginnt mit der Formation einer Lipiddoppelschicht, die eine Phagophore formt. Die Formation wird von dem *Unc-51 like autophagy activating kinase*-Komplex und dem *Autophagy related gene* (Atg) 9L-Komplex initiiert, indem sie den *Class-III-phosphoinositide-3-kinase* Komplex aktivieren (139, 140). Dieser lokalisiert am Endoplasmatischen Retikulum und generiert die Bildung von Phosphatidylinositol-3-

Posphat, was die Bindung von Mitgliedern der *WD-repeat protein interacting with phosphoinositides*-Familie ermöglicht (141). Die Bildung einer isolierten Doppelmembran wird über einen Komplex von ATG5, ATG12 und ATG16L zusammen mit *lipidated microtubule-associated protein light chain 3* (LC3) elongiert, um schließlich mit Lysosomen zu verschmelzen (142). LC3 wird mit Phosphatidylethanolamin konjugiert und so in der Phagophorenmembran verankert. Phosphatidylethanolamin-konjugiertes LC3, welches LC3-II genannt wird, ist das Schlüsselement, das die Selektivität von Autophagie ermöglicht, indem die Adaptermoleküle, zu denen Optineurin, NDP52, *tax-1 binding protein 1* (TAX1BP1) und p62 gehören, mit ihrer LC3 *interacting region* und Ubiquitinbindedomäne die Brücke zwischen der markierten Fracht und der Phagophore vermitteln (143–147).

Optineurin fungiert als solcher Adapter beispielsweise bei der Abräumung von Salmonellen, die in Zellen eingedrungen sind. Hier bindet Optineurin an die ubiquitinylierten Bakterien. Es wird an Serin 177 von TBK1 phosphoryliert, was seine Bindungsaffinität zu LC3-II erhöht (138). Die pathophysiologische Relevanz wird durch Daten von Slowicka et al. deutlich, die eine erhöhte Anfälligkeit von Optineurin-defizienten Mäusen gegenüber Infektionen mit *Salmonella enterica* beobachteten (148). Beeinträchtigte Autophagie steht auch im Zusammenhang mit maligner Tumorgenese (149). Beispielsweise bildet das Protein *HECT domain-containing-E3 ligase* (HACE1) über Ubiquitinketten einen Komplex mit Optineurin, der Autophagie begünstigt. Liu et al. zeigten, dass die HACE1-Optineurin Interaktion das Wachstum von Lungenkrebszellen in Mäusen hemmt (150).

An einer speziellen Variante der Autophagie, der sogenannten Mitophagie ist Optineurin ebenfalls beteiligt. Bei mitochondrialem Schaden phosphoryliert die Kinase *PTEN induced putative kinase 1* (PINK1) die E3-Ubiquitinligase Parkin und Ubiquitin (151). Parkin bildet daraufhin Ubiquitinketten an Proteinen der äußeren Mitochondrienmembran. Dies führt zur Assoziation der Autophagierezeptoren Optineurin und NDP52 (152). Auch hier wird die Phosphorylierung der Adaptermoleküle durch TBK1, welches mit Optineurin zu den Mitochondrien rekrutiert wird, zur effizienten Mitochondrienbeseitigung benötigt (153).

Optineurin spielt im Membran- und Vesikeltransport eine entscheidende Rolle. Durch Komplexbildung mit der GTPase *Ras-related in brain* (Rab8) und

Huntingtin ermöglicht Optineurin den Transport von Vesikeln vom Golgi-Apparat zur Zellmembran (154, 155). OPTN lokalisiert durch die Bindung an Myosin VI an den Golgi-Apparat, welches es dort verankert. Optineurin Defizienz führt zur Myosin-VI-Dissoziation vom Golgi-Apparat, zur Golgi-Fragmentation und Exozytosereduktion (156).

Die Bedeutung von Optineurin in Signalwegen des angeborenen Immunsystems wie dem NF- κ B-Signalweg und der Interferoninduktion werden in der Literatur teilweise kontrovers diskutiert. Ob Optineurin hier die Interferonantwort amplifiziert oder hemmt, bleibt bisher unklar. Da diese Frage in der vorliegenden Arbeit im Vordergrund steht, werde ich im Verlauf darauf genauer eingehen.

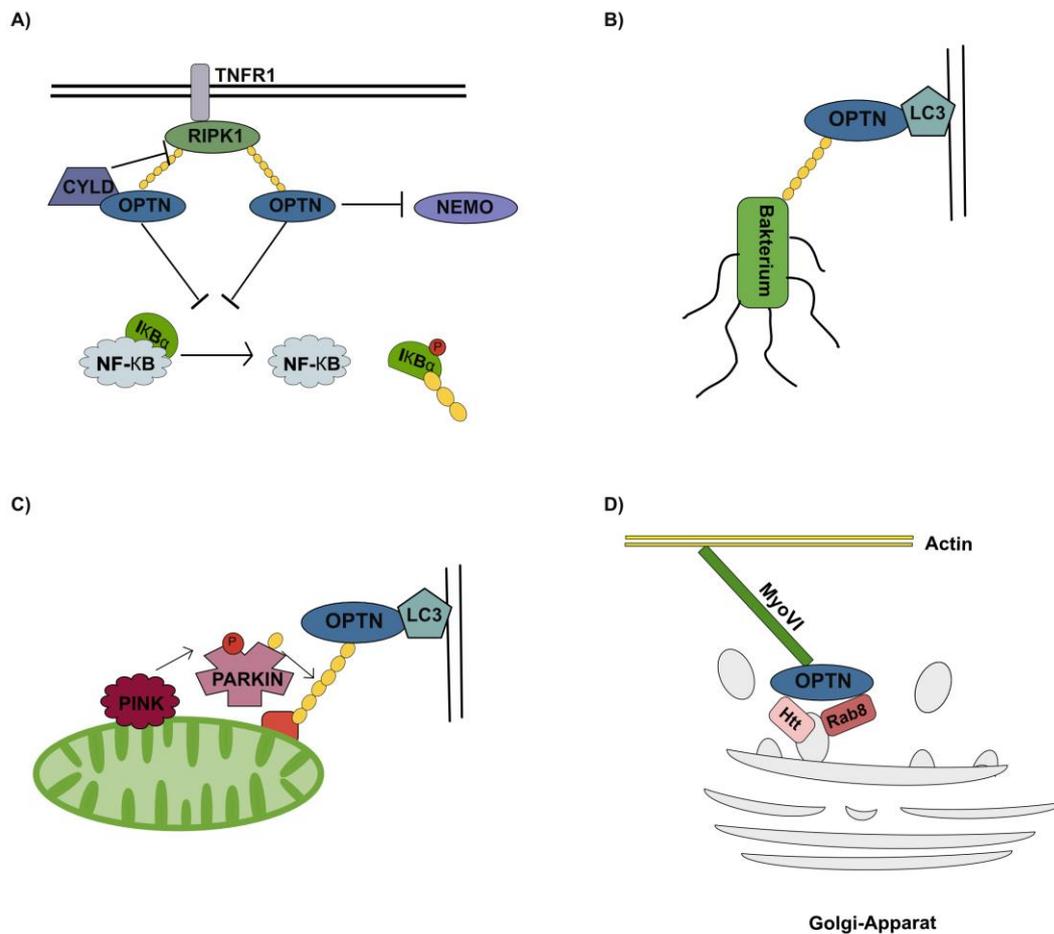


Abbildung 3. Optineurinfunktionen in verschiedenen Signalwegen. (A) OPTN hemmt die TNFR1-Rezeptor-induzierte NF-κB Antwort durch Rekrutierung der Deubiquitinase CYLD. CYLD spaltet die zur Signaltransduktion benötigten Ubiquitinketten von RIPK1. Außerdem hemmt es das *downstream* gelegene Signaling durch Blockierung der NEMO-Assoziation an die Ubiquitinketten. (B) OPTN dient als Autophagierezeptor. Nach Infektion mit beispielsweise Salmonellen koppelt OPTN die ubiquitinylierten Bakterien mit Autophagosomen über LC3-II was zu deren Abreinigung führt. (C) PINK assoziiert an geschädigte Mitochondrien und phosphoryliert Parkin, welches daraufhin Proteine der äußeren Mitochondrienmembran ubiquitinyliert. Diese werden von OPTN erkannt und mit dem Autophagosom vernetzt. (D) OPTN assoziiert über Huntingtin und Rab8 an den Golgi-Apparat und vermittelt über Myosin VI Vesikeltransport.

1.2.3 Optineurin in humanen Pathologien

Neben den beschriebenen Funktionen des Optineurin in unterschiedlichen zellulären Signalwegen sind Optineurinmutationen mit verschiedenen humanen

Krankheiten assoziiert, bei der das primäre Offenwinkelglaukom namensgebend war. Das primäre Offenwinkelglaukom ist die zweithäufigste Ursache für Blindheit weltweit (157). Es kommt zur chronischen Degeneration des optischen Nerven, bei der retinale Ganglienzellaxone untergehen. (158). Stammbaumanalysen deuten auf einen autosomal dominanten Erbgang mit unvollständiger Penetranz hin, bei genetischer Heterogenität (159). Das Optineuringen ist eines der mit dem primären Offenwinkelglaukom assoziierten Gene (132).

In einer Studie des London Colleges zeigten 10 % der Patienten mit Morbus Crohn eine Reduktion der Optineurinexpression. Damit einhergehend wurden verminderte Zytokinproduktionen (TNF- α , IFN- γ und IL-6) bei Stimulation der von Patienten gewonnenen *monocyte-derived-macrophages* mit hitzegetöteten *Escherichia coli* beobachtet (160).

Morbus Paget ist eine Erkrankung, bei der es durch übermäßige Osteoklastenaktivierung zum Umbau der Knochenstruktur kommt (161). 2010 wurde im Genlokus des Optineurin in einer Studie, die 750 Morbus-Paget-Patienten genotypisierte, ein Haplotyp identifiziert, der signifikant mit Morbus Paget assoziiert ist (162).

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist eine meist sporadisch auftretende Erkrankung, bei der es zur Degeneration des ersten und zweiten Motoneurons kommt. 10 % der ALS-Fälle kommen familiär gehäuft vor. Das bekannteste, mit der familiären ALS-Form assoziierte Protein, sind Mutationen im SOD1-Gen. Dieses Gen ist jedoch nur für einen Teil der familiären ALS-Fälle verantwortlich. 2010 entdeckten Maruyama et al. Mutationen im Optineuringen, die für ALS verantwortlich sind (163).

Optineurin spielt bei verschiedenen weiteren neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle. Hier kommt ihm vor allem durch seine Funktion als Autophagierezeptor eine Bedeutung zu. Osawa et al. demonstrierten Optineurin-positive Strukturen in einer Reihe neurodegenerativer Erkrankungen (Alzheimer, Morbus Parkinson, Creutzfeld-Jakob, Multisystematrophie und Morbus Pick) (164).

Betrachtet man die unterschiedlichen Krankheitsbilder, bei deren Genese Optineurin eine Rolle zu spielen scheint, werden hauptsächlich veränderte Autophagieverhältnisse und eine alterierte Immunantwort als Mechanismen der Krankheitsentstehung diskutiert (8, 160, 165, 166). Beide Sachverhalte werden stets mit veränderter TBK1-Interaktion und Ubiquitinbindungsfähigkeit in

Zusammenhang gebracht (167–170). Diese Gegebenheit spiegelt sich auch in den Daten wider, die Optineurin im NF- κ B-Signalweg und in der Interferoninduktion beschreiben.

1.2.4 Optineurin im NF- κ B -Signalweg

Wie bereits erwähnt, ist Optineurin auch unter dem Namen *NEMO-related-protein* bekannt, welcher durch die Homologie zu NEMO zustande kommt (134): NEMO, das als Teil des IKK-Komplexes unabdingbar für die NF- κ B - Aktivierung ist, wird durch die ihm ähnliche Ubiquitinbindedomäne von Optineurin kompetitiv gehemmt. TNF- α aktiviert NF- κ B über den TNF α -Rezeptor-1 (TNFR1). Der aktivierte Rezeptor rekrutiert die *receptor-interacting protein kinase 1* (RIPK1), welche ubiquitinyliert wird, und NEMO über diese Ubiquitinketten rekrutiert. Daraufhin wird IKK aktiviert und phosphoryliert den inhibitorischen I κ B-Komplex von NF- κ B, was zu dessen Dissoziation von NF- κ B führt (171). Optineurin besetzt die Bindestellen der Ubiquitinketten von RIPK1, ist allerdings nicht in der Lage, I κ B zu phosphorylieren, was zu einer abgeschwächten Entzündungsreaktion führt (172). Ein anderer Mechanismus, über den Optineurin das NF- κ B-Signaling hemmt, ist die Abspaltung der Ubiquitinketten. Nagabushana et al. zeigten, dass Optineurin mit dem deubiquitinylierenden Enzym Cylindromatosis (CYLD) interagiert und so das Abspalten der Ubiquitinketten von RIPK1 fördert (2). Es wurde auch gezeigt, dass Optineurin über ähnliche Mechanismen die NF- κ B Aktivierung durch IL1- β (5) und den T-Zell-Rezeptor (CD3, CD28) (173) hemmt. Im Kontrast zu den hier vorgestellten *In-vitro*-Daten stehen *In-vivo*-Daten, bei denen für Optineurin in loss of function Experimenten keine negative Regulation von NF- κ B nach Stimulation durch TNFR, TLR3, TLR4 oder CD40 gezeigt werden konnte (148, 174, 175).

1.2.5 Optineurin im RLR- und Interferonsignalweg

Die Produktion von Interferon ist einer der zentralen Mechanismen des angeborenen Immunsystems um sich vor Erregern, insbesondere vor Viren, zu schützen.

Optineurin wurde bereits mehrfach beschrieben in die Signalwege, die zur Interferonproduktion führen, involviert zu sein. Ob Optineurin die Interferonproduktion allerdings amplifiziert oder inhibiert, ist in der Literatur bisher uneinheitlich beschrieben.

2010 beschrieben Mankouri et al. Optineurin als negativen Regulator der Interferonantwort nach Infektion durch RNA-Viren in humanen Zellsystemen. Sie konnten zeigen, dass die IFN- β -Induktion nach Stimulation mit Sendai-Viren, die den RLR-Signalweg aktivieren, und untransfiziertem Poly(I:C) (Poly-Inosinsäure: Poly-Cytidinsäure) – einem doppelsträngigen RNA-Analogen – welches als TLR3-Ligand dient, in Anwesenheit von Optineurin vermindert ausfiel. Sie zeigten außerdem, dass diese Reduktion von der Fähigkeit des Optineurin, Ubiquitin zu binden, abhängig ist, und weiter, dass die Ubiquitinbindedomäne die Interaktion mit TBK1 und TRAF3 vermittelt (136).

Génin et al. stellten ebenfalls einen negativen Effekt von Optineurin in Abhängigkeit seiner Ubiquitinbindedomäne auf die IFN-Induktion nach RLR-Stimulation fest. Sie verzeichneten außerdem die Abhängigkeit dieses Effekts von der Phosphorylierung des Optineurin an Serin 177 durch TBK1, und von der Rekrutierung der Deubiquitinase CYLD zu TBK1 durch Optineurin (174).

Die Relevanz der Ubiquitinbindung von Optineurin stellten auch Sakaguchi et al. fest, die zeigen konnten, dass die Mutanten OPTN^{Q398X} und OPTN^{E478G}, welchen die Ubiquitinbindungsfähigkeit fehlt, die MDA-5- und TIR-*domain-containing adapter inducing-interferon- β* (TRIF)-getriggerte Interferonantwort nicht wie das wildtypische Protein hemmen konnten (TRIF dient als Adapterprotein in der Signaltransduktion von unter anderem TLR3 (176) (177)). Die OPTN^{E50K}-Mutante hingegen, die mit dem primären Offenwinkelglaukom assoziiert ist und erhöhte Bindungsaffinität zu TBK1 aufweist (178), zeigte weiterhin einen hemmenden Effekt (177).

Zusammengefasst stellen die beschriebenen Studien heraus, dass Optineurin die Reduktion der Interferoninduktion über die TBK1-Optineurin-Achse vermittelt, wobei dafür gleichzeitig eine intakte Ubiquitinbindedomäne des Optineurin notwendig ist, um die Interferonantwort zu unterdrücken.

In Diskrepanz zu den aufgeführten negativen Effekten von Optineurin bei der Interferoninduktion stehen Ergebnisse von Arbeitsgruppen, die Optineurin

hauptsächlich im murinen System untersuchten. So zeigten beispielsweise Gleason et al., dass die TBK1-Aktivierung und IFN- β -Transkription durch RLR-Stimulation in murinen-embryonischen-Fibroblasten (MEFs), die von Optineurin^{D477N/D477N} Mäusen stammten – wobei die Optineurin^{D477N}-Mutation die Ubiquitinbindung Optineurins aufhebt – schwächer ausfiel als in MEFs von wildtypischen Mäusen (179).

Meena et al. demonstrierten, dass eine N-terminale Domäne des Optineurin die TBK1-Interaktion vermittelt. Sie zeigten außerdem, dass die IFN- β -Induktion nach Stimulation von *bone marrow-derived macrophages* (BMDM) mit Poly(I:C) und die Infektion von Mäusen mit Sendai-Viren bei N-terminal trunkierten Optineurinvarianten vermindert ausfielen (180). Beide Arbeitsgruppen zeigten, dass die endogene Optineurin-TBK1-Interaktion nicht durch Mutation der Ubiquitinbindedomäne gestört wurde. Ferner zeigten sie, dass die wildtypische Optineurin-TBK1-Interaktion zu einer erhöhten Phosphorylierung von TBK1 führte, verglichen mit den Mutanten.

Zusammen mit Ergebnissen von Gleason et al. (179) und der Tatsache, dass TBK1-Ubiquitylierung nach Stimulation stattfindet und für die IFN-Antwort essentiell ist (181), spricht das für ein Model, in welchem die Interaktion von OPTN mit TBK1 durch die N-terminale Domäne vermittelt wird, und nach Aktivierung durch die Ubiquitylierung von TBK1 weiter gestärkt wird, was zur Phosphorylierung von TBK1 beiträgt und letztlich für die optimale IFN- β -Induktion notwendig ist. Ob im murinen System ebenfalls die Phosphorylierung von Optineurin durch TBK1 eine Rolle spielt, bleibt offen.

Bakshi et al. konnten den Effekt der positiven IFN-Regulation durch den Optineurin-TBK1-Komplex nur nach Stimulation von TLR3/4, nicht jedoch nach Induktion des RLR-Signalings verzeichnen. Dafür sahen sie auf die IRF-3-Phosphorylierung in BMDM von Wildtypischen und Optineurin^{D477N/D477N}-Mäusen, nach Stimulation des RLR-Signalwegs mit Sendai-Viren und nach Stimulation von TLR3 bzw. 4 mit untransfiziertem Poly(I:C) und LPS (182).

Diese in direktem Kontrast zu Daten von Gleason et al. stehenden Ergebnisse, die eine Reduktion der Interferoninduktion bei Mutation der Ubiquitinbindedomäne verzeichneten, könnten ein Hinweis auf unterschiedliche Rollen des Optineurin in verschiedenen Zelltypen sein, da beide Arbeitsgruppen die

Optineurin^{D477N}-Mutante im RLR-Signalweg untersuchten, jedoch einmal MEFs und einmal BMDM verwendeten.

Zudem ist bei Berücksichtigung dieser Ergebnisse nicht eindeutig, ob Mutationen des Optineurin im RLR-induzierten Interferonsignalweg in murinen Systemen einen negativen Einfluss haben.

Interessant ist, dass eine Arbeitsgruppe (Munitic et al.), die einen positiven Effekt von Optineurin auf die IFN-Induktion in BMDM feststellte, einen gegenteiligen Effekt von Optineurin in HEK293-Zellen, verzeichnete. Hier wurde in Hek293-Zellen die NF- κ B-Aktivierung durch TNF α und die IRF-3-Aktivierung durch TLR3-Stimulation bei gleichzeitiger Transfektion von Optineurin inhibiert. Die Inhibition wurde durch Mutation bzw. Trunkierung der Ubiquitinbindedomäne (OPTN^{D472N}, OPTN^{467T}) von Optineurin aufgehoben (175). Gleichzeitig fiel die IRF-3-Phosphorylierung in Optineurin^{470T}-BMDM um bis zu 40 % geringer aus als im Wildtyp bei LPS-Stimulation (Optineurin^{470T} als C-terminal trunkierte Variante des Optineurin, welcher die Ubiquitinbindedomäne der Zinkfinger und die CYLD-Interaktionsdomäne fehlt).

Diese Daten unterstreichen die Diskrepanz der Ergebnisse in murinen und humanen Zellsystemen. Gleichzeitig können hier auch stimuluspezifische Effekte zum Tragen kommen, da die IRF-3-Phosphorylierung durch TNF- α -Rezeptor- und TLR3-Stimulation in humanen Zelllinien bzw. durch TLR4-Stimulation in murinen Zelllinien induziert wurde.

Interessant war in der bereits zitierten Arbeit von Munitic et al. auch, dass kein negativer Effekt in Optineurin^{470T}-BMDM auf die NF- κ B -Aktivierung nach LPS- und TNF α -Stimulation in BMDM festzustellen war (175). Ähnliche Ergebnisse verzeichneten Slowicka et al., die keine Änderung der NF- κ B Antwort nach TLR3- und TLR4-Stimulation zwischen BMDM von wildtypischen und optineurindefizienten Mäusen sahen, während die IRF-3-Antwort in beiden Fällen bei Optineurindefizienz zu einer Reduktion dieser führte (148).

Diese Ergebnisse deuten wiederum auf differenzierte, signalwegspezifische Effekte des Optineurin in der angeborenen Immunantwort hin.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Funktion von Optineurin in Signalwegen des angeborenen Immunsystems kontrovers diskutiert wird. Es ist nicht abschließend geklärt, ob Optineurin einen positiven oder negativen Einfluss auf die Interferoninduktion durch das angeborene Immunsystem hat. Festhalten lässt sich anhand der in murinen Zellsystemen erhobenen Daten jedoch wie im humanen Zellsystem auch, dass Optineurin seinen Einfluss auf die Interferoninduktion durch die gegenseitige Beeinflussung von Optineurin und TBK1 und über seine Ubiquitinbindedomäne geltend macht (Abbildung 4).

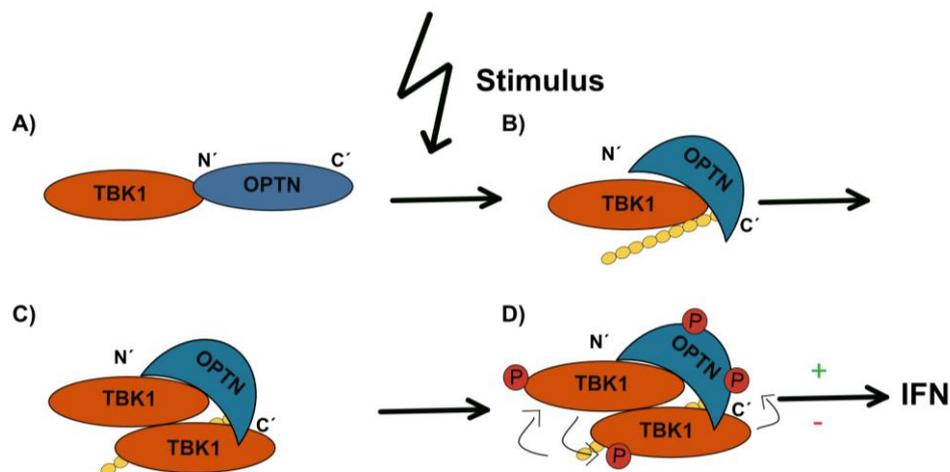


Abbildung 4. Modell der Interaktion von Optineurin und TBK1. (A) TBK1 und OPTN interagieren endogen über die N-terminale Domäne des Optineurins. (B) Nach Stimulation kommt es zur Ubiquitylierung von TBK1, was die Bindung stärkt und (C) die Rekrutierung weiterer TBK1-Moleküle fördert. (D) Es kommt zur Autophosphorylierung von TBK1. Gleichzeitig wird OPTN durch TBK1 an verschiedenen Domänen phosphoryliert. Ob die Interaktion die IFN-Produktion hemmt oder fördert ist nicht abschließend geklärt.

1.3 Fragestellung

Die Regulation des RLR-Signalwegs ist essenziell für die Aufrechterhaltung der Homöostase des Immunsystems. Eine Dysregulation kann zu erhöhter Anfälligkeit gegenüber Viren oder Autoimmunerkrankungen und Interferonopathien führen. Die Funktion von Optineurin in der Regulation des Signalwegs bleibt in der Literatur strittig. Es konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, ob

Optineurin im RIG-I-induzierten IFN-Signalweg einen positiven oder negativen Einfluss hat.

Viktoria Bothe aus unserer Arbeitsgruppe konnte in ihrer Doktorarbeit in einem APEX-basierten Screening-System Optineurin als Teil des MAVS-Interaktoms identifizieren. Die Frage, ob Optineurin durch Einflussnahme auf MAVS eine Rolle in der RLR-getriggerten Immunantwort spielt, ist jedoch bisher noch ungeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher untersucht werden, ob Optineurin Einfluss auf die durch RIG-I-vermittelte Interferoninduktion nimmt, und wenn ja, ob dieser Einfluss durch eine Interaktion mit MAVS vermittelt wird. Folgende Fragestellungen wurden daher in der vorliegenden Arbeit bearbeitet:

1. Hat Optineurin einen verstärkenden oder hemmenden Effekt auf die durch RIG-I-getriggerte antivirale Zytokin- und Interferonantwort in 1205Lu-Zellen?
2. Beeinflusst Optineurin die Aggregation und subsequente Aktivierung von MAVS?
3. Wird die Viruslast durch Fehlen oder Überexpression von Optineurin relevant beeinflusst?
4. Ist der Einfluss von Optineurin TBK1-vermittelt?
5. Spielt Optineurin als Autophagieadapter eine Rolle in der Hemmung der RIG-I-getriggerten Immunantwort?
6. Welche funktionelle Domäne von Optineurin vermittelt dessen Einfluss im RLR-Signaling?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerätebezeichnung	Firma
Alpha Imager HP	Alpha Innotech (San Leandro, US)
Branson Digital Sonifier	Emerson (Ferguson, US)
Chemidoc Touch Imaging System	Bio Rad (München, DE)
FACSCanto II	BD (San Jose, US)
LightCycler 480	Roche (Mannheim, DE)
Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser	Berthold Technologies (Bad Wildbad, DE)
NanoDrop 2000c Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Trans-Blot Cell	Bio Rad (München, DE)

2.1.2 Kits

Bezeichnung	Hersteller
DC Protein Assay	Bio Rad (München, DE)
Clarity Western ECL Substrate	Bio Rad (München, DE)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Human IL6 ELISA Set	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)
Human IP-10 ELISA Set	BD Biosciences (Franklin Lakes, US)

In-Fusion® HD Cloning Kit	Takara (Kyoto, Japan)
peqGOLD Total RNA Kit	VWR (Radnor, US)
SuperSignal West Femto	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
SuperSignal West Pico Plus	Thermo Fisher Scientific (Waltham, US)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Zymo Research (Freiburg DE)

2.1.3 Chemikalien

Reagenz	Hersteller
Agarose	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Coelenterazin H	Promega (Fitchburg, US)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Isopropanol	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken, DE)
Methanol	Merck (Darmstadt, DE)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumazid	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumfluorid	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Natriumorthovanadat	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Nonidet P-40	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Paraformaldehyd	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)

Polyacrylamid	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Polybrene	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Protease Inhibitor Cocktail (P8340)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Rotiophorese®Gel 30 (37,5:1),	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Tetramethylethyldiamin (TMED)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Trichlorethanol	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
TRIS-HCL	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Tween	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)

2.1.4 Puffer

Lysepuffer

Passive Lysis Buffer (5x)	Promega (Fitchburg, US)
RIPA +	50 mM Tris HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0.05 % sodium deoxycholate, 10 mM EDTA, 2 mM Na ₃ VO ₄ , <i>protease inhibitor cocktail</i> (1:100)

Puffer für SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot

Lämmli-Puffer	300 mM Tris HCl (pH 6.8), 60 % glycerol, 12 % SDS, 0.03 % Bromophenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol
SDS-Page Laufpuffer	190 mM Glycin, 25mM Tris, 3,75 mM SDS
<i>Stripping</i> Puffer	6 M GnHCl, 0.2 % Nonidet P-40 (NP-40), 0.1 M β-Mercaptoethanol, 20 mM Tris-HCl, pH7.5
TBS-T	50mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween
Western-Blot Transferpuffer	190 mM Glycin, 25mM Tris, 20% Methanol
SDS-Page Sammelgelpuffer (4x)	0.5 M Tris (pH 6.8), 0,35 mM SDS, 0.01 % Bromophenolblau
SDS-Page Trenngelpuffer (4x)	1,5 M Tris (pH8,8), 0,35 mM SDS

Weitere Puffer

TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) (50x)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
--	---------------------------

ELISA Waschpuffer	233 mM PBS, 0,05 % Tween
-------------------	--------------------------

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Products (Grand Island, USA)
L-Glutamin	Lonza (Basel, CH)
OPTI-MEM	Gibco Products (Grand Island, USA)
Phosphat-gepufferte-Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Polybren	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Trypanblau	Sigma Aldrich (Steinheim, DE)
Trypsin	Lonza (Basel, CH)

2.1.6 Antibiotika

Name	Hersteller
Ampicillin	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Blasticidin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Doxycyclin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Penicillin	Lonza (Basel, CH)
Puromycin	Invivogen (San Diego, CA, USA)

Streptomycin	Lonza (Basel, CH) Natalie
Tetracyclin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

2.1.7 Zelllinien

Bezeichnung	Eigenschaften	Quelle/Hersteller
1205Lu-Zellen	Humane Melanomzelllinie	von Dr. Robert Besch (LMU, Munich)
PlatA-Zellen	Retrovirale Verpackungs Zelllinie basierend auf Hek293T	Biolabs (San Diego, USA)
Hek293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	ATCC (Manassas, US)

2.1.8 Viren

Name	Gattung	Polarität	Besonderheiten	Herkunft
<i>Vesicular stomatitis</i> Virus M515R-GFP	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	Die Mutation M51R hinderte das Virus daran, die Interferonantwort der infizierten Zelle zu unterdrücken	Zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Ebert, Technische Universität München

<i>Venus-Yellow fever virus-17D</i>	Flaviviridae	(+) ssRNA	Attenuiertes Gelbfieberimpfvirus gekoppelt mit dem gelb fluoreszierenden Protein <i>Venus</i>	Zur Verfügung gestellt von Ph.D. Charles M. Rice, Rockefeller University
-------------------------------------	--------------	-----------	---	--

2.1.9 Reagenzien für Transfektionen

Reagenz	Hersteller
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)
RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)
TransIT-X2®	Mirus Bio (Madison, USA)

2.1.10 Enzyme und Komponenten für Molekularbiologische Methoden

Reagenz/Enzym	Hersteller
<i>Thermosensitive Alkaline Phosphatase</i> (FastAP)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
T7 <i>Endonuclease</i>	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
T4 DNA Ligase	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)

Oligo (dT _s)	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
Not 1	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
EcoR1	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
dNTPs	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
CutSmart [®] Buffer	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)
T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Phusion DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
RevertAid H Minus Reverse Trans- criptase	Thermo Scientific (Waltham, USA)
5x Reaction Buffer	Thermo Scientific (Waltham, USA)

2.1.11 Farbstoffe und Marker

Farbe	Hersteller
Fixable Viability Dye eFluor™ 660	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)
DNA-Gel-Ladefarbstoff (6x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US)
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
DNA Stain Clear G	Serva (Heidelberg, DE)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TriDye 2-log DNA ladder (0.1-10 kb)	New England BioLabs (Ipswich, MA, US)

2.1.12 Plasmide

Luciferase- assay

Name	Backbone	Insert	Promotor	Quelle
pRL-TK-Renilla-Luciferase-Reporter	pRL-TK	Renilla Luciferase	HSV-Thymidine Kinase	Promega GenBank® <i>Accession Number AF025846</i>
Nfkb (6x) Luc Reporter	pGL3	6x Nfkb-response element von Firefly Luciferase		Prof. Kate Fitzgerald
p125-Firefly-Luciferase	pGL3	Firefly Luciferase kontrolliert von IFN- β -Promotor		Prof. Dr. Takashi Fujita (183)
RIG-I	pcDNA5/FRT/TO	RIG-I	CMV	diese Arbeitsgruppe
MAVS	pcDNA3.1	MAVS	CMV	diese Arbeitsgruppe
IRF3-5D	pCMV-Flag	IRF3-5D (konstitutiv aktive IRF3 Mutante)	CMV	Dr. Rongtuan Lin (184)

TBK1	pCR3	<i>Flag-tagged</i> TBK1	CMV	Prof. Kate Fitzgerald
Leervektor	pcDNA3.1	/		Addgene #138209
pOPTN-eGFP	pEGFP-N1	OPTN		Addgene #27052
OPTN-FLAG	pEGFP-N1	Flag-tagged OPTN (C-terminal)	CMV	diese Arbeit

Knock-out / Rekonstitution

Name	Backbone	Insert	Promotor	Quelle
pOPTN-EGFP	pEGFP-N1	eGFP-tagged OPTN (C-terminal)	CMV	Addgene #27052
pMXs-Puro	pMXs-Puro	/	5` Long-terminal-repeat	Cell Biolabs #RTV-012
pLVX-Tight-Puro	pLVX-Tight-Puro	/	Tetracyclin induzierbarer modifizierter CMV Promotor	Clontech #631847

eS- pCas9(1.1)	pX330-U6-Chi- meric_BB-CBh- hSpCas9	Human- isierte S. pyogenes Cas9 3x FLAG <i>getagged</i> (N-termi- nal)	CBh (CMV <i>enhancer</i> + <i>Chicken-</i> β -actin- Promoter)	Addgene #71814
-------------------	---	---	--	----------------

2.1.13 *Single-guide-RNAs*

sgRNA	Ziel	Sequenz 5`-3`-Richtung
OPTN-sgRNA1 (<i>top-strand</i>)	Exon 5	CACCGATTTGAG- GAGCTTTCGGCC
OPTN-sgRNA1 (<i>bottom-strand</i>)		AAACGGCCGAAA- GCTCCTCAAATC
OPTN-sgRNA2 (<i>top-strand</i>)	exon 4	CACCGGGTAAAC- GTGTCCAGGTTT
OPTN-sgRNA2 (<i>bottom-strand</i>)		AAACAAACCTGGACAC- GTTTACCC

2.1.14 Primer

Klonierung

Sequenzierung, Mu- tagenese

Name	Sequenz 5`-3`-Richtung
OPTN-pLVX-tight-puro <i>forward</i>	GCGAACGCGTGAATTATGTCCCATCAAC- CTCTCAGCT
OPTN-pLVX-tight-puro <i>reverse</i>	CTACCCGG- TAGAATTTTAAATGATGCAATCCATCACGTG
OPTN-pMXs-puro <i>forward</i>	TATGAATTCATGTCCCATCAACCTCTCAG
OPTN-pMXs-puro <i>reverse</i>	ATAA- GAATGCGGCCGCTTAAATGATGCAATCCATCACG
OPTN-Seq #1	CCACGAGAACAGTCTCCAC
OPTN-Seq#2	AAAGAGAATGATGCTTTTGAAGAC
OPTN-S117A <i> fwd</i>	CTCAGAAGATGCCTTTGTTGAAATTAGGATG

OPTN-S117A <i>rev</i>	GAGCCGCTGGAGTTCAGC
OPTN- Δ 147 <i>fwd</i>	GTGAGGCTACAAGCAGAG
OPTN- Δ 147 <i>rev</i>	CATTTAAATGATGCAATCCATCAC

RT-qPCR

Name	Sequenz	5`-3`-Rich-	Sondennummer	der
	tung		Roche	Universal Probe
			Library	
HPRT (human) rechts	cgagcaagacggtcagtcct		#73	
HPRT (human) links	tgacctgattatgtgcatacc			
IP-10 (human) links	gaaagcagttagcaag- gaaagg		#34	
IP10 (human) rechts	gacatatactccatgtagg- gaagtga			
IL-1 β (human) links	ctgtcctgcgtgtgaaaga		#78	
IL-1 β (human) rechts	ttgggtaattttgggatctaca			
IL-6 (human) links	gatgagtacaaaagtcct- gatcca		#40	
IL-6 (human) rechts	ctgcagccactggttctgt			
ISG15 (human) links	gcgaactcatcttgccagt		#76	
ISG15 (human) rechts	ttcagctctgacaccgacat			
OPTN (human) links	gatgaaatgaagcaaacca- ttg		#4	
OPTN (human) rechts	Tgaaaatcagaacag- taaactcca			

2.1.15 Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller	Katalognummer
Maus-anti-Cas9	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#14697
Maus-anti-IKB α	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#4814S
Maus-anti-GAPDH	#190	
Maus-anti-IRF3	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, US)	#sc-33641
Maus-anti-MAVS	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, US)	#sc-166583
Maus-anti-Phospho-IKB α	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#9246S
<i>Rabbit</i> -anti-Optineurin	Abcam (Cambridge, Vereinigtes Königreich)	#ab23666
<i>Rabbit</i> -anti-Phospho-IRF3	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#4947
<i>Rabbit</i> -anti-Phospho-TBK1	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#5483
<i>Rabbit</i> -anti-TBK1	Cell Signaling Technology (Danvers, US)	#3013

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Katalognummer
<i>Goat-anti-mouse-IgG</i> -HRP	Bio-Rad (Hercules, US)	#1721011
<i>Goat-anti-rabbit-IgG</i> -HRP	Bio-Rad (Hercules, US)	#1721019

2.1.16 Software

Bezeichnung	Entwickler
FlowJo	Tree Star (Ashland OR, US)
GraphPad Prism	GraphPad Software (La Jolla, US)
Image Lab Software	Bio-Rad (Hercules, US)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, US)
SnapGene	GSL Biotech (LLC Illinois, US)
Affinity Designer	Serif Euro (West Bridgeford, United Kingdom)

2.1.17 Statistik

Die angegebenen Daten sind als Mittelwerte dargestellt, unter Einbezug des Standardfehlers (SEM).

Die gezeigten statistischen Analysen wurden mittels des ungepaarten zweiseitigen studentischen t-Tests durchgeführt. Dabei wurde ein Konfidenzintervall von 95 % gewählt. Das Signifikanzniveau wurde wie folgt angegeben: * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

2.1.18 Sonstiges

Bezeichnung	Hersteller
ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Coelenterazine H	Promega (Madison, US)
Polyvinylidenfluorid-Membran 0,45 µM	GE Healthcare (Chicago, Illinois, US)
Polyvinylidenfluorid-Membran 0,2 µM	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
<i>Lysogeny-broth</i> -Medium	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Luciferase Substrat	20 mM Tricine, 2.67 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrate, 0.1 mM EDTA (pH 8.0), 33.3 mM DTT, 0.53 mM ATP, 270 µM Acetyl-Coenzyme A, 131.6 µg/ml Luciferin, 5 mM NaOH, 0.265 mM Magnesiumcarbonatehydroxide
Protein A-Sepharose® 4B Conjugate	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
TBK1 Inhibitor BX795	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

2.2 Methoden der Zellbiologie

2.2.1. Zellkultur

2.2.1.1 Kulturbedingungen

Alle Zellen wurden in DMEM-Vollmedium (Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium) mit den Zusätzen 10 Vol.-% FCS (*fetal calf serum*), 90 U/ml Penicillin, 90 U/ml Streptomycin und 1,8 mM L-Glutamine im Inkubator bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

Bei Erreichen einer ca. 80-prozentigen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dafür wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS (*phosphate-buffered saline solution*) gewaschen, um das restliche Medium zu entfernen. Anschließend wurden eine Trypsin-, und EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben und bei 37 °C inkubiert, wodurch die adhärennten Zellen von der Flasche gelöst wurden. Unter dem Mikroskop wurde kontrolliert, ob die Zellen sich in Suspension befanden. Die Reaktion wurde durch DMEM mit den oben angegebenen Zusätzen abgestoppt. Danach wurden die Zellen im Verhältnis 1:10 oder 1:5 gesplittet und in frischem Medium resuspendiert.

Auf eine Mykoplasmeninfektion wurde einmal monatlich mittels PCR getestet.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung und Aussäen

Die Zellen wurden in Suspension genommen und im Verhältnis 1:2 mit Trypanblau versetzt, um abgestorbene Zellen abzugrenzen. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und die Zellzahl mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl} = \left(\frac{\# \text{ Zellen}}{\# \text{ Quadranten}} \right) \times 2 \times 10^3 \times 10$$

Trypan Blau Zählkammer- auf ml berechnet
 Verdünnungs- faktor
 faktor

Die Zellen wurden einen Tag vor Versuchsdurchführung in 6- bis 96-Well-Formaten, in einem definierten Volumen und mit definierter Zellzahl, ausgesät.

2.2.1.3 Zellen wegfrieren und auftauen

Die Zellen wurden in Suspension genommen und bei vier Grad Celsius mit 400 G in der Zentrifuge vom Medium getrennt. Danach wurden die Zellen in FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in Kryofläschchen gegeben und die Kryofläschchen in Isopropanol bei minus 80 °C weggefroren.

Die Kryofläschchen wurden unter warmem Wasser aufgetaut und die Zellen in Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bei vier Grad Celsius mit 400 G in der Zentrifuge vom Medium getrennt und in frischem Medium resuspendiert.

2.2.2 Stimulation von RIG-I

Um den RIG-I-Signalweg zu aktivieren, wurde ein spezifischer Ligand, ein RNA-Molekül, verwendet. Dieses mittels *In-vitro*-Transkription hergestellte RNA-Molekül besaß eine Haarnadelstruktur aus 44 Basen und einem Triphosphatrest am 5´Ende (5´-pppRNA). Die 5´-pppRNA hatte folgende Basensequenz: 3´-GCGCUAUCCAGCUUACGUAGAGCUC-*loop*-UACGUAAGCUGGAUAGCGC-5´.

Die Zellen wurden für die Transfektion am Vortag ausgesät und bei ca. 80 % Konfluenz transfiziert. Hierfür wurde das Transfektionsreagenz RNAiMAX von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die 5´-pppRNA wurde pro Bedingung in einer Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt. Pro Mikrogramm 5´-pppRNA wurden 3 µl an Transfektionsreagenz angesetzt. Die Agenzien wurden separat in gleichen Mengen Serum-depriviertem Medium (Opti-MEM™) für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurden 20 Vol.-% an Opti-MEM™ pro Bedingung eingesetzt, bezogen auf das sich in der Bedingung befindliche Volumen des Zellkulturmediums. Anschließend wurde das Transfektionsreagenz mit der 5´-pppRNA vermischt und zusammen für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und auf die sich im Medium befindlichen Zellen geträufelt.

2.2.3 Virusinfektion

Pro Bedingung wurden 25000 1205Lu-Zellen im 24-Well-Format in 500 µl Zellkulturmedium ausgesät und am übernächsten Tag mit Viren infiziert. Die Viren wurden in unterschiedlichen Verdünnungen verwendet. Dabei wurde die Multiplizität der Infektion (MOI) als Maß verwendet. Die Viren wurden dafür in Serumdepriviertem Medium verdünnt und in insgesamt 100 µl pro Bedingung verwendet.

Zur Bestimmung des Anteils der infizierten Zellen wurden die Zellen anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe unten).

2.2.4 Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay (ELISA)

In dieser Arbeit wurden für die Messung der Menge an humanem IL-6 und IP10 die *Kits* von BD Biosciences nach Herstellerangaben verwendet. Der Assay beruht auf dem *Sandwich*-ELISA. Dabei wird der primäre Antikörper durch sein Fc-Fragment an den Boden von Mikrotiterplatten gebunden. Danach werden die Platten mit den Proben – in diesem Fall den Überständen von mit 5'-pppRNA stimulierten 1205Lu-Zellen – inkubiert. Nach Waschen der Platten wird der Biotin gekoppelte, sekundäre Antikörper zugegeben. Zusätzlich wird das mit Streptavidin verbundene Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) zugegeben. Streptavidin bindet an Biotin, wodurch die Vernetzung mit dem sekundären Antikörper gewährleistet ist. Nach Inkubation und Zugabe des Substrats (Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid) katalysiert die Peroxidase einen Farbumschlag. Die Reaktion wird mit zweimolarer Schwefelsäure abgestoppt, und die Extinktion des hervorgerufenen Farbumschlags bei 450 nm Lichtwellenlänge bestimmt. Der Farbumschlag wurde mit dem Mikroplattenleser Mithras LB 940 von Berthold Technologies gemessen.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, die einzelne Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und spezifischer, an sie gebundener Fluoreszenzfarbstoffe

sortiert und analysiert. In dieser Arbeit wurde sie verwendet, um den Anteil virusinfizierter Zellen an der Gesamtpopulation zu bestimmen. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit *green fluorescent protein* (GFP) bzw. *yellow fluorescent protein* (YFP)-gelabelten Viren infiziert und nach 24 bzw. 72 Stunden für die auf der Durchflusszytometrie basierten Analyse vorbereitet. Hierzu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Trypsin/EDTA-Lösung in Suspension genommen. Die Reaktion wurde mit 100 µl Medium abgestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und mit 100 µl des Allophycocyanin-CY7-gekoppelten Totfarbstoffs Fixable Viability Dye von Thermo Fisher Scientific in einer Verdünnung von 1:5000 für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 % PFA für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und mit dem Durchflusszytometer FACSCanto II analysiert. Die Daten wurden mittels der Software FlowJo ausgewertet.

2.2.6 Transfektion von DNA-Plasmiden

Um Proteine transient in Zelllinien zu exprimieren, wurden die entsprechenden Expressionsplasmide in Opti-MEM™ verdünnt (20 % des im Well vorhandenen Volumens). Den verdünnten Plasmiden wurde das Transfektionsreagenz TransIT-X2® zugefügt. Für die Durchführung der Luciferaseassays wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 verwendet. Pro Mikrogramm verwendeter DNA wurden 2,5 µl an Transfektionsreagenz verwendet. Die DNA und das Transfektionsreagenz TransIT-X2® wurden zusammen für 30 Minuten, die DNA und Lipofectamin 2000 wurden für fünf Minuten bei Raumtemperatur gehalten und anschließend tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert.

2.2.7 Stabile Integration von Plasmid-DNA in 1205Lu-Zellen

Um Optineurin stabil in 1205Lu-Zellen zu überexprimieren, wurde die OptineurincDNA in den retroviralen Expressionsvektor pMXs-Puro kloniert. Zur Herstellung der Viren wurde das entsprechende Plasmid in Plat-A-Zellen transfiziert. Diese Zellen bilden konstitutiv die viralen Verpackungsproteine Gag und Env, wodurch

der Vektor in eine virale Hülle eingeschlossen werden kann. Zusätzlich exprimieren sie die reverse Transkriptase Pol.

Im 6-Well-Format wurden pro Well eine Million Plat-A-Zellen ausgesät. Um die Haftung der Plat-A-Zellen zu verbessern, wurden die Wells vorher mit Kollagen beschichtet. Am Folgetag wurden drei Wells mit 2 µg Vektor-DNA pro Well, die mit je 6 µl TransIT-X2® in 230 µl Serum-depriviertem Medium für 30 Minuten inkubiert wurden, transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurde der Überstand geerntet und durch 0,45 µm weite Millipormembranen gefiltert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der von den Zellen genommene Überstand wurde mit Zellkulturmedium ersetzt. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen, wurde dem gefilterten Überstand 4 µg Polybren/ml zugefügt und anschließend 2 ml/Well auf die am Vortag ausgesäten 1205Lu-Zellen gegeben. (3x 300000 Zellen im 6-Well-Format). Am darauffolgenden Tag wurde die Transduktion in der gleichen Durchführung wiederholt. Um die transduzierten Zellen zu selektieren, wurde das Zellkulturmedium mit 2µg/ml Puromycin versetzt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen, die den Vektor stabil in ihrem Genom integrierten, besaßen eine auf dem Vektor kodierte Resistenz gegen Puromycin. Zwei Tage nach Start der Selektion waren die untransduzierten Kontrollzellen gestorben, und die Selektion wurde gestoppt.

2.2.8 Generation von Optineurin-*knock-out*-Zellen mit der CRISPR/Cas9-Methode

Die CRISPR/Cas9-Methode ist ein Instrument, welches es ermöglicht, DNA zielgerichtet zu manipulieren. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) sind Abschnitte im bakteriellen Genom, die das adaptive Immunsystem der Bakterien dazu befähigen, Fremd-DNA zu erkennen und zu eliminieren. Dies wird durch das Enzym *CRISPR associated protein 9* (Cas9) ermöglicht, welches die CRISPR-RNA (cr-RNA) bindet. Diese RNA bindet wiederum komplementär an einen DNA-Abschnitt, der daraufhin in unmittelbarer Umgebung durch die Endonukleaseaktivität von Cas9 geschnitten wird. Zusätzlich zur cr-RNA wird eine, teilweise komplementäre, *trans-activating*-CRISPR-RNA (*tracr*-RNA) benötigt, die die Reifung der cr-RNA gewährleistet. Außerdem ist

die Anwesenheit des *protospacer adjacent motif* (PAM-Motiv) nötig, eine zwei bis fünf Nukleotide umfassende Sequenz am 3´Ende der cr-RNA, um Cas9 zu aktivieren. Die RNAs können als *single-guide*-RNA kombiniert werden, was dazu dient, dass nur zwei Komponenten für die Anwendung der Methode benötigt werden – eine sgRNA und das Enzym Cas9. Die in eukaryontischen Zellen durch Cas9 induzierten Doppelstrangbrüche werden entweder durch homologe Rekombination oder durch nicht-homologe End-zu-End-Rekombination repariert. Bei der nicht-homologen End-zu-End-Rekombination kommt es zu Fehlern innerhalb des Gens, mitunter kommt es zu Leserasterverschiebungen. Dadurch entstehen verfrühte Stopp-Codons, was ein falsches mRNA-Transkript hervorruft und so zum *knock-out* des Gens führt.

Das System wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, stabile Optineurin-*knock-out*-Zellen zu generieren. Hierzu wurden zwei verschiedene *single-guide*-RNAs, die sich gegen Exon 4 (OPTN-sgRNA-2) bzw. Exon 5 (OPTN-sgRNA-1) im Optineurin Genlokus richteten, in ein für das Protein Cas9 und eine Puromycinresistenz-kodierendes Plasmid (eSpCas9-Plasmid) kloniert. Die sgRNAs wurden mittels des Online-tools <http://chopchop.cbu.uib.no/> ermittelt. Es wurden sgRNAs mit hoher Effizienz und geringer Anzahl an *Off-target*-Sequenzen ausgewählt. Zusätzlich wurde eine Kontroll-RNA verwendet (*scrambled*-RNA), die keine bestimmte Zielsequenz hatte. Bei der verwendeten Cas9 handelte es sich im Ge-naueren um eine punktmutierte Cas9, die *enhanced*-Cas9-1.1 (eCas9-1.1). Diese weist eine höhere Spezifität durch weniger *Off-target*-Effekte auf (185). Die eCas9-1.1 büßt – anders als das wildtypische Protein – bei nicht-komplementärer Basenpaarung selbst am 5´-Ende an Effizienz ein. Da die Transkription des Plas-mids durch den U6-Promotor, jedoch zur Initiation ein Guanin benötigt, musste die sgRNA zusätzlich durch ein am 5`Ende komplementäres Guanin gewählt werden (186).

Pro sgRNA wurden 300000 1205Lu-Zellen in drei Wells eines 6-Well Formats ausgesät und mit 250 ng/ml eSPCas9-Plasmid, wie oben beschrieben, trans-fiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in 2 µg/ml Puromycin-haltigem Medium selektioniert. Das Selektionsmedium wurde täglich erneuert. Etwa 48 Stunden, nachdem die untransfizierten Kontrollzellen unter dem Selektionsdruck gestorben waren, wurde das Puromycin-haltige Medium durch norma-les Medium ersetzt. Die überlebenden Zellen wurden weiter in Kultur gehalten,

Einzelzellklone sowie *batches* der überlebenden Zellen wurden ausgesät und expandiert. Die Zellen wurden mittels Sanger-Sequenzierung bzw. mittels *next generation sequencing* auf ihren Mutationsstatus hin untersucht. Verwendet wurden bei den Einzelzellklonen jene, die auf beiden Allelen eine Leserasterverschiebende Mutation trugen.

2.3 Methoden der Proteinbiochemie

2.3.1 Erstellen von Zelllysaten für Western-Blots

Um Proben für die Detektion von verschiedenen Proteinen zu gewinnen, wurden Zelllysate erstellt. Die am Vortag im 6-Well-Format ausgesäten 1205Lu-Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und in 150 μ l Radioimmunoprecipitationsassay (RIPA)-Puffer lysiert. Dem RIPA-Puffer wurden vorher ein Proteaseinhibitorcocktail (1:100) und die Phosphataseinhibitoren Natriumorthovanadat (2 mM) und Natriumfluorid (5mM) zugefügt. Anschließend wurden die Zellen bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Zelllysate wurden von den Wells zusätzlich mit Zellscrapern abgelöst und in Eppendorf Gefäße überführt. Danach wurden die Lysate mit 14000 G bei 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde von den pelletierten Zelltrümmern separiert und die Proteinkonzentration bestimmt (siehe unten). Die Proteinkonzentrationen wurden angeglichen und anschließend mit 1x Lämmli-Puffer und fünf Volumenprozent β -Mercapoethanol bei 95 °C für 10 Minuten denaturiert.

Da die hochmolekularen MAVS-Aggregate pelletieren, wurden die abzentrifugierten Pellets zunächst mit RIPA-Puffer gewaschen und anschließend ebenfalls mit 1x Lämmli und β -Mercapoethanol bei 95 °C für 30 Minuten denaturiert.

2.3.2 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels des kolorimetrischen Tests DC™ Protein Assay von Biorad bestimmt und nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Assay beruht auf dem Lowry-Assay, bei welchem sich Kupfer (II)-Ionen in

alkalischer Lösung an Peptidbindungen anlagern. Die Kupfer-(II)-Ionen werden zu Kupfer-(I)-Ionen reduziert, was in einem zweiten Schritt zur Reduktion des Folin-Ciocalteu-Reagenz führt. Diese Reduktion sorgt für den Farbumschlag des Reagenzes, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm durch das Lambert-Beer'sche Gesetz bestimmt werden kann.

2.3.3 Sodium dodecyl sulfate Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der gewonnenen Proteinlysate wurden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen durchgeführt. Das in den Gelen vorhandene negativ geladene SDS bindet an Proteine in einem konstanten Ladungs-Masse-Verhältnis, wodurch die Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse/Größe ermöglicht wird. Im elektrischen Feld wandern die SDS-Protein-Komplexe durch die Polyacrylamidmatrix in Richtung Pluspol und werden somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurden zehn bzw. zwölf Prozent Polyacrylamid für die Gele verwendet. Die Gele wurden mit 10 bis 40 µg Gesamtprotein beladen. Gleichzeitig wurde eine vorgefärbte Proteinleiter (PageRuler™) aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 1x Running-Puffer und 100 Volt für 30 Minuten gestartet und mit 150 Volt bis zum vollständigen Durchlaufen des Gels fortgeführt.

2.3.4 Western-Blot

Der Proteintransfer erfolgte mittels eines *Wet-Blotting*-Verfahrens in 1x Transferpuffer auf eine vorher in Methanol aktivierte Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran mit einer Porengröße von 0,2–0,45 µm. Die Proteine wurden durch Elektrottransfer bei 250 mA für zwei Stunden auf die PVDF Membranen überführt. Diese Membranen binden die Proteine durch hydrophobe und polare Wechselwirkungen. Im Anschluss wurden die Membranen mit fünfprozentiger Milch oder dreiprozentigem bovinem Serumalbumin (BSA) in Tris-*buffered-saline* mit Tween (TBS-T), – was als *Blocking*-Puffer dient – für eine Stunde bei Raumtemperatur oder 4 °C über Nacht inkubiert, um die restlichen Proteinbindungsstellen zu besetzen. Um die gesuchten Proteine zu visualisieren, wurden diese für zwei Stunden

bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht mit dem spezifischen primären Antikörper in 3 bis 5 prozentigem BSA in TBS-T inkubiert. Die Konzentration der Antikörper wurden nach Herstellerangaben eingesetzt. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper wurden die Membranen drei Mal für fünf Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde der gegen den primären Antikörper gerichtete, mit HRP gekoppelte, sekundäre Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1:3000 in dem vorher verwendeten *Blocking-Puffer* angesetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den Membranen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen erneut drei Mal in TBS-T gewaschen.

Das SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, das SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate oder das Clarity™ Western ECL Blotting Substrate wurden verwendet, um die HRP-Reaktion zu katalysieren. Mit dem ChemiDoc-System von Biorad wurde die Reaktion anschließend sichtbar gemacht.

2.3.5 Ko-Immunpräzipitation

Ko-Immunpräzipitationen wurden in dieser Arbeit durchgeführt, um die Interaktion zwischen Proteinen zu analysieren. Bindet ein Antikörper an ein Protein A, kann bei Interaktion mit Protein B dieses gegebenenfalls mit präzipitiert und anschließend mittels Western-Blot sichtbar gemacht werden.

Vier Millionen Hek293T Zellen wurden in 10 cm Schalen ausgesät und mit insgesamt 500 µg Plasmid DNA pro ml Medium wie oben beschrieben transfiziert. Die Plasmide kodierten für die Proteine, deren Interaktion es zu untersuchen galt (MAVS bzw. OPTN). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 500 µl RIPA-Puffer, dem vorher der Proteaseinhibitorcocktail (1:100) und die Phosphataseinhibitoren Natriumorthovanadat (2 mM) und Natriumfluorid (5 mM) zugefügt wurden, lysiert. Die Zellen wurden bei 4 °C für 30 Minuten inkubiert und anschließend mit Zellscrapern abgelöst. Danach wurden die Zellen sonifiziert, um die pelettierten MAVS-Aggregate in Lösung zu bringen. Die Sonifikation wurde für zehn Sekunden mit darauffolgender Pause von zehn Sekunden dreimalig auf Eis ausgeführt. Die Lysate wurden bei 14000 G für zehn Minuten bei 4 °C

zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und darin die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 2.3.2.). Für jede Immunpräzipitation wurde 1 mg Gesamtprotein in jeweils einem Milliliter verwendet. Den Lysaten wurden, um unspezifische Bindungen herauszufiltern, 50 µl einer 50-prozentigen Suspension an Sepharose-*beads* in PBS zugefügt. Mit diesen wurden die Proben eine Stunde bei 4 °C unter dauerhafter Rotation inkubiert. Die verwendeten Sepharose-*beads* wurden vorher für mindestens zwei Stunden mit 2 % BSA in PBS geblockt und vor der Verwendung zwei Mal in PBS gewaschen. Die Sepharose-*beads* wurden bei 3000 G für eine Minute abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Dem Überstand wurde der spezifische Antikörper bzw. 50 µl einer 50-prozentigen Suspension aus Anti-Flag-gekoppelten Sepharose-*beads* in PBS zugefügt und bei 4 °C über Nacht unter ständiger Rotation inkubiert. Die Anti-Flag-gekoppelten Sepharose-*beads* wurden im Vorhinein wie die anderen *beads* geblockt. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben verwendet. Den mit Antikörpern inkubierten Proben wurden am Folgetag erneut 50 µl der 50-prozentigen Suspension an Sepharose-*beads* zugefügt und für 3 bis 4 Stunden bei 4 °C inkubiert, um die Antikörper zu präzipitieren. Die Proben wurden bei 3000 G für eine Minute zentrifugiert und vom Überstand separiert. Der Überstand wurde mit 1x Lämmli und 5 Volumenprozent β-Mercaptoethanol für zehn Minuten bei 95 °C inkubiert. Die *beads* wurden drei Mal mit dem angesetzten RIPA-Puffer gewaschen und danach mit 50 µl 1x Lämmli und einer 1:100 Verdünnung von β-Mercaptoethanol bei 95 °C für fünf Minuten inkubiert. Die *beads* wurden bei 16000 G für zwei Minuten zentrifugiert. Von dem sich davon abgesetzten Überstand wurden 15 µl für den anschließenden Western-Blot verwendet.

2.3.6 Luciferase-Assay

Luciferase-Assays dienen unter anderem dazu, die Promotoraktivität bestimmter Gene zu bestimmen. Dabei ist dem gesuchten Promotor das für das Enzym Luciferase kodierende Gen nachgeschaltet. Wird der Promotor aktiviert, wird die Luciferase exprimiert. Sie oxidiert Luciferin, welches durch die Reaktion in einen angeregten Zustand überführt wird und bei Zerfall Licht emittiert. Die Lichtemission kann anschließend gemessen werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Luciferase-Assays wurden 30000 Hek293T-Zellen pro Well in einem 96-Wellformat ausgesät und bei 70%iger Konfluenz am Folgetag transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit 4 ng Renilla-Reporterplasmid, 40 ng NF- κ B bzw. IFN- β -Reporterplasmid. Die Verwendung des Renilla-Reporterplasmids diente der internen Transfektionseffizienzkontrolle. Zusätzlich wurden 25 ng des jeweiligen Induktionsplasmids (RIG-I, MAVS, TBK1, IRF3-5D, pcDNA3.1) und 0 bis 150 ng Optineurin pro Well transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie oben angegeben. Alle Konditionen wurden mit dem Leervektor pcDNA3.1 auf insgesamt 219 ng DNA angeglichen und mit 0,55 μ l Lipofectamin 2000 pro Well transfiziert (ca. 90 % der Sequenz des *Backbone*-Vektors des Optineurinexpressionsplasmids waren homolog zu pcDNA3.1). Alle Bedingungen wurden in sechs technischen Replikaten durchgeführt. 18 Stunden nach Transfektion wurden die mit RIG-I transfizierten Wells mit 500 ng/ml 5'-pppRNA stimuliert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen in 60 μ l von 1x Passiv-Lysis-buffer von Promega für mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit jeweils 20 μ l auf zwei weiße Mikrotiterplatten aufgeteilt. Die eine Hälfte der Proben wurde mit 20 μ l Renillasubstrat (Coelenterazine-h (1:800 in ddH₂O)), die andere Hälfte mit 20 μ l Luciferasesubstrat inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit dem Mikroplattenleser „Mithras LB 940“ von Berthold Technologies gemessen.

2.4 Methoden der Molekularbiologie

2.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit dafür verwendet, die *complementary DNA* (cDNA) von Optineurin zu amplifizieren und gleichzeitig Überhänge für eine anschließende Ligation bzw. für den anschließenden Restriktionsverdau zu generieren. Dafür wurden Primer designt, die die mRNA von Optineurin spezifisch binden und gleichzeitig am 5'- und 3'-Ende die entsprechenden Überhänge besitzen. Die PCR wurde mit der Phusion High Fidelity DNA-Polymerase unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Komponenten	Volumen bzw. Menge
5x Phusion HF Buffer	10 μ l
dNTPs (10 mM)	1 μ l
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	2,5 μ l
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	2,5 μ l
Plasmid DNA	1-10 ng
Phusion-DNA-Polymerase	0,2 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l

Die PCR wurde im Thermocycler unter folgenden Zyklusbedingungen ausgeführt:

Kondition	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	} 35 Zyk-
Primerhybridisierung	mittels „Tm-Calculator“ von Thermo Fisher Sci- entific ermittelt	10 sec	
Elongation	72 °C	30 sec/Kilobase	
Finale Elongation	72 °C	5 min	
<i>Hold</i>	4 °C	∞	

2.4.2 DNA-Gelelektrophorese

Für die Aufreinigung verdauter Plasmid-DNA oder amplifizierter cDNA wurden die Proben über ein Agarose-Gel aufgetrennt. Das Agarose-Gel wurde abhängig von der Größe des DNA-Fragments mit 1 bis 1,5 % Agarose in TAE-Puffer angesetzt. Diesem wurde, um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, 3,5 μ l DNA

Stain Clear G pro 100 ml zugefügt. DNA Stain Clear G bindet an DNA und RNA und emittiert in gebundenem Zustand unter UV-Licht eine grüne Fluoreszenz. Den Proben wurde 1x DNA-Gel-Ladefarbstoff zugefügt, um die Proben während der Elektrophorese für das bloße Auge sichtbar zu machen. Außerdem lief eine DNA-Leiter bekannter Größe mit den Proben. Das Gel wurde an eine Stromquelle mit 100 bis 150 Volt angeschlossen. Nach der Auftrennung der DNA im elektrischen Feld nach ihrer Größe wurden die gesuchten Banden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt.

2.4.3 DNA Aufreinigung

Aus Gelen ausgeschnittene DNA oder die aus einem Restriktionsverdau stammende DNA wurde mit dem Zymoclean Gel DNA Recovery Kit von Zymo Research über ein Säulensystem aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der gewonnenen DNA wurde mittels des NanoDrop 2000c Spektralphotometers bestimmt

2.4.4 Restriktionsverdau

Um komplementäre Enden des gewünschten Expressionsplasmids und der cDNA von Optineurin zu erstellen, wurden der Vektor und die vorher amplifizierte und aufgereinigte cDNA mit entsprechenden Überhängen mittels Restriktionsenzymen geschnitten. Dafür wurde folgender Ansatz verwendet:

Bestandteile	Volumen
4x Puffer (Cutsmart)	4 µl
Restriktionsenzym 1	1 µl
Restriktionsenzym 2	1 µl

<i>Template</i>	2 µg Plasmid DNA/ 30 µl cDNA
H ₂ O	ad 40 µl

Der Ansatz wurde bei 37 °C für zwei Stunden inkubiert. Nach einer Stunde wurde 1 µl von alkaliner Phosphatase (FastAP) dem Verdau des Vektors zugefügt, um der Rezirkulation des Vektors während der anschließenden Ligation vorzubeugen. Der verdaute Vektor wurde über ein Gel aufgereinigt, während die verdaute cDNA nur mittels des Zymoclean Gel DNA Recovery Kits aufgereinigt wurde.

2.4.5 Ligation

Nach Restriktionsverdau und DNA-Aufreinigung wurden Vektor und Zielsequenz ligiert. Hierbei wurden die Molarität von Vektor und Insert in den Verhältnissen 1:1 bzw. 1:3 verwendet. Dabei wurden ca. 100 ng Gesamt-DNA-Konzentration eingesetzt.

Bestandteile	Volumen/Menge
DNA	ca. 100 ng
2x Puffer	2 µl
T4 Ligase	1 µl
H ₂ O	Ad 20 µl

Die Ligation wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Auf die Ligation folgte die unten aufgeführte Bakterientransformation.

2.4.6 In-Fusion-Cloning

In-Fusion-Cloning wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Optineurin-cDNA in den pLVX-tight-Puro-Vektor zu klonieren. Die Methode beruht auf der

Anlagerung komplementärer Enden von Vektor und *insert*, ohne, dass dabei eine Ligation durchgeführt wird. Hierzu wurden Primer designt, die am 5'-Ende homolog zum gewünschten Vektor und am 3'-Ende homolog zum gewünschten *insert* waren. Mit diesen Primern wurde die Optineurin-cDNA amplifiziert. Die PCR wurde mit dem CloneAmp HiFi PCR Premix durchgeführt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

Bestandteile	Volumen
CloneAmp HIFI PCR Premix	12,5 µl
<i>Forward</i> Primer	1 µl
<i>Reverse</i> Primer	1 µl
<i>Template</i>	1 ng
H ₂ O	ad 25 µl

Die PCR wurde im Thermocycler unter folgenden Zyklusbedingungen ausgeführt:

Kondition	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	} 35 Zyk-
Primerhybridisierung	55 °C	15 sec	
Elongation	72 °C	10 sec/Kilobase	
Finale Elongation	72 °C	2 min	
Hold	4 °C	∞	

Das PCR-Produkt lief anschließend über ein Agarosegel und wurde wie oben beschrieben aufgereinigt. Der Vektor wurde mittels des Restriktionsenzym E-coR1 linearisiert und ebenfalls über ein Agarosegel aufgereinigt. Für die

anschließende *In-Fusion Cloning*-Reaktion wurden Vektor und *insert* in einem Molaren-Verhältnis von 1 zu 2 verwendet. Der Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteile	Volumen bzw. Menge
5x In-Fusion HD Enzyme Premix	2 μ l
PCR Fragment	30 ng
Linearisierter Vektor	70 ng
H ₂ O	ad 10 μ l

Die Reaktion wurde für 15 Minuten bei 50 °C inkubiert. Darauf folgte die Transformation kompetenter Bakterien.

2.4.7 Transformation von DNA in kompetente Bakterien

Für die Amplifikation eines gewünschten Plasmids wurden 50 μ l kompetenter Bakterien (DH5-alpha, MACH1 oder Stellar) auf Eis gestellt und mit 2 bis 5 μ l Ligationsansatz bzw. *In-Fusion-Cloning*-Reaktionsansatz 30 Minuten lang inkubiert. Der Hitzeschock wurde anschließend bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Um den Bakterien Zeit für die Expression der jeweiligen Resistenz (gegen Ampicillin oder Kanamycin), die auf dem transformierten Plasmid kodierte, zu geben, wurde den Bakterien ein Milliliter *Lysogeny-broth*-Medium (LB-Medium) zugefügt und diese anschließend bei 37 °C bei 180 *revolutions per minute* (RPM) für eine Stunde im Inkubator gehalten. Die Bakterien wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 3000 G von dem LB-Medium getrennt und auf mit Antibiotikum versetzten Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Bakterienkolonien gepickt und in 5 ml Ampicillin oder Kanamycin enthaltendem LB-Medium bei 37 °C bei 180 RPM über Nacht inkubiert, um das Plasmid weiter zu amplifizieren. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert.

2.4.8 Plasmid Purifikation

Für die Isolation von in Bakterien amplifizierten Plasmiden wurde das GeneJET-Plasmid-Miniprep-Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet und dabei nach den Herstellerangaben vorgegangen. Dabei werden die Bakterien alkalisch lysiert und nach Neutralisation – die zu Ausfällung von Zelltrümmern sowie chromosomaler DNA führt – wird der Überstand abzentrifugiert. Chaotrope Salze stören die Wasserstoffbrückenbindungen der Plasmide und heben so die Bindung an Wassermoleküle auf. Das Lysat wird auf Kieselgelsäulen appliziert. Die Plasmid-DNA bindet nun an die Säulen. Nach Waschen der Säulen mit Ethanol wird die gebundene DNA in destilliertem Wasser eluiert.

2.4.9 cDNA-Gewinn und *Real-time-quantitative-PCR*

Die *reverse transcribed-quantitative-PCR* (RT-qPCR) ist eine Methode, um die mRNA-Expression bestimmter Gene zu quantifizieren. Dafür wird zunächst mRNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben.

Die mRNA wurde aus 1205Lu-Zellen gewonnen. Diese wurden am Vortag im 24-Well-Format ausgesät (60000 Zellen/Well) und bei 80 %iger Konfluenz mit 5'-pppRNA stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die RNA mittels dem peqGOLD Total RNA Kit von VWR laut Herstellerangaben isoliert.

Um cDNA zu generieren, wurde eine reverse Transkription durchgeführt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

Bestandteile	Volumen
5x Reverse Transkription-Puffer	4 µl
Oligo (dT) Primer	2 µl
dNTPs	2 µl
RiboLock RNase Inhibitor	0,5 µl
RevertAid H Minus Reverse Transkriptase	0,5 µl

RNA	≈ 200 ng
H ₂ O	ad 20 µl

Der Ansatz wurde für 60 Minuten bei 42 °C inkubiert und für weitere 10 Minuten auf 70 °C erhitzt.

Für die Quantifizierung der cDNA-Zielsequenzen wird eine PCR durchgeführt unter Zugabe von fluoreszierenden Sonden, die an eine Sequenz innerhalb des gewünschten Gens binden. Die Sonden bestehen aus einem Reporterfluoreszenzfarbstoff und einem *quencher*. Sind der Reporter und der *quencher* in räumlicher Nähe zueinander, kommt es zum Förster-Resonanzenergietransfer. Hier wird die Energie des Rezeptors auf den *quencher* übertragen, wodurch keine Lichtemission des Reporters zustande kommt. Bei der Elongation trennt die eingesetzte Polymerase Reporter und *quencher* durch ihre Exonukleaseaktivität voneinander. Jetzt kann der Reporter Licht nach Anregung emittieren. Die Fluoreszenz steigt proportional zur Menge des DNA-*templates*. Die Quantifizierung wird nach Ablauf der PCR in der exponentiellen Phase der *Template*-Amplifizierung durchgeführt. Um eine absolute Quantifizierung durchzuführen, muss eine Referenzprobe mitgeführt werden, deren Kopienanzahl vorher bekannt ist. Für eine relative Quantifizierung, die in dieser Arbeit durchgeführt wurde, wird ein Referenzgen (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, HPRT) mitgeführt, das von den Versuchsbedingungen nicht in seiner Expression beeinflusst wird. Anschließend wird auf dieses Referenzgen normiert.

Die RT-qPCR wurde mit einem LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) und dem Programm *Mono Color Hydrolysis Probe* unter folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt:

Kondition	Temperatur	Zeit	
Präinkubation	95 °C	10 min	
Amplifikation	95 °C	10 sec	} 45 Zyk-
	60 °C	30 sec	

Kühlung	40 °C	30 sec
---------	-------	--------

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

Bestandteil	10µl Reaktion	Endkonzentration
Probe qPCR 2x Mix	5 µl	1x
<i>Forward</i> Primer	0,2 µl	0,5 µM
<i>Reverse</i> Primer	0,2 µl	0,5 µM
Sonde	0,1 µl	0,1 µM
cDNA	3 µl	
H ₂ O	1,5 µl	

3. Ergebnisse

3.1 Optineurin hat einen negativen Einfluss auf den RLR-Signalweg

3.1.1 Optineurin-defiziente Zellen zeigen eine gesteigerte Expression antiviraler Zytokine nach RIG-I-Stimulation

Um die Rolle von Optineurin im RLR-Signalweg zu charakterisieren, wurden *Knock-out*-Klone von Viktoria Bothe mittels der CRISPR/Cas9-Methode generiert (127). Die durch Puromycin selektierten Klone wurden mit der Sanger-Methode sequenziert. Die Klone, die hier Leseraster-Mutationen aufwiesen, wurden mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 5 A).

Die Western-Blot-Daten zeigten über den Nachweis von Cas9, dass Klon #2 das CRISPR/Cas9-Plasmid, trotz transienter Transfektion, weiterhin exprimiert. Wenn das Plasmid stabil in das Genom integriert wird, ist eine Rekonstitution des *knock-outs* unter Umständen nicht möglich. Anderweitige störende Effekte sind nicht auszuschließen, weshalb dieser Klon für weitere Experimente nicht verwendet wurde. Klon #4 und #8 zeigten weiterhin geringe Expressionslevel an Optineurin, weshalb in dieser Arbeit Klon #6, der weder Optineurin noch Cas9 exprimiert, für die folgenden Experimente verwendet wurde.

Der spezifische RIG-I-Ligand 5'-pppRNA führt zur Konformationsänderung von RIG-I, wodurch die CARD-Domäne freigelegt und das MAVS „Signalosom“ aktiviert wird. Ausgehend von MAVS werden die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3 aktiviert. Diese führen wiederum zur Expression von verschiedenen antiviralen und proinflammatorischen Zytokinen, unter anderem von IP10, ISG15, IL6 und IL-1b. Die IP10-Produktion unterliegt dabei der Kontrolle von NF- κ B und IRF3, ISG 15 im Wesentlichen von IRF, während die IL6- und IL1b Produktion im Wesentlichen das Resultat der Bindung von NF- κ B an seinen Promotor ist. Somit können über die Messung dieser Zytokine beide Arme des *downstream* von MAVS gelegenen Signalwegs beleuchtet werden.

Um zu charakterisieren, ob Optineurin einen Einfluss auf die durch RIG-I-Aktivierung angestoßene Zytokinproduktion hat, wurden 1205Lu-Wildtyp-Zellen und der Optineurin-*knock-out*-Klon #6 mit 5'-pppRNA stimuliert. Nach sechs Stunden

wurden die Überstände gesammelt und mittels ELISA die Konzentrationen von IP10 und IL6 bestimmt. Es zeigte sich, dass 1205Lu-Zellen ohne Optineurin eine stärkere Expression von sowohl IP10 als auch IL6 nach Stimulation aufwiesen, verglichen mit wildtypischen Zellen (Abbildung 5 D, E). Somit scheint Optineurin einen negativen Einfluss auf beide Arme des stromabwärts von MAVS gelegenen Signalwegs zu haben.

Um zu bestätigen, dass Optineurin seinen Einfluss auf die durch RIG-I-Aktivierung angestoßene Zytokinproduktion auf Ebene der mRNA Expression ausübt, wurden wieder 1205Lu-Wildtyp-Zellen und Optineurin-*knock-out* Zellen mit 5'-pppRNA stimuliert. Nach zwei, sechs und zwölf Stunden wurden die Zellen lysiert, RNA isoliert, und die Expression der Zytokine IP10, IL6, ISG15 und IL1 β mittels RT-qPCR ermittelt (Abbildung 5 F bis I). Zu allen gemessenen Zeitpunkten nach der Stimulation mit 5'-pppRNA lag die mRNA Expression der angegebenen Zytokine in den Optineurin-defizienten Zellen über denen der wildtypischen Zellen.

Zusammenfassend deuten die gezeigten Daten darauf hin, dass Optineurin als negativer Regulator im RLR-Signalweg fungiert, und sowohl der NF- κ B als auch der IRF-3 gesteuerte Signalweg negativ von Optineurin beeinflusst werden.

3.1.2 1205Lu-Zellen zeigen eine gesteigerte Expression von Optineurin nach RIG-I-Stimulation

Einen weiteren Hinweis darauf, dass Optineurin eine Rolle im RLR-Signalweg spielen könnte, bieten folgende Daten:

1205Lu-WT-Zellen wurden mit 500 ng/ml 5'-pppRNA stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die OPTN-cDNA-Kopien wurden mittels RT-qPCR gemessen und auf die HPRT-cDNA-Kopien normiert. Die mRNA-Expression von Optineurin zeigte einen signifikanten Anstieg 6 Stunden nach 5'-pppRNA-Stimulation (Abb. 5 C). Dies kann als Rückkopplung innerhalb des RIG-I-Signalwegs interpretiert werden.

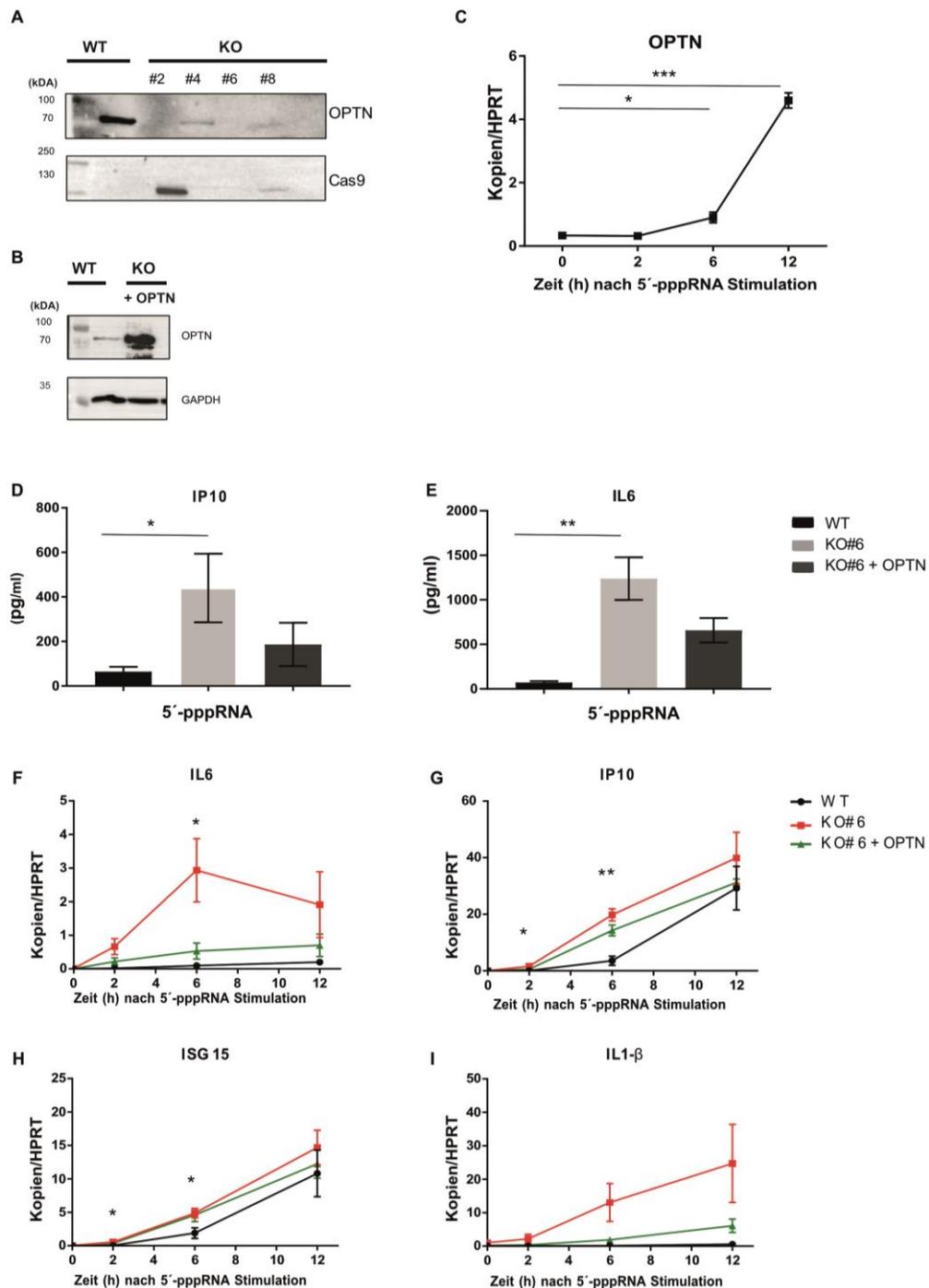


Abbildung 5. Optneurindefizienz steigert die RLR-getriggerte Immunantwort. OPTN-knock-out-Klone wurden durch die CRISPR/Cas9-Technologie in 1205Lu-Zellen generiert. Klone, die in der Analyse homozygote oder *compound*-heterozygote Leseraster-Mutationen zeigten, sowie WT-Zellen wurden mittels Western-Blots auf die Expression von (A) OPTN und Cas9 hin analysiert. (B) OPTN-knock-out-Klon #6 (KO #6) wurde mit einem OPTN stabil überexprimierenden Plasmid transduziert und auf dessen Expression hin mittels Western-Blots analysiert. (C) 1205Lu-WT-Zellen wurden mit 500 ng/ml 5'-pppRNA stimuliert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde die mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben, die OPTN-cDNA-Kopien mittels RT-qPCR gemessen und auf die HPRT-cDNA-Kopien normiert.

1205-Lu-WT-Zellen, KO #6, und der Optineurin überexprimierende KO #6 (KO #6 + OPTN) wurden mit 500ng/ml 5'-pppRNA stimuliert. Nach sechs Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Konzentration von (D) IP-10 bzw. (E) IL-6 mittels ELISA gemessen. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM.

1205 Lu WT Zellen, Optineurin-KO #6, und der Optineurin überexprimierende KO#6 wurden wie bei (C) behandelt und die angegebenen Zytokin-cDNA Level (F-I) gemessen. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM (F-I) Die ermittelten P-Werte vergleichen WT und KO #6 mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test * $p < 0,5$; ** $p < 0.01$

3.1.3 Die Rekonstitution des Optineurin-*knock-outs* führt zur Suppression der antiviralen Zytokinantwort nach RIG-I Stimulation

Bei dem Erstellen des Optineurin-*knock-outs* mit dem Crispr/Cas9 System ist nicht auszuschließen, dass *Off-target*-Effekte und klonale Effekte zum Tragen kommen. Um herauszukristallisieren, ob der gesehene Effekt tatsächlich auf der Abwesenheit von Optineurin basiert, sollte die Optineurin-defiziente Zelllinie mit Optineurin rekonstituiert werden. Zu diesem Zweck wurde Optineurin einerseits in ein Expressionsplasmid kloniert, welches Optineurin konstitutiv überexprimierte, andererseits wurde es in ein Expressionsplasmid kloniert, welches Optineurin Doxycyclin-abhängig exprimierte. Beide Plasmide wurden jeweils in die *Knock-out*-Zellen transduziert.

Obwohl das Doxycyclin-abhängige System vielversprechend erschien, da es auch dosisabhängige Effekte zeigen kann, stellte es sich für die Untersuchung des Effekts von Optineurin auf das RLR-Signaling letztlich als nicht geeignet heraus. Es zeigte sich, dass Doxycyclin selbst einen negativen Effekt auf die Induktion antiviraler Zytokine hatte, unabhängig von der Optineurinexpression. Untransduzierte, mit Doxycyclin behandelte Zellen zeigten geringere Expressionslevel antiviraler Zytokine nach 5'-pppRNA-Stimulation, verglichen mit unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine Erklärung hierfür liefert die Arbeit von Xing et al.. Hier wurde gezeigt, dass Doxycyclin Mitophagie induziert und einen negativen Einfluss auf die durch transfiziertes Poly(I:C) getriggerte IFN- β -Antwort hat (187). Da die Mitochondrien als Plattform der MAVS-Aggregation den zentralen Knotenpunkt in der RIG-I-getriggerten antiviralen Signaltransduktion darstellen, hat deren Disruption Einfluss auf die Signalantwort. Angesichts dessen wurde entschieden das Doxycyclin-abhängige System für die Fragestellung,

inwiefern Optineurin Einfluss auf das antivirale Signaling hat, nicht weiter zu verwenden.

Aus diesem Grund wurde mit dem Optineurin stabil überexprimierenden System gearbeitet. Hierzu wurde die Optineurin-mRNA in das Expressionsplasmid pMXs-Puro eingebracht. Die Optineurin-mRNA unterlag hier der Kontrolle eines Promotors des *5'-long-terminal-repeats* eines retroviralen Plasmids, der eine konstitutive Überexpression gewährleistete. Der Erfolg der Transduktion wurde mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 5 B). Die mit dem Expressionsplasmid pMXs-Puro transduzierten Zellen zeigten gegenüber den untransduzierten Zellen deutlich erhöhte Optineurinlevel.

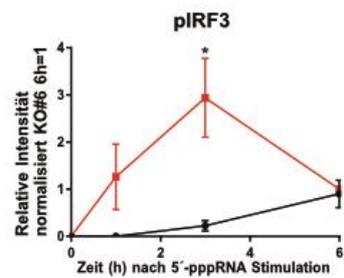
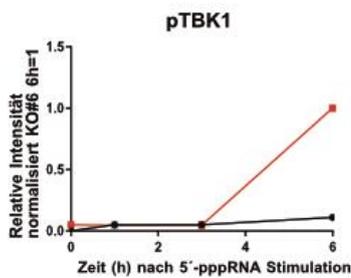
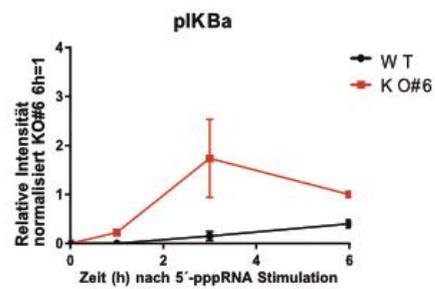
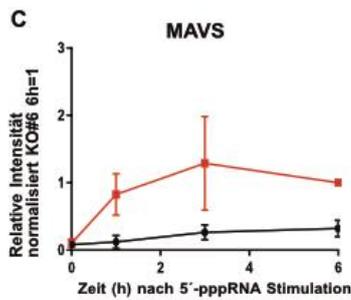
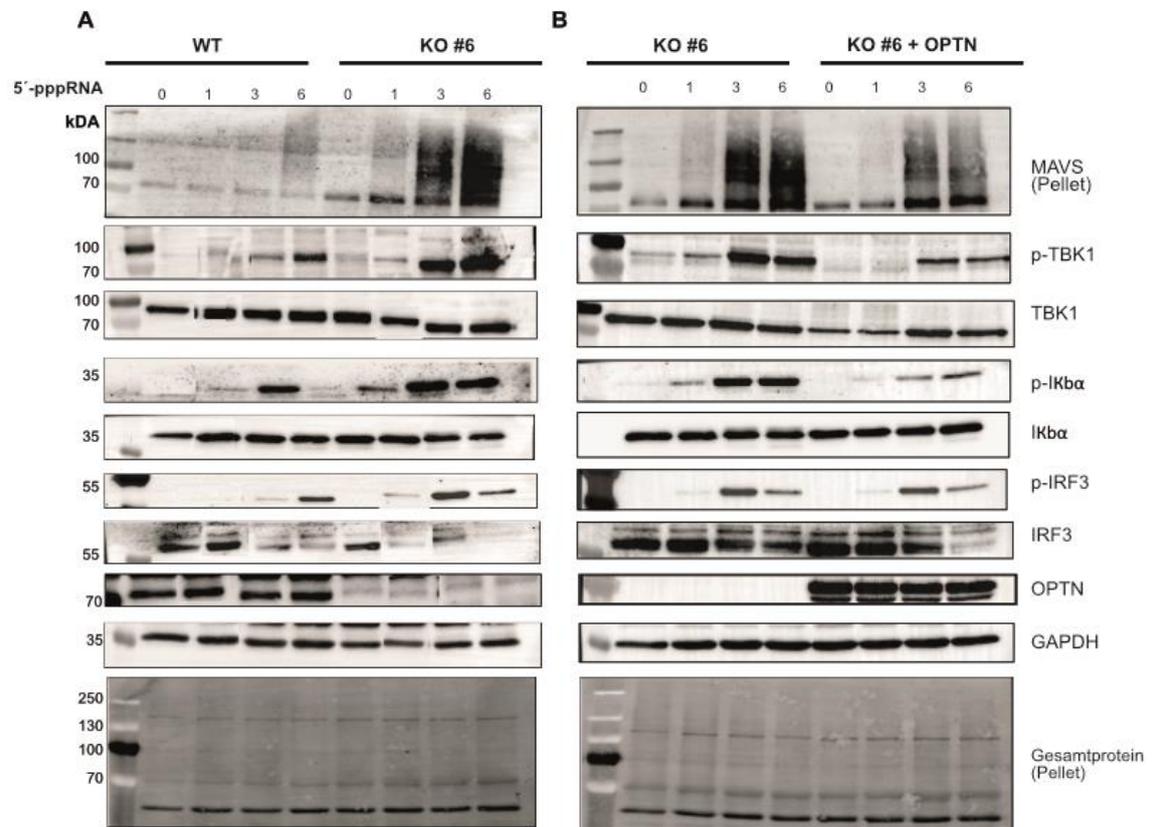
Der rekonstituierte *knock-out* wurde auf sein Verhalten nach 5'-pppRNA-Stimulation hin untersucht. Es zeigte sich, dass die IP10- und IL6-Produktion nach Rekonstitution abgeschwächt ausfiel (Abbildung 5 D bis E). Auch auf mRNA-Ebene zeigten die genannten proinflammatorischen Zytokine IP10 und IL6 sowie ISG15 und IL1 β zu allen Zeitpunkten durch das Rekonstituieren von Optineurin eine Suppression nach 5'-pppRNA-Stimulation gegenüber dem *knock-out* (Abbildung 5 F bis I).

In der Zusammenschau lässt sich festhalten, dass die Rekonstitution des Optineurin-*knock-out* zu einer Umkehrung des Phänotyps führt, was für die Vermittlung des antiinflammatorischen Effekts spezifisch durch Optineurin spricht.

3.1.4 Optineurin hat einen negativen Einfluss auf die Aktivierung der Signalmoleküle stromabwärts von MAVS

Die Expression der gemessenen antiviralen Zytokine ist das Resultat der Signalkaskade, die anschließend an die RIG-I-Stimulation stattfindet. Die Hauptüberträger der Signalkaskade sind unter anderem MAVS und TBK1, die wiederum zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF-3 führen. Um zu beleuchten, in welchem Rahmen die Aktivierung dieser Signaltransduktionsproteine durch Optineurin beeinflusst werden, wurden Western-Blots erstellt und die Phosphorylierung der Signaltransduktoren – und damit die subsequente Signalübertragung – untersucht. Es wurden die bereits erwähnten Zelllinien verwendet

und erneut mit 5'-pppRNA stimuliert. Nach einer, drei und sechs Stunden wurden die Zellen lysiert.



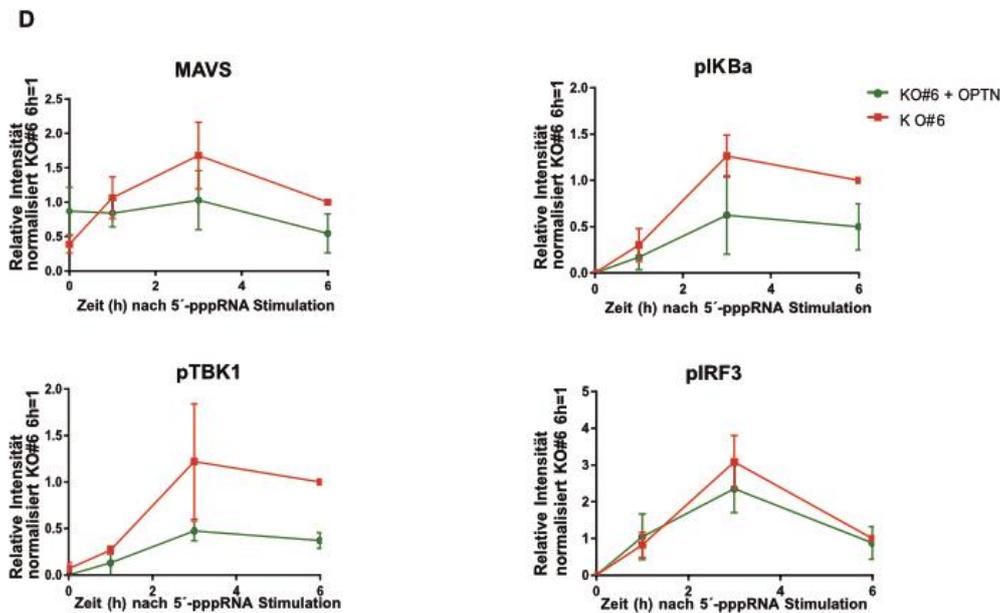


Abbildung 6. Optineurin hat einen negativen Einfluss auf die Aktivierung der Signalmoleküle stromabwärts von MAVS (A, B) 1205Lu-WT-Zellen, OPTN-KO #6 und der rekonstituierte KO #6 wurden mit 5'-pppRNA stimuliert. Nach einer, drei und sechs Stunden wurden die Zellen lysiert. Anschließend wurde das Lysat durch Western-Blots auf die Aktivierung der angegebenen Signalmoleküle hin analysiert. Die hier gezeigten Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente (ausgenommen pTBK1 mit $n=2$). (C, D) Die Chemilumineszenz der Signale wurde mit Image-Lab ausgewertet und auf den Sechs-Stunden-Zeitpunkt des OPTN-KO #6 normiert. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM (ausgenommen C) pTBK1 $n=1$ und D) pTBK1 $n=2$). Die ermittelten P-Werte vergleichen WT und KO #6 mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

Übereinstimmend mit den bisher erhobenen Daten konnte gezeigt werden, dass auch die Moleküle der Signalkaskade von Optineurin negativ reguliert wurden (Abbildung 6). Zunächst wurden die Optineurin-defizienten Zellen mit dem Wildtyp verglichen. Alle der untersuchten Signalmoleküle zeigten eine vermehrte Aktivierung im *knock-out* verglichen mit dem Wildtyp. Es war zu festzustellen, dass auch hier sowohl der NF- κ B - als auch der IRF-3-Arm der von MAVS ausgehenden Signaltransduktion in Anwesenheit von Optineurin supprimiert wurden. Sowohl die Phosphorylierung von TBK1 und IRF-3, als auch die Phospho-IK β α -Proteinlevel wiesen im *knock-out* eine Zunahme auf (Abbildung 6A).

Bei Gegenüberstellung des *knock-out* mit seiner rekonstituierten Variante konnte erneut die Umkehrung dieses Effekts festgestellt werden. Auch hier führte die Überexpression von Optineurin zu einer Verminderung der Aktivierung der Signalmoleküle (Abbildung 6B).

Die Tatsache, dass beide Arme des Signalwegs von der Anwesenheit Optineurins abhängig zu sein scheinen, spricht für einen Effekt oberhalb der Auftrennung beider Arme und könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Aggregation von MAVS, und somit die Bildung der Signalplattform selbst, von Optineurin abgeschwächt wird. Bei Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer bleiben die MAVS-Aggregate in unlöslicher Form und pelletieren nach Zentrifugation. Diese Aggregate von MAVS können im Western-Blot nach Kochen des Pellets durch Bildung eines Multimer-„Schmiers“ sichtbar gemacht werden. Im *knock-out* zeigte sich gegenüber dem Wildtyp eine verstärkte Bildung dieser Aggregate (Abbildung 6A), während dieser im rekonstituierten *knock-out* gegenüber den Optineurin-defizienten Zellen abgemindert wurde (Abbildung 6B). Dabei war die MAVS-Aggregation bereits zum Einstundenzeitpunkt betroffen. Die Tatsache, dass bereits frühe Zeitpunkte nach Anwerfen der Signalkaskade von Optineurin beeinflusst werden, war insofern zu erwarten, als die ursprüngliche Untersuchung der neuen MAVS-Interaktionspartner eine Stunde nach Stimulation stattfand (127).

Die Intensität des Signals der jeweiligen Banden wurde analysiert und auf das Gesamtproteinlevel normiert. Die normierten Werte wurden ins Verhältnis zum Sechsstundenzeitpunkt des Optineurin-*knock-out* gesetzt, um die Daten dreier unabhängiger Experimente vergleichbar zu machen. (Abbildung 6C, D). Diese Analyse der Daten zeigte eine frühere und stärkere Induktion des Signalwegs in Optineurin-defizienten Zellen gegenüber dem Wildtyp bzw. dem rekonstituierten *knock-out*.

Im Gesamten deuten die Beobachtungen darauf hin, dass der Optineurin-*knock-out* die Formation von MAVS-Aggregaten verstärkt, wodurch die Aktivierung der *downstream* gelegenen Signalmoleküle amplifiziert wird.

3.1.5 Optineurin-*knock-out*-batches weisen eine Amplifikation des RIG-I-induzierten Signalwegs auf

Ein Problem in Hinblick auf die Verwendung einzelner mit dem CRISPR/Cas 9 System generierten *Knock-out*-Klone ist, dass klonale *Off-target*-Effekte durch Selektion von Einzelzellklonen nicht auszuschließen sind. In dieser Arbeit war zunächst ein einzelner Optineurin-*Knock-out*-Klon verwendet worden. Zu Bestätigung der gesehenen Effekte wurden daher erneut 1205Lu-Zellen mit dem CRISPR/Cas9 System behandelt, diesmal mit zwei verschiedenen Optineurin-spezifischen sgRNAs. Die zweite sgRNA wurde verwendet, um mögliche *Off-target*-Effekte in Bezug auf den RLR-Signalweg weniger wahrscheinlich zu machen. Außerdem wurden als zusätzliche Kontrolle 1205Lu-Zellen mit einer unspezifischen sgRNA (*scrambled*-sgRNA) behandelt und selektioniert. Die Zellen wurden nach Selektion nicht in Einzelzellklone aufgeteilt und expandiert, sondern weiter als Zellpool (*batch*) kultiviert.

Die *batches* wurden mittels *deep-sequencing* von der Arbeitsgruppe von Prof. Veit Hornung (Genzentrum, München) auf ihren Mutationsstatus hin überprüft (Abbildung 7A). Die Daten wurden mit der Online-Software outknocker.org ausgewertet. Die Auswertung zeigt die Art und den Anteil der Mutationen sowie die Anzahl der *reads*. Für das *batch*, das mittels der OPTN-sgRNA-1 generiert wurde, zeigten sich in knapp über der Hälfte der Zellen Verschiebungen des Leserahmens durch Insertionen bzw. Deletionen (*indels*). Für das *batch*, welches mit OPTN-sgRNA-2 generiert wurde, waren ca. Dreiviertel der Zellen mutiert, wobei auch hier ca. die Hälfte der Zellen Verschiebungen des Leserahmens, und somit den sicheren Funktionsverlust des Gens aufwiesen. Die Expressionslevel von Optineurin wurden in den generierten *knock-out batches* mittels Western-Blot und anschließendem Anfärben durch einen Optineurin-Antikörper analysiert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Optineurinexpression in den mit gensequenzspezifischen sgRNAs behandelten Zellen, im Vergleich zu den Zellen, die mit der unspezifischen *scrambled*-sgRNA (*scr*-sgRNA) behandelt worden waren (Abbildung 7B).

Um den Effekt, den die Optineurinreduktion in einem Zellpool auf die MAVS-Aktivierung hat, zu bestimmen, wurden die *batches* mit 5'-pppRNA für eine, drei und sechs Stunden stimuliert und durch Western-Blots die Formation der MAVS-Aggregation bestimmt (Abbildung 7C,D). Auch in diesem Versuchsaufbau konnte

der negative Einfluss von Optineurin auf die MAVS-Aggregation festgestellt werden. In beiden mit OPTN-sgRNA-1 und OPTN-sgRNA-2 behandelten, Optineurin-depletierten *Zellpools* zeigte sich eine Verstärkung der Aggregatformation gegenüber den mit scr-sgRNA behandelten Zellen.

Auch die untersuchte IP10-Induktion fiel bei reduzierter Optineurinexpression in diesem Zellsystem verstärkt aus. Dafür wurden die Überstände der stimulierten Zellreihen nach sechs Stunden gesammelt und die IP10-Proteinlevel mittels ELISA gemessen (Abbildung 7E).

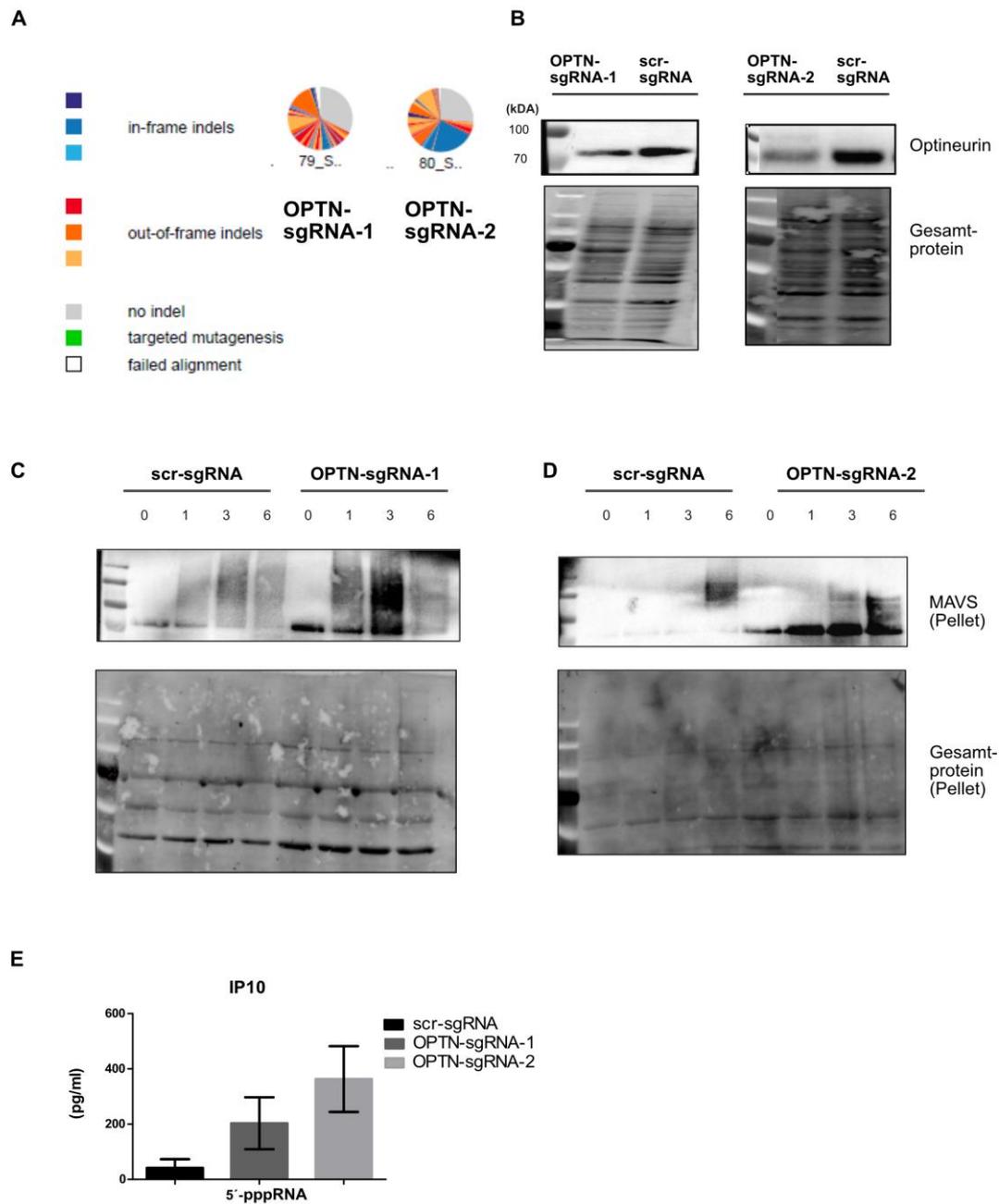


Abbildung 7.: Optineurin-knock-out-batches zeigen verstärkte MAVS-Aggregation.

(A) 1205Lu-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für Cas9 und entweder OPTN-sgRNA-1 bzw. OPTN-sgRNA-2 kodierten. Zusätzlich wurde eine unspezifisch bindende sgRNA (scr-sgRNA) verwendet. Nach Puromycinselektion wurden die überlebenden Zellen expandiert und mittels *deep-sequencing* (ca. 900 Reads) auf ihren Mutationsstatus hin überprüft. (B) Die Expressionslevel von OPTN wurden mit Western-Blots analysiert. (C, D) Die Zellen wurden nach angegebenen Zeitpunkten lysiert und die MAVS-Aggregation mittels Western-Blots analysiert. (C) Die gezeigten Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (D) Die gezeigten Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. (E) Die OPTN-knock-out-batches sowie die mit der scr-sgRNA behandelten Zellen wurden mit 5'-pppRNA für eine, drei und sechs Stunden stimuliert. Die Überstände des Sechs-Stunden-Zeitpunkts wurde abgenommen und mittels ELISA die IP10-Konzentration bestimmt. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM.

3.1.6 Optineurinexpression führt zu erhöhter Virusinfektionsrate

Da sowohl die Signaltransduktion als auch die daraufhin exprimierten antiviralen Zytokine von Optineurin gehemmt wurden, war es nun von Interesse herauszufinden, ob sich dieser Sachverhalt auch in der Infektion der Zellen mit Viren widerspiegelt. Dafür wurden die oben genannten Zelllinien verwendet und mit einzelsträngigen RNA-Viren infiziert.

Bei den Viren handelte es sich zum einen um das *vesicular stomatitis virus* (VSV), das zusätzlich mit dem *green fluorescent protein* gekoppelt war (GFP-VSV). Das VS-Virus gehört zur Familie der *Rhabdoviridae* und damit zu den Einzelstrang-RNA-Viren mit negativer Polarität. Hier wurde eine rekombinante Form des Virus verwendet. Das rekombinant hergestellte Virus trug eine Mutation im Matrixprotein (M-Protein) des Virus (GFP-M51R-VSV). Die Mutation hinderte das Virus daran, die Interferonantwort der infizierten Zelle zu unterdrücken (188). Außerdem wurden die Zellen mit dem Gelbfieber-Impfvirus, einem attenuierten Lebendvirus, *yellow fever virus* 17D (YFV-17D) infiziert. Gelbfieber gehört zu den Flaviviren, die eine einzelsträngige RNA mit positiver Polarität tragen. Das hier verwendete Gelbfiebervirus war zusätzlich mit einem gelb fluoreszierenden Protein (Venus) gekoppelt (Venus-YFV-17D).

Im Replikationszyklus der verwendeten Viren entstehen RIG-I-Liganden, die das antivirale Signaling induzieren. Die infizierten Zellen wurden nach 24 Stunden für GFP-M51R-VSV und nach 72 Stunden für Venus-YF-17D fixiert und anschließend die infizierten Zellen mittels Flowzytometrie analysiert. Mittels der GFP- bzw. Venus-Expression konnten durch Messung der Intensität der Fluoreszenz Rückschlüsse auf das Ausmaß der Infektion gezogen werden.

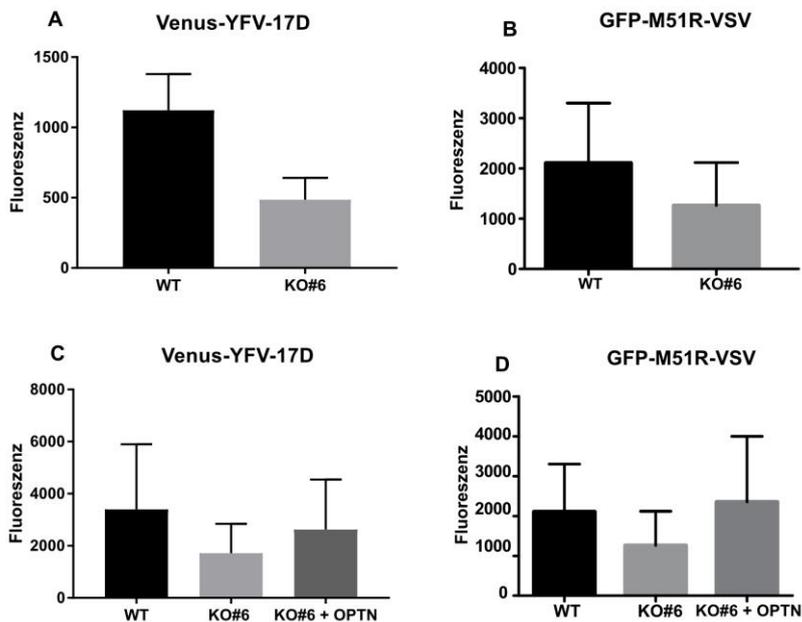


Abbildung 8. Optineurindepletion hemmt die Infektion mit einzelsträngigen RNA-Viren. 1205Lu-WT-Zellen, OPTN-KO #6 und der rekonstituierte KO #6 wurden mit (A, C) Venus-YFV-17D (MOI= 10) und (B, D) GFP-M51R-VSV (MOI=0,1) infiziert. Nach 24 Stunden für GFP-M51R-VSV und 72 Stunden für Venus-YFV-17D wurden die Zellen fixiert, mittels Flowzytometrie analysiert und der Median der Fluoreszenzintensität bestimmt. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM.

Im Einklang mit den zuvor erhobenen Daten ließ sich feststellen, dass die Infektion bei den gezeigten Viren in Zellen ohne Optineurin vermindert ausfiel, verglichen mit dem Wildtyp. Nach Rekonstitution von Optineurin in der *knock-out* Zelllinie stieg die Infektionsrate, passend zu den zuvor erhobenen Daten, wieder an (Abbildung 8A-D).

3.2 Optineurin interagiert mit MAVS

3.2.1 Optineurin lässt sich in Ko-Immunpräzipitationen mit MAVS ausfällen

Die bisher gezeigten Daten stellen dar, dass Optineurin ein negativer Regulator der durch 5'-pppRNA hervorgerufenen Immunantwort ist. Die Frage, die es zusätzlich zu beantworten galt, war, ob Optineurin diesen negativen Einfluss durch eine Interaktion mit MAVS ausübt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden in dieser Arbeit Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Dafür wurden Plasmide, die für Optineurin und MAVS kodierten, in Hek293T-Zellen transfiziert, wodurch die Proteine in den Zellen überexprimiert wurden. Die Proteine waren dabei mit verschiedenen *tags* gekoppelt, um eine effiziente Immunpräzipitation zu gewährleisten. Optineurin wurde mit einem eGFP (*enhanced GFP*) bzw. einem FLAG-*tag* gekoppelt. MAVS wurde einmal in nativem Zustand verwendet und einmal mit einem FLAG-*tag* gekoppelt. Die unterschiedlichen *Tag*-Varianten wurden gewählt, um unspezifische und unphysiologische *tag*-vermittelte Interaktionen möglichst auszuschließen.

In Kondition A wurde die Ko-Immunpräzipitation an eGFP-getaggetem Optineurin und FLAG-getaggetem MAVS durchgeführt. In Kondition B wurde Ko-Immunpräzipitation an FLAG-getaggetem Optineurin und an MAVS in nativem Zustand durchgeführt (Abbildung 9A, B).

Es konnte gezeigt werden, dass sich in beiden Konditionen Optineurin und MAVS gegenseitig herunterziehen ließen, was eine Interaktion beider Proteine wahrscheinlich werden lässt bzw. darauf hinweist, dass Optineurin und MAVS sich zum Zeitpunkt der Präzipitation in einem gemeinsamen Proteinkomplex befanden. Da durch das Überexpressionsmodell der RLR-Signalweg bei Transfektion des MAVS-Plasmids induziert wird, war es in diesem Setting nicht möglich zu differenzieren, ob Optineurin und MAVS nach Stimulation in Interaktion treten, oder ob die Interaktion auch in unstimuliertem Zustand besteht.

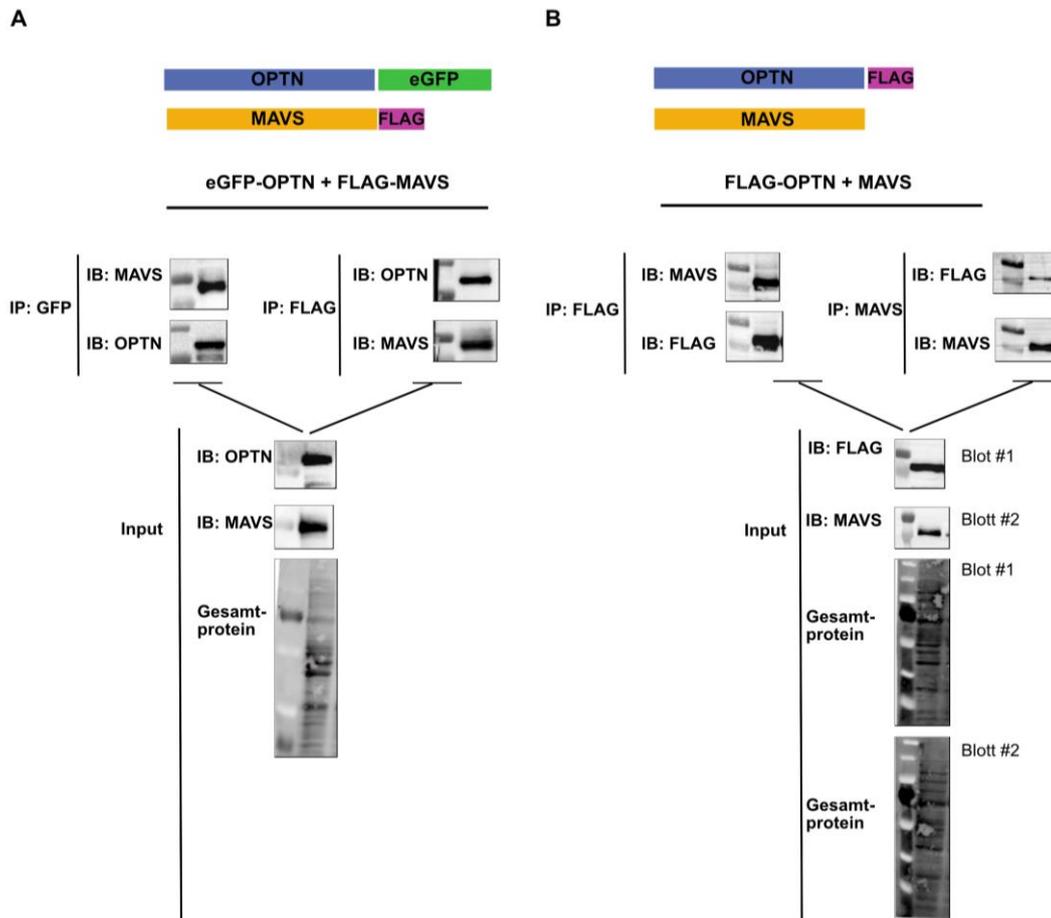


Abbildung 9. MAVS und Optineurin lassen sich in Ko-Immünpräzipitationen gegenseitig präzipitieren. Hek293T-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die für eGFP-OPTN und FLAG-MAVS (A) bzw. FLAG-OPTN und MAVS (B) kodierten. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und anschließend Ko-Immünpräzipitationen (IP) mit FLAG-beads, Anti-MAVS-Antikörpern und GFP-Antikörpern durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels Western-Blots (IB) analysiert. (A) Die gezeigten Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (B) Die gezeigten Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

3.2.2 Optineurin nimmt auf MAVS oder TBK1 *upstream* von IRF3 Einfluss auf den RLR-Signalweg

Um herauszukristallisieren, auf welcher Ebene des Signalwegs Optineurin seinen Einfluss geltend macht, wurden Luciferaseassays durchgeführt. Hierzu wurden Hek293T-Zellen mit einem *Firefly*-Luciferaseplasmid transfiziert, dessen

Expression unter der Steuerung entweder des IFN- β - oder des NF- κ B-Promoters lag. Außerdem wurde als interne Kontrolle ein Plasmid transfiziert, das die Renilla-Luciferase unter einem konstitutiv aktiven Promoter kodiert und welches zur Normalisierung der Luciferaseaktivität herangezogen wurde. Gleichzeitig wurden jeweils eines der angegebenen Plasmide der RIG-I-Signalkaskade transfiziert (RIG-I, TBK1, MAVS, IRF3-5D, pcDNA3.1) sowie aufsteigende Konzentrationen an Optineurin (0-150ng). RIG-I wurde zusätzlich für sechs Stunden mit 5'-pppRNA stimuliert. Dabei induzieren MAVS, TBK1, IRF3-5D den *downstream* gelegenen Signalweg ohne weitere Stimulation (IRF3-5D als konstitutiv aktive Form von IRF3). Die Transfektion von pcDNA3.1 diente als Negativkontrolle der Luciferaseinduktion (Abbildung 10A, B).

Zunächst ließ sich feststellen, dass mit steigender Optineurinkonzentration sowohl die durch NF- κ B als auch die durch den IFN- β -Promotor induzierte Luciferaseaktivität dosisabhängig herunterreguliert wurde. Dabei zeigte sich für die NF- κ B gesteuerte Luciferaseaktivität eine dosisabhängige Reduktion auf der Ebene von RIG-I, MAVS und TBK1. Gleiches ließ sich für die über den IFN- β -Promotor gesteuerte Luciferaseaktivität nach Induktion mit RIG-I, MAVS und TBK1 feststellen. Auch bei IRF3-5D-Transfektion zeigte sich eine Unterdrückung der durch den Interferon-Promotor gesteuerten Antwort durch Optineurin. Diese fiel allerdings deutlich geringer aus, verglichen mit den anderen Proteinen des Signalwegs. Während es beispielsweise bei Induktion des Signalwegs durch MAVS zu einer ca. 80 %igen Reduktion der IFN- β -Promotoraktivität kam, konnte bei Induktion mit IRF3-5D lediglich eine Reduktion um ca. 25 % verzeichnet werden, bei Transfektion von 150 ng Optineurin. Dieses Ergebnis lässt spekulieren, dass Optineurin seinen Einfluss *upstream* von IRF3-5D ausübt.

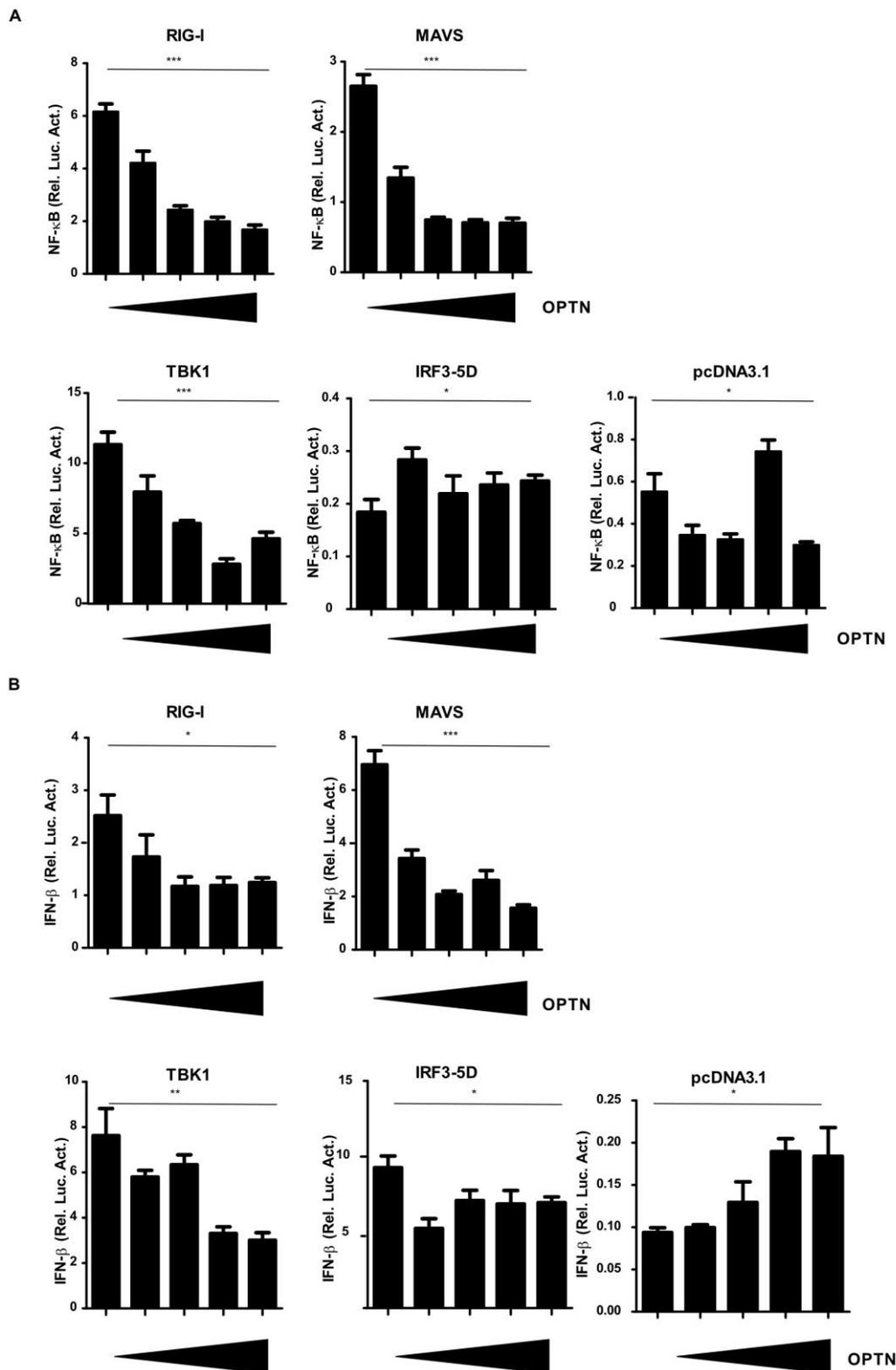


Abbildung 10. Optineurin-Überexpression in Hek293T Zellen hemmt die Induktion der NF- κ B und IFN- β Promotoraktivität durch verschiedene Signaltransduktoren. Hek293T-Zellen wurden mit einem *Firefly*-Luciferasereporterplasmid für den (A) NF- κ B bzw. (B) IFN- β -Promotor transfiziert. Der RIG-I-Signalweg wurde durch Transfektion der angegebenen Signalmoleküle induziert. Als Negativkontrolle der Induktion wurde der Leervektor pcDNA3.1 transfiziert. Gleichzeitig wurden OPTN bzw. der Leervektor in aufsteigender Dosierung transfiziert (0, 25, 50, 100, 150 ng). 18 Stunden nach Transfektion

wurde die mit RIG-I transfizierte Kondition mit 500 ng/ml 5'-pppRNA stimuliert. 24 h nach Expression der Plasmide wurden die Zellen lysiert und die Firefly-Luciferaseaktivität auf die Renilla-Luciferaseaktivität normiert. Die gezeigten Daten zeigen den Durchschnittswert dreier unabhängiger Experimente \pm SEM. Die ermittelten P-Werte vergleichen die Kondition 0 ng OPTN und 150ng OPTN mit dem zweiseitigen ungepaarten t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$.

3.3 Die Relevanz von TBK1 bei der Einflussnahme von Optineurin auf MAVS

3.3.1 Optineurin-Mutanten zeigen weiterhin eine Interaktion mit MAVS in Ko-Immünpräzipitationen

Optineurin besitzt verschiedene funktionelle Domänen (siehe 1.2.1). Um herauszufinden, welche der Domänen relevant für die Interaktion mit MAVS ist, wurden verschiedene Mutanten kloniert. Da die Optineurin-TBK1-Achse in der Literatur in verschiedenen Signalwegen als bedeutsam beschrieben ist (138, 189, 190) – v.a. bei der Induktion der Interferonantwort –, waren dabei vor allem die für die TBK1-Interaktion relevanten Domänen von Interesse.

Zum einen wurde die N-terminale TBK1-Bindedomäne trunziert (OPTN Δ^{1-147}). Diese ist beschrieben, die endogene Optineurin-TBK1-Interaktion zu vermitteln (180). Zusätzlich wurde eine Phosphorylierungsstelle des Optineurin punktmuiert (OPTN^{S177A}). Diese wiederum wurde beschrieben, nach Virusinfektionen von TBK1 phosphoryliert zu werden und für die Hemmung der IFN- β -Expression relevant zu sein (174).

Die beiden beschriebenen Mutanten wurden verwendet, um erneut Ko-Immünpräzipitationen mit MAVS durchzuführen (Abbildung 11A). Dafür wurden FLAG-gekoppelte Varianten der beiden Optineurin-Mutanten gemeinsam mit MAVS in Hek293T-Zellen ko-transfiziert. 24 Stunden nach Expression wurden die Zellen lysiert und Immünpräzipitationen durchgeführt. Bei der trunzierten Variante fiel die Optineurin-Präzipitation nach MAVS-*pulldown* deutlich schwächer aus, verglichen mit der punktmuierten oder wildtypischen Variante. Bei FLAG-*pulldown* von OPTN Δ^{1-147} zeigte sich jedoch weiterhin eine deutliche MAVS-Präzipitation, sodass das Experiment keine eindeutigen Rückschlüsse zulässt.

OPTN^{S177A} zeigte beim MAVS-*pulldown* eine stärkere Präzipitation als der Wildtyp. MAVS zeigte beim FLAG-*pulldown* von OPTN^{S177A} jedoch keine vermehrte Anreicherung.

So lassen die gezeigten Daten – auch, da es sich um ein einzelnes, nicht wiederholtes Experiment handelt, keinen eindeutigen Schluss zu, ob der N-terminalen TBK1-Bindedomäne, oder der Phosphorylierung von Optineurin eine Rolle bei der Optineurin-MAVS-Interaktion zukommt.

3.3.2 Die Hemmung der MAVS-Aggregation in Hek293T Zellen ist abhängig von TBK1

Um der Frage weiter nachzugehen, welche Relevanz die Optineurin-TBK1-Achse auf die MAVS-Aggregation hat, wurde ein Überexpressionsmodell in Hek293T Zellen verwendet. Dabei wurden MAVS und Optineurin-Expressionsplasmide in unterschiedlichen Konzentrationen in Hek293T-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion lysiert und mittels Western-Blots analysiert. Dabei wurden erneut die pelletierten MAVS-Aggregate aus den Lysaten gewonnen, um so deren Aktivierung visualisieren zu können. Es zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der MAVS-Aggregation bei Optineurintransfektion (Abbildung 11B).

Um zu untersuchen, ob diese Reduktion der Aggregation TBK1-abhängig ist, wurde in einem weiteren Experiment der TBK1-Inhibitor BX795 verwendet und die Zellen eine Stunde vor Transfektion der Expressionsplasmide mit diesem behandelt. Der Inhibitor wurde in einer 1- μ M-Konzentration verwendet. BX795 ist in DMSO gelöst, weshalb als Kontrolle Zellen mit dem entsprechenden Volumen an DMSO versetzt wurden. In Hek293-T-Zellen, die mit dem TBK1-Inhibitor behandelt worden waren, fiel die MAVS-Aggregation weniger gehemmt aus als in den unbehandelten bzw. mit DMSO behandelten Zellen (Abbildung 11C).

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass der inhibitorische Effekt von Optineurin zumindest teilweise über TBK1 vermittelt wurde.

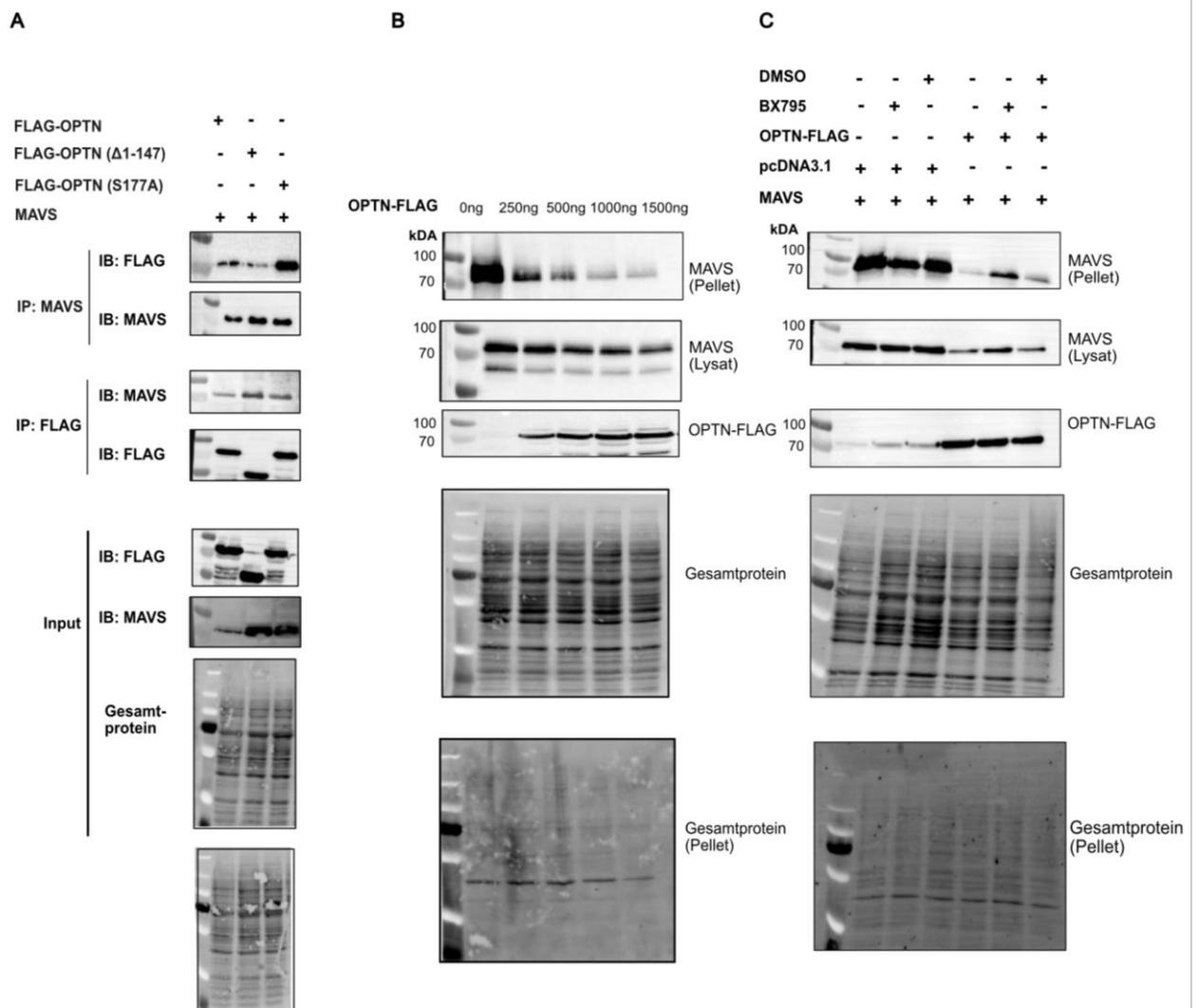


Abbildung 11. Die Hemmung der MAVS-Aggregation in Hek293T Zellen ist abhängig von TBK1. (A) Hek293T-Zellen wurden mit angegebenen Expressionsplasmiden ko-transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und anschließend Ko-Immünpräzipitationen mit FLAG-beads bzw. Anti-MAVS-Antikörpern durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels Western-Blot analysiert. Die Blots zeigen ein einfach durchgeführtes Experiment. (B) Hek293T-Zellen wurden mit MAVS und OPTN-Expressionsplasmiden transfiziert. Dabei wurden steigende Konzentrationen an OPTN verwendet (0-1500 ng). 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels *western-blotting* analysiert. Die gezeigten *blots* sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (C) Hek293T-Zellen wurden mit MAVS und OPTN bzw. dem Leervektor pcDNA3.1 transfiziert. Eine Stunde vor Transfektion wurden die Zellen mit dem TBK1-Inhibitor BX795 (1 μ M) bzw. DMSO behandelt. 24 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und mittels Western-Blot analysiert. Die gezeigten Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

4. Diskussion

MAVS ist ein zentraler Signalknotenpunkt in der durch RLRs getriggerten Immunantwort nach viraler Infektion. Es schützt den Organismus, indem es eine Signalplattform für die *downstream* der RLRs gelegenen Signaltransduktion bildet, und so die Transkription antiviraler Zytokine und Interferon Typ I vermittelt. Gleichzeitig führt eine anhaltende, unkontrollierte MAVS-Aktivierung zu schädlichen Effekten im Wirt. Einer strengen Regulation des RLR-Signalwegs und der Aktivierung von MAVS kommt so eine besondere Bedeutung im Gleichgewicht der angebotenen Immunantwort zu.

4.1 Optineurin ist ein negativer Regulator der RIG-I-getriggerten Immunantwort in 1205Lu-Zellen

Ziel dieser Arbeit war, die Rolle von Optineurin im RLR-Signalweg zu charakterisieren. Zusammengefasst zeigten die Daten einen negativen Einfluss von Optineurin auf die RIG-I-induzierte Immunantwort. Auf der einen Seite zeigte sich die Hochregulation der Sekretion der antiviralen Zytokine IP10 und IL6 nach Stimulation von Optineurin-*knock-out*-Zellen im Vergleich zu wildtypischen 1205Lu-Zellen mit 5'-pppRNA (Abbildung 5D, E). Auch die mRNA-Level von IP10 und IL6 sowie die von ISG15 und IL1- β der *knock-outs* wurden bis zu 12 Stunden nach Stimulation stärker exprimiert als in wildtypischen Zellen (Abbildung 5F-I). Ferner zeigten die Aggregation von MAVS sowie die *downstream* davon gelegenen Signaltransduktoren eine erhöhte Aktivierung in Abwesenheit von Optineurin (Abbildung 6A). Auf der anderen Seite konnte die Rekonstitution der *Knock-out*-Zellen mit einem Optineurin-Überexpressionsplasmid den negativen Einfluss von Optineurin im RLR-Signalweg zumindest in größeren Teilen wieder herstellen. Hier zeigte sich gegenüber den Optineurin-*knock-outs* eine Reduktion der antiviralen Immunantwort, sowohl bei Aktivierung der Signaltransduktoren (Abbildung 6B) als auch bei der Expression antiviraler Zytokine auf mRNA- und Proteinebene (Abbildung 5D-I). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von Optineurin die Höhe der Viruslast nach Infektion mit VSV-M51R und attenuierten Gelbfieberviren höher ausfiel als in Optineurin-*knock-out*-Zellen, was die

Relevanz von Optineurin in der Regulation der physiologischen antiviralen Immunantwort verdeutlicht (Abbildung 8).

Optineurin gehört zu den durch Interferon stimulierten Genen (134). Promotoruntersuchungen des Optineurin-Gens zeigten eine NF- κ B-Bindesequenz direkt vor Exon-1. Mutation dieser Bindesequenz, und die NF- κ B-Inhibition hatte eine verminderte Promotoraktivität zur Folge (135). Interessanterweise zeigten Mankouri et al., dass Optineurin auch in Vero-Zellen, denen das IFN-I Gencluster fehlt (191), nach viraler Infektion hochreguliert wird. Dies verdeutlicht, dass die Optineurininduktion auch unabhängig von Interferon Typ I nach viraler Infektion stimuliert werden kann (136). Auch in dieser Arbeit zeigte die mRNA-Expression von Optineurin einen signifikanten Anstieg nach 5'-pppRNA-Stimulation (Abb. 1B). Betrachtet man diese Korrelation zusammen mit den Ergebnissen, die Optineurin als negativen Einflussfaktor der antiviralen Immunantwort zeigen, liegt die Annahme nahe, dass Optineurin als Regulator in einer negativen Feedback-Schleife fungiert.

In Zusammenschau weisen die in dieser Arbeit in humanen Zellen erhobenen Daten auf einen negativen Einfluss von Optineurin im RLR-Signaling hin.

Die präsentierten Daten stehen im Einklang mit der Arbeit anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls den negativen Einfluss von Optineurin im RLR-Signaling zeigen konnten (136, 174, 177). In Diskrepanz stehen dazu Daten, die einen positiven Einfluss von Optineurin und dessen Notwendigkeit für eine optimale Interferoninduktion verzeichnen (179, 180, 182). Diese Diskrepanz könnte daher rühren, dass ein Großteil dieser Daten im murinen System erhoben wurde. Humanes Optineurin zeigt eine 78 %-Homologie zu murinem Optineurin, was eine unterschiedliche Funktion erklären kann (131). Beispielsweise hob eine Mutation der Ubiquitinbindedomäne (Optineurin^{D474N}) im humanen System nach Daten von Mankouri et al. (136) die Fähigkeit von Optineurin, TBK1 zu binden auf, während die korrespondierende murine Mutation (OPTN^{D477N}) weiterhin TBK1 binden konnte (174, 179). Génin et al. (174) verglichen den Effekt dieser Mutanten in Optineurin-depletierten humanen und murinen Zellen (HeLa und MEFs). Während in beiden Systemen die Anwesenheit von Optineurin die IFN- β -Induktion nach Poly(I:C)-Behandlung hemmte, wurde dieser Effekt bei der humanen, nicht aber bei der murinen Mutation der Ubiquitinbindedomäne aufgehoben.

Des Weiteren könnten die sich widersprechenden Daten durch die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien erklärt werden, wenn davon auszugehen ist, dass Optineurin zellspezifische Effekte aufweist. Diese Annahme wird durch das Vorkommen von Optineurin in einer Vielfalt von Signalwegen getragen, deren Relevanz wiederum Zelltyp-abhängig ist (6, 150, 156, 174).

Ein Kritikpunkt, den Gleason et al. (179) (die Optineurin als positiven Regulator beschreiben) anbringen, ist, dass der negativ regulatorische Effekt von Optineurin ein Artefakt darstellen kann, hervorgerufen durch *Off-target*-Effekte von siRNAs und transienter Überexpression, womit Optineurin in Publikationen von Génin et al. (174) und Mankouri et al. (136) (die Optineurin ebenfalls als negativen Regulator beschreiben) u.a. untersucht wurde. In dieser Arbeit wurde Optineurin mittels der CRISPR/Cas9-Methode dauerhaft in 1205Lu-Zellen depletiert. Obwohl CRISPR/Cas9 eine gensequenzspezifische Methode ist, können auch hier *Off-target*-Effekte nicht ausgeschlossen werden (192). Ein weiteres Problem, welches sich bei Anwendung der CRISPR/Cas9-Methode ergibt, ist die Verwendung eines einzelnen Zellklons zur Generation eines kompletten *knock-outs*. Eine einzelne Zelle kann einen nicht-repräsentativen Phänotyp aufweisen, da bei längerer Kultivierung und Expansion (was bei Generation von Einzelzell-*knock-outs* notwendig ist) zufällige Mutationen angehäuft werden können. Dieser Umstand war in unserer Arbeitsgruppe durch *whole exome sequencing* in 1205Lu *Knock-out* Zellklonen, die mittels *limiting dilution* generiert worden waren, beobachtet worden. Dies war insbesondere unter Berücksichtigung des Umstands, dass mit einer Tumorzelllinie (1205Lu) gearbeitet wurde – bei der von größerer genetischer Instabilität ausgegangen werden muss – von Bedeutung.

Um die genannten Störfaktoren der Methode zu berücksichtigen, wurden Optineurin depletierte *batches* von 1205Lu-Zellen generiert, um mit einer Zellpopulation zu arbeiten (Abbildung 7). Hier wurde zwar für Cas9-Expression selektioniert, die Zellen wurden jedoch nicht in Einzelzellklone aufgeteilt, so dass ein nicht für die Zellpopulation repräsentativer Phänotyp besser ausgeschlossen werden konnte. Ein wesentlicher Mechanismus, durch den *Off-target*-Effekte durch CRISPR/Cas zustande kommen, sind Regionen des Genoms, die eine starke Homologie zu der gewünschten Zielsequenz haben, und ebenfalls die spezifische Sequenz der sgRNA binden (193, 194). Zur Reduktion dieser potentiellen Störvariable wurden zwei verschiedene sgRNAs, die unterschiedliche Exone als

Zielsequenz besaßen, verwendet. Andere, nicht mit der sgRNA zusammenhängende, *Off-target*-Effekte bestehen jedoch weiter, und können so nicht angegangen werden (195). Da sich der Phänotyp jedoch durch stabile Überexpression von Optineurin im *Knock-out*-Hintergrund rekonstituieren ließ, ist ein Artefakt durch *Off-target*-Effekte als Erklärung für die in der vorliegenden Arbeit gesehenden Effekte höchst unwahrscheinlich.

Zusammenfassend konnte durch Verwendung der *batches*, die wie der Einzelzell-*knock-out* einen negativen Einfluss von Optineurin auf das RLR-Signaling zeigten, ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp nur auf einen einzelnen Zellklon beschränkt ist. Durch Verwendung unterschiedlicher sgRNAs sowie durch erfolgreiche Rekonstitution des *knock-outs* konnte die Wahrscheinlichkeit von *Off-target*-Effekten reduziert werden. Somit ist nicht von einem durch das verwendete System hervorgerufenem Artefakt, wie er von Gleason et al. (179) angeführt wird, auszugehen.

4.2 Optineurin nimmt *upstream* von NF- κ B und IRF-3 Einfluss auf das antivirale Signaling

Es konnte gezeigt werden, dass Optineurin sowohl den von MAVS ausgehenden NF- κ B- als auch den IRF-3-Signalweg inhibierte. Dies wurde einerseits anhand der gemessenen Zytokinexpression (Abbildung 5) sowie der Aktivierung der Signalmoleküle selbst verzeichnet (Abbildung 6): I κ B- α wurde in Optineurin-defizienten Zellen nach 5'pppRNA-Stimulierung stärker phosphoryliert (Abbildung 6A, B). Die Transkription und Proteinexpression von IL6 und IL1- β waren ebenfalls verstärkt, was vor allem den NF- κ B -aktivierenden Signalweg impliziert (Abbildung 5E, I). Andererseits war die Aktivierung auch von p-TBK1 und p-IRF3 gegenüber wildtypischen oder Optineurin-überexprimierenden Zellen bei Fehlen von Optineurin erhöht (Abbildung 6A, B). Obendrein konnten im Zuge dessen auch erhöhte Level an IP10 und ISG15 verzeichnet werden, was wiederum den IRF-3-Arm des Signalwegs darstellt (Abbildung 5D, G, H). Diese Beobachtung, dass Optineurin Einfluss auf den NF- κ B-Arm und IRF-3-Arm des Signalwegs nimmt, legt nahe, dass Optineurin seinen Einfluss stromaufwärts der Auftrennung beider Signalwege ausübt.

Diese Annahme konnte in den hier durchgeführten Luciferaseassays unterstrichen werden. Es zeigte sich, dass Optineurin sowohl auf die stromabwärts von MAVS gelegenen transfizierten Signaltransduktoren Einfluss nahm wie auch auf MAVS selbst (Abbildung 10). Dabei regulierte Optineurin sowohl die Aktivierung des NF- κ B -Promotors als auch die des IFN- β -Promotors nach Transfektion von RIG-I, TBK1 und MAVS für den NF- κ B -Promotor und RIG-I, TBK1, IRF3-5D und MAVS für den IFN- β -Promotor dosisabhängig herunter. Eine wichtige Feststellung war, dass für den IFN- β -Promotor die Regulation des von IRF3-5D induzierten Signals deutlich geringer ausfiel als für das TBK1 und MAVS induzierte. Für TBK1 ließ sich eine 60 %ige, und für MAVS eine fast 80 %ige Aktivitätsreduktion feststellen, während für IRF3-5D lediglich eine Reduktion um 25 % verzeichnet wurde.

Die mit den Luciferaseassays gewonnenen Erkenntnisse stimmen also mit den bisher erhobenen Daten überein, dass beide Signalwege ausgehend von MAVS durch die Expression von Optineurin negativ beeinflusst werden, und liefern weiter Hinweise, dass die Einflussnahme vor allem stromaufwärts von IRF3 und auf Ebene von MAVS und TBK1 stattfindet.

Andere Arbeitsgruppen, die Optineurin im IFN-Signaling charakterisierten, sahen den Einfluss des Optineurin vordergründig durch seine Interaktion mit TBK1 vermittelt (136, 174), was in Einklang mit den hier erhobenen Daten zu bringen ist (s.u.).

4.3 Optineurin interagiert mit MAVS

Die Beeinflussung beider Signalwege kann ein Hinweis auf eine mögliche Beeinflussung von MAVS selbst sein, bietet jedoch keinen hinreichenden Erklärungsansatz. Denn, Optineurin wurde mit voneinander unabhängigen Mechanismen als Regulator sowohl im *downstream* gelegenen NF- κ B - als auch IFN-Signaling beschrieben. So wurde Optineurin, wie im Einleitungsteil genauer erläutert, als kompetitiver Inhibitor NEMOs beschrieben, dessen Rekrutierung als Teil des IKK-Komplexes an Ubiquitinketten den inhibitorischen I κ B-Komplex durch Phosphorylierung von NF- κ B trennt (172). Eine Hypothese, die weiter durch die

deutliche Homologie zwischen Optineurin und NEMO getragen wird, wobei Optineurin keine Kinasedomäne besitzt, die im IKK-Komplex für die NF- κ B-Aktivierung nötig ist (134).

Außerdem wurde beschrieben, dass Optineurin das Enzym CYLD nach TNF- α -Rezeptor-induziertem NF- κ B-Signaling rekrutiert, was zur Deubiquitynylierung dessen Adaptermoleküls RIP1 und subsequenter Inaktivierung der angestoßenen Signalübertragung führt (2). Da der Mechanismus, über den MAVS NF- κ B aktiviert, dem von RIP1 ähnlich ist (beide fungieren als Adaptermoleküle, deren Ubiquitynylierung das Signal weitergibt), wäre hier ein entsprechender Mechanismus denkbar. Auch der Mechanismus über kompetitive Inhibition NEMOs könnte bei RLR-induziertem NF- κ B-Signaling zum Tragen kommen. Die Literatur, in der Optineurin als negativer Regulator des IFN-Signaling beschrieben wird, demonstriert, dass Optineurin seinen Einfluss über seine Ubiquitinbindedomäne und die Interaktion mit TBK1 geltend macht (4, 136, 174, 177). Dabei postulieren Génin et al. ebenfalls die TBK1-Inhibition durch dessen Deubiquitynylierung durch die Rekrutierung von CYLD durch Optineurin (174). Unabhängige Mechanismen bei der negativen Beeinflussung beider Arme des Signalwegs stromabwärts von MAVS wären somit denkbar.

Die These, dass Optineurin direkten Einfluss auf MAVS nimmt und mit diesem interagiert, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Bildung der MAVS-Aggregate in Optineurin-depletierten Zellen stärker ausfiel als in wildtypischen Zellen (Abbildung 6A). Und umgekehrt die Optineurin-Überexpression die Formierung der Aggregate hemmte (Abbildung 6B). Unterstützt wurden diese in 1205Lu-Zellen erhobenen Daten durch in Hek293T durchgeführte Überexpressionsversuche, bei denen die MAVS-Aggregation dosisabhängig durch Optineurin dezimiert wurde (Abbildung 11B).

Da die Optineurinexpression nach RIG-I-Stimulation selbst hochreguliert wird, könnte der Effekt von Optineurin als negativer Feedback-Regulator verstanden werden, dessen Herunterregulation der MAVS-Aggregation nicht Resultat der Interaktion, sondern der angeworfenen negativen Feedback-Schleife ist. Dagegen spricht, dass der Einfluss von Optineurin auf die MAVS-Aggregate bereits nach einer Stunde der Stimulation vermindert ausfiel (Abbildung 6), während die Hochregulation der mRNA-Transkription von Optineurin erst nach über sechs Stunden signifikant anstieg (Abbildung 5C). Dies steht zusätzlich mit den Beobachtungen

Viktoria Bothes in Einklang, die Optineurin eine Stunde nach Stimulation in der Nähe von MAVS angereichert fand (127).

Da Optineurin also bisher in der stromabwärts von MAVS gelegenen Signaltransduktion beschrieben ist und die Beeinflussung der MAVS-Aggregation zwar als Hinweis auf eine Interaktion gewertet werden kann, diese jedoch nicht zeigt, war eine weitere entscheidende Entdeckung dieser Arbeit, dass Optineurin in *Pull-down*-Experimenten mit MAVS interagiert. In Ko-Immünpräzipitationen von Optineurin und MAVS präzipitierten die Proteine beim *pulldown* des jeweilig anderen Proteins (Abbildung 9). Dieser Versuch bestätigte die von Viktoria Bothe erhobenen Daten, die Optineurin nach RIG-I-Stimulation mit dem oben beschriebenen Biotin-Steptavidin-*pulldown* und anschließender massenspektroskopischer Analyse in der Nähe von MAVS angereichert fand (127). Für die Immunpräzipitation wurden MAVS und Optineurin mit verschiedenen *tags* versehen, wodurch unspezifische, durch die *tags* vermittelte Interaktionen weitgehend ausgeschlossen werden konnten und damit gleichzeitig ein effizienter *pullown* gewährleistet wurde. Optineurin und MAVS ko-immünpräzipitierten in beiden der gewählten Konditionen: OPTN-eGFP und MAVS-FLAG ko-immünpräzipitierten und OPTN-FLAG und MAVS ko-immünpräzipitierten gegenseitig.

Da durch die Transfektion von Expressionsplasmiden MAVS in Hek293T-Zellen überexprimiert wurde, wurde der Signalweg aktiviert, und es ließ sich in diesem Versuchsaufbau nicht zwischen stimuliertem und unstimuliertem Zustand unterscheiden. So ist nur die Feststellung zulässig, dass Optineurin und MAVS nach Aktivierung des Signalwegs miteinander interagieren. Ob die Interaktion in unstimuliertem Zustand endogen stattfindet, bleibt offen.

Durch die Ko-Immünpräzipitationsexperimente konnte die Interaktion von Optineurin mit MAVS festgehalten werden. Eine weitere sich aufdrängende Frage, ob diese eine direkte Protein-Protein-Interaktion von MAVS und Optineurin darstellt, oder ob diese über weitere Proteine, beispielsweise in einem Proteinkomplex mit TBK1 zustande kommt, kann durch die gezeigten Daten nicht herausgearbeitet werden. Die bisher veröffentlichten Daten, die Optineurin als Regulator im Interferonsignaling beschreiben, sowohl positiv als auch negativ, zeigen, wie bereits erwähnt, dass Optineurin seinen Einfluss über seine Ubiquitinbindedomäne und die Interaktion mit TBK1 geltend macht. Fraglich bleibt bisher, ob und wie darüber eine Interaktion mit MAVS zustande kommen könnte.

Einen Baustein für diese Fragestellung lieferten Liu et al., die zeigten, dass ubiquitinylierte MAVS-Moleküle TBK1 rekrutierten und von TBK1 phosphoryliert wurden (88), was die Brücke zur *upstream* gelegenen Signalübertragung schlägt. Pourcelot et al. und Zemirli et al. (196) beispielsweise schlugen ein Modell anhand ihrer erhobenen Daten vor, in welchem am Golgi-Apparat lokalisiertes Optineurin ubiquitinyliertes TBK1 *downstream* von RLR- und TLR3-Aktivierung, zum Golgi-Apparat rekrutiert, wodurch die Autophosphorylierung und Aktivierung von TBK1 ermöglicht wird. Sie spekulieren, dass das am Golgi-Apparat lokalisierte TBK1 durch die räumliche Nähe des Golgi-Apparats zu Mitochondrien und Endosomen die Adaptermoleküle MAVS und TRIF phosphorylieren kann. Ein anderes von ihnen vorgeschlagenes Modell, in dem die Phosphorylierung von Optineurin durch TBK1 die Bindung an Rab8 (dem Adapterprotein, das Optineurin an den Golgi-Apparat lokalisiert) stört, und der Komplex so vom Golgi-Apparat disloziert und mit MAVS interagiert, liefert einen weiteren Erklärungsansatz für die Frage nach der Interaktion mit MAVS (196).

4.4 Die Relevanz der TBK1-Bindedomäne von Optineurin

Einen Hinweis auf die Relevanz der TBK1-Bindedomäne bzw. der Interaktion von Optineurin mit TBK1 bietet in dieser Arbeit die Verwendung des TBK1-Inhibitors BX795. Dieser inhibiert die von TBK1 vorgenommene Phosphorylierung von IRF-3 und somit die *downstream* gelegene Signaltransduktion, wahrscheinlich durch kompetitive Inhibition der ATP-Bindung (197). Bei steigender Optineurinkonzentration ließ sich ein Rückgang der MAVS-Aggregation in Hek293T-Zellen feststellen (Abbildung 11B), was auch mit den in 1205Lu-Zellen erhobenen Daten übereinstimmt. Bei Zugabe des TBK1-Inhibitors BX795 ließ sich zwar keine vollständige Aufhebung dieses Effekts feststellen, es zeigte sich jedoch eine Zunahme an aktivierten MAVS-Molekülen (Abbildung 11C).

Inkonklusiv blieb in dieser Arbeit in Bezug auf die Relevanz der TBK1-Bindedomäne/Interaktion die Verwendung der Optineurin Mutanten in Ko-Immünpräzipitationen. Hier zeigte sich bei Verwendung der Optineurinmutante (OPTN^{Δ1-147}), bei der die TBK1-Bindedomäne trunkiert ist, eine Verminderung der Präzipitation bei *pulldown* von MAVS, nicht jedoch eine Verminderung von MAVS bei *pulldown*

der OPTN^{Δ1-147}-Mutante. Ebenso inkonklusiv zeigte sich die Verwendung der OPTN^{S177A}-Mutante, bei welcher eine Phosphorylierungsstelle des Optineurin punktmutiert ist und die beschrieben ist, von TBK1 phosphoryliert zu werden und u.a. für die Hemmung der IFN-β-Expression relevant zu sein (174). OPTN^{S177A} zeigte beim MAVS-*pulldown* eine stärkere Präzipitation als der Wildtyp. MAVS zeigte beim FLAG-*pulldown* von OPTN^{S177A} jedoch keine vermehrte Anreicherung (Abbildung 11A).

Da es sich um ein einzelnes, nicht wiederholtes Experiment handelt ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den Daten um einen technischen Fehler handelt. Dies halte ich für wahrscheinlicher als einen biologischen Effekt, da die Daten nicht im Einklang mit den bisherig erhobenen Daten und der bestehenden Literatur zu bringen sind.

Andere, wie Optineurin ebenfalls zu den TBK1-bindenden gehörende Proteine, sind beschrieben, einen Einfluss auf die RLR-getriggerte Immunantwort zu nehmen. SINTBAD, NAP1 und TANK besitzen eine gemeinsame TBK1-bindende Domäne, die die optimale TBK1-Aktivierung ermöglichen (80, 81, 198, 199). Für TANK wurde zusätzlich eine Interaktion mit MAVS nach Sendai-Virusinfektion, in Ko-Immunpräzipitationen, gezeigt. Auch TBK1 ko-immunpräzipitierte mit TANK nach Sendai-Virusinfektion. Obwohl nicht herausgestellt werden konnte, ob TANK direkt mit MAVS interagiert oder über die Interaktion mit TRAF-Proteinen (TRAF3), schien TANK ein Bindeglied zwischen TBK1 und MAVS darzustellen (198, 200). Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für Optineurin denkbar, bei dem Optineurin über die Bindung von TBK1 mit MAVS interagiert und so die Immunantwort moduliert. Diese Annahme wird zusätzlich bestärkt durch die Beobachtung, dass Optineurin auch in TRAF3- und TBK1-enthaltenden Komplexen gefunden wurde (136).

4.5 Optineurin in der Autophagie und seine Relevanz im RLR-Signaling

Neben der Rolle von Optineurin im NF-κB- bzw. IRF-3-Signalweg steht Optineurin bei der Vermittlung von Autophagie im Vordergrund. Auch hier finden sich Zusammenhänge zur Regulation der angeborenen Immunantwort. Bei mitochondrialem Schaden kommt es u.a. zur Depolarisation der

Mitochondrienmembran und, wie oben beschrieben, zur PINK-PARKIN-vermittelten Beseitigung der Mitochondrien durch Mitophagie (201). Optineurin wird hier als ein wichtiges Adapterprotein beschrieben, welches an ubiquitinylierte Proteine der äußeren Mitochondrienmembran bindet und über die gleichzeitige Bindung von LCR die Formierung von Autophagolysosomen ermöglicht (202).

Es wurde gezeigt, dass Mitophagie bei der Regulation der antiviralen Immunantwort eine ausschlaggebende Rolle spielt. Dabei wurde beobachtet, dass RIG-I-Aktivierung Mitophagie initiierte, und der *knock-out* von MAVS diese Aktivierung hemmte (203). Die Abwesenheit von Mitophagie führte zu erhöhten MAVS-Leveln und erhöhter IFN- und Zytokinproduktion nach RLR-Stimulation (204). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass MAVS selbst als Protein der äußeren Mitochondrienmembran ubiquitinyliert und von dem Autophagieadapter NDP52 erkannt wird, was zur Degradierung von MAVS und somit zur negativen Regulierung der Interferonantwort führte (121). Auch hier wäre ein ähnlicher Mechanismus für Optineurin als Autophagie- bzw. Mitophagieadapter möglich, da Optineurin wie NDP52 zu den Autophagie-Adaptermolekülen zählt und wie oben erwähnt auch in Zusammenhang mit Mitophagie bereits beschrieben wurde.

Interessanterweise scheint auch hier die gegenseitige Beeinflussung durch TBK1 ausschlaggebend zu sein. So zeigten Richter et al., dass Optineurin TBK1 zu geschädigten Mitochondrien rekrutierte (Optineurin bindet über seine Ubiquitinbindedomäne an ubiquitinylierte Mitochondrienproteine und wird hier stabilisiert (205)) und selbst von TBK1 phosphoryliert wurde, was für die effektive Mitochondrienbeseitigung eine Rolle spielte (6). Nguyen et al. postulieren einen Signalweg, in welchem TBK1 nach Bindung an Optineurin Mitophagie induziert (206).

Eine weitere Arbeit, die die These, dass Optineurin durch seine Funktion in der Autophagie die Interferonproduktion negativ reguliert, ist die von Fukushi et al.. Hier führte Optineurindefizienz *in vivo* und *in vitro* zu einer Überproduktion von IFN- β , was sich auf eine Akkumulation von viraler RNA aufgrund von verminderter Autophagieaktivität zurückführen ließ (207).

Gegen einen Mechanismus, bei dem Optineurin das RLR-Signaling durch Auto- bzw. Mitophagie beeinflusst, sprechen Daten von Génin et al., die keinen Unterschied nach Behandlung mit bzw. ohne Autophagieinduktoren oder

Autophagiehemmern bei wildtypischen bzw. Optineurin-depletierten Zellen nach Stimulation mit transfiziertem Poly(I:C) feststellen konnten (174). Da die erhobenen Daten auch unabhängig von der Depletion von Optineurin keinen Einfluss auf die durch Poly(I:C) induzierte INF- β -Antwort zeigten und die Bedeutung von Auto- bzw. Mitophagie im RLR-Signalweg mehrfach beschrieben wurde (208, 209), könnte es sich hier um einen durch den Versuchsaufbau bedingtes isoliertes Ergebnis handeln. Die Untersuchung der Rolle von Optineurin in der Mitophagie im RLR-Signalweg, ist in meinen Augen ein vielversprechender Ansatz bei der Aufklärung der Ursache der verminderten MAVS-Aggregation in Anwesenheit von Optineurin.

4.6 Mögliche Mechanismen der negativen Regulation von MAVS durch Optineurin

Im Zuge dieser Arbeit konnte der Mechanismus über den Optineurin auf den RLR-Signalweg, und im Speziellen auf die MAVS-Aggregation, Einfluss nimmt, nicht abschließend geklärt werden. Es wurden Hinweise darauf gefunden, dass TBK1 an der Vermittlung des Effekts beteiligt ist: Dies zeigte sich dadurch, dass in den durchgeführten Luciferaseassays auf Ebene von TBK1 ein deutlicher Effekt zu verzeichnen war. Da TBK1 vorrangig im IRF-3-Arm des Signalwegs beschrieben ist, war bedeutsam, dass die TBK1-Überexpression sowohl die Induktion von IFN- β als auch des NF- κ B-Promotors zur Folge hatte und von Optineurin dosisabhängig reduziert wurde. Da TBK1 auch als in einem Komplex agierender Aktivator von NF- κ B identifiziert wurde (210), wäre denkbar, dass Optineurin die TBK1-abhängige Induktion beider Signalwege hemmt, und über diese Interaktion in die räumliche Nähe von MAVS kommt. Zusätzlich war neben der umfassenden Literatur, die die Interaktion von TBK1 und Optineurin beschreibt, ein weiteres, die These stützendes Ergebnis die Verwendung des TBK1-Inhibitors, der die Herunterregulation der MAVS-Aggregate durch Optineurin verminderte. Trotz dieser Feststellung, dass Optineurin seinen Effekt möglicherweise über TBK1 vermittelt, bleibt offen, wie genau es dadurch zu einer Verminderung der MAVS-Aggregation kommt.

Denkbar wäre eine Hemmung der Phosphorylierung von MAVS durch TBK1 in Bezug auf die stromabwärts von MAVS gelegene Signaltransduktion, was die subsequente IRF-3-Aktivierung verhindern würde.

Die NF- κ B-Beeinflussung könnte ebenfalls durch Interaktion von Optineurin mit TBK1 entstehen, wenn davon auszugehen ist, dass TBK1 auch die Aktivierung von NF- κ B induziert. Dies wird zum einen durch die hier in den Luciferaseassays erhobenen Daten angedeutet, zum anderen auch durch Literatur unterstützt, in der die NF- κ B-Aktivierung über einen TBK1-TANK-Komplex beschrieben wird (93, 210) (Abbildung 12A).

Ebenfalls möglich wäre ein Mechanismus, bei welchem Optineurin – unabhängig von der Interaktion mit TBK1 und MAVS – über kompetitive Inhibition der Rekrutierung von NEMO an ubiquitinyliertes MAVS die NF- κ B-induzierte Immunantwort hemmt, ähnlich wie für den TNF α -Rezeptor bereits beschrieben (2). Gleichzeitig würde ebenfalls über NEMO-Inhibition die TBK1-Rekrutierung zu MAVS gehemmt. Zhao et al. beschrieben, dieses Modell stützend, die Abhängigkeit der Rekrutierung von TBK1 zu MAVS über NEMO, zusammen mit dem TBK1-Adapterprotein TANK (78). Diese Feststellung schlägt die Brücke über beide Arme des von MAVS ausgehenden Signalwegs und würde die Fähigkeit von Optineurin, beide Arme des Signalwegs zu beeinflussen, erklären können (Abbildung 12B). Nicht hinreichend erklärt wäre in den Modellen, bei denen Optineurin über die TBK1- bzw. NEMO-Inhibition Einfluss auf die Immunantwort nimmt, der beobachtete Effekt von Optineurin auf die MAVS-Aggregation selbst. Möglich wäre eine direkte Inhibition der MAVS-Aggregation ggf. auch durch Interaktion mit TBK1 (Abbildung 12C) wie für andere Proteine bereits beschrieben (119, 120).

Ein weiterer Funktionsmechanismus, der durch die vielfältige Literatur hierzu plausibel erscheint, wäre die Rolle von Optineurin als Mitophagieadapter. Hier wäre denkbar, dass die Rekrutierung von Optineurin an aktivierte MAVS-Moleküle über die Interaktion der Ubiquitinketten von MAVS mit der C-terminalen Ubiquitinbindedomäne von Optineurin stattfindet. Die Rekrutierung von Optineurin an MAVS könnte durch dessen Interaktion mit seiner N-terminalen TBK1-Bindedomäne TBK1 rekrutieren. Die Phosphorylierung durch TBK1 an Serin 473 könnte die Interaktion mit MAVS verstärken, während die Phosphorylierung an Serin 177 die Interaktion mit LC3 und die subsequente Abräumung der MAVS-Aggregate amplifizieren würde. Für dieses Modell spräche die Beschreibung von

Optineurin in der Autophagie und die dafür entscheidende TBK1-Interaktion, was mit den hier erhobenen Daten zur TBK1-Abhängigkeit in Einklang zu bringen wäre. Außerdem bietet dieses Modell einen Erklärungsansatz für den gesehenen Effekt auf die Hemmung der Aggregation von MAVS nach RIG-I-Aktivierung (Abbildung 12 D).

Neben der Plausibilität müssten für die vorgeschlagenen Modelle weitere Versuche durchgeführt werden, um einen Mechanismus herauszukristallisieren. Hier wäre zum einen die Weiterführung der Arbeit mit Optineurin-Mutanten von Bedeutung, die die für die MAVS-Beeinflussung relevanten Proteindomänen aufdecken könnten. Außerdem wäre der Nachweis veränderter Mitophagieverhältnisse bei unterschiedlichen Optineurinexpressionsleveln ein weiterer Schritt, um die Rolle von Mitophagie im RLR-Signalweg im Zusammenhang mit Optineurin zu beleuchten.

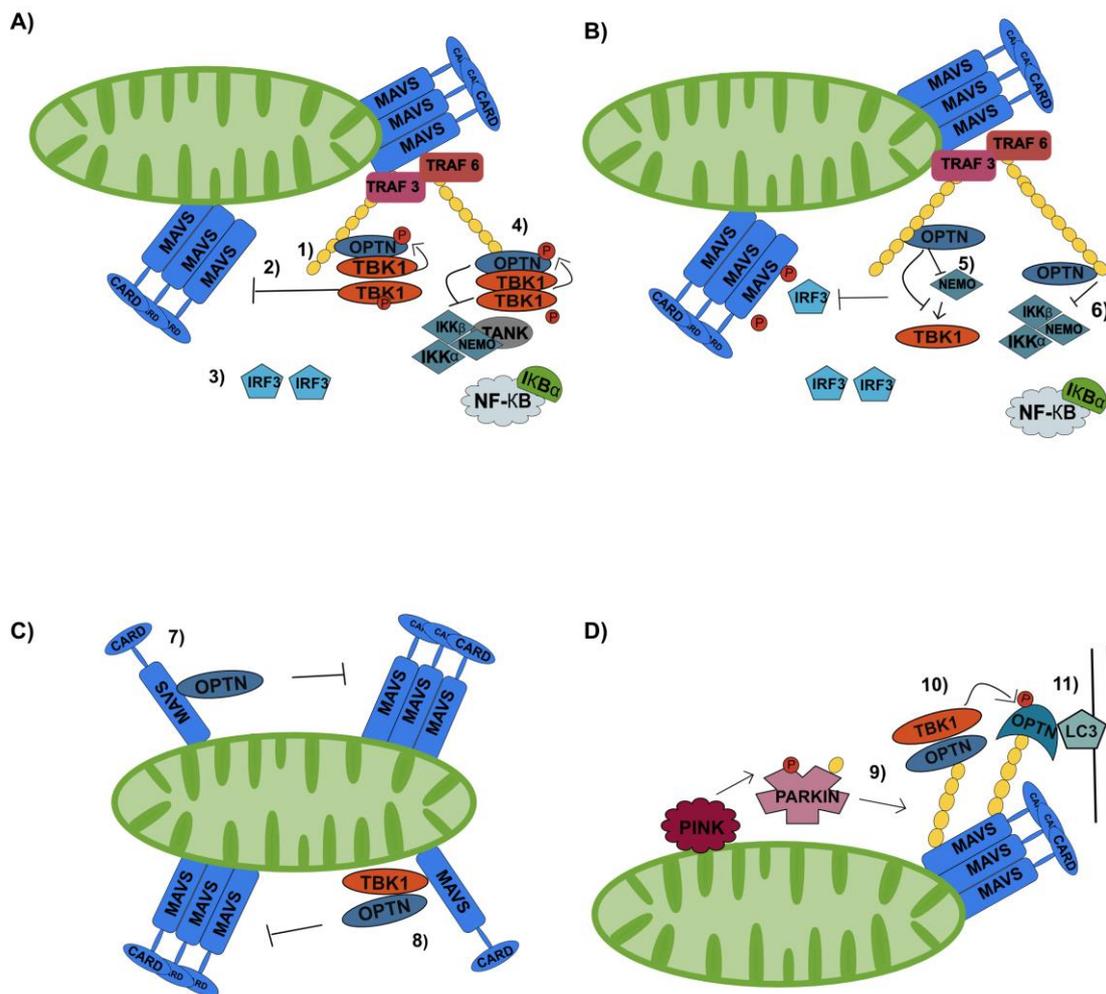


Abbildung 12. Mögliche Mechanismen, über die Optineurin auf den RLR-Signalweg Einfluss nimmt. (A) OPTN nimmt auf den stromabwärts gelegenen Signalweg über Assoziation an TBK1 Einfluss. 1) Optineurin bindet über TBK1 an ubiquitinierte MAVS-Moleküle. 2) Die Komplexbildung hemmt die Phosphorylierung von MAVS. 3) IRF3 kann nicht an MAVS binden und verbleibt im Zytosol. 4) Die Bindung von OPTN an TBK1 hemmt die Rekrutierung des IKK-Komplexes über TANK. (B) Die kompetitive Inhibition von NEMO verhindert die 5) TBK1-Assoziation und die 6) IKK-Assoziation an aktivierte MAVS-Moleküle. (C) 7) OPTN hemmt die MAVS Aggregation durch direkte Interaktion. 8) OPTN hemmt die MAVS-Aggregation über eine Komplexbildung mit TBK1. (D) OPTN räumt MAVS-Aggregate über PINK-PARKIN-vermittelte Mitophagie ab. 9) Parkin markiert MAVS mit Ubiquitinketten. 10) OPTN assoziiert über seine Ubiquitinbindedomäne an MAVS und rekrutiert TBK1, wird von diesem phosphoryliert und bindet daraufhin 11) über seine LC3-Bindedomäne an LC3-markierte Autophagosomen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion und Wirkungsweise des von Viktoria Bothe neu als MAVS-Interaktionsmolekül identifizierten Optineurins innerhalb des RIG-I-Signalwegs zu charakterisieren.

Es zeigte sich ein negativer Einfluss von Optineurin auf die durch RIG-I aktivierte antivirale Immunantwort. Hier konnte bereits nach einer Stunde eine Verminderung der Aggregation und somit der Aktivierung von MAVS verzeichnet werden. Die stromabwärts davon liegenden Signaltransduktoren sowie die darauffolgende Induktion der Transkription antiviraler Zytokine (und deren Translation) standen allesamt unter einem negativen Einfluss in Anwesenheit von Optineurin. Die physiologische Relevanz von Optineurin konnte in Versuchen mit Einzelstrang-RNA-Viren unterstrichen werden, da sich hier zeigte, dass es in Abwesenheit von Optineurin zu einer deutlichen Reduktion der Viruslast in 1205Lu-Zellen kam.

Das Ergebnis, dass Optineurin in Ko-Immunpräzipitationsversuchen mit MAVS interagiert, bestätigte die Versuche Viktoria Bothes, die Optineurin durch ein APEX-basiertes Verfahren nach RIG-I-Stimulation in der räumlichen Nähe von MAVS detektieren konnte. Es beleuchtet neue Möglichkeiten der Einflussnahme von Optineurin auf das angeborene Immunsystem.

Diese Arbeit bietet Hinweise darauf, dass der Einfluss von Optineurin über die Interaktion mit TBK1 vermittelt wird, da bei Verwendung eines TBK1-Inhibitors der negative Einfluss von Optineurin deutlich vermindert ausfiel. Die Ergebnisse der Verwendung der trunkierten Optineurin-Mutante waren nicht aufschlussreich. Die genaue Funktionsweise, wie Optineurin seinen Einfluss über MAVS geltend macht und welche funktionellen Domänen hierbei von Entscheidung sind, bleibt jedoch offen.

Die erhobenen Daten sind ein weiterer Baustein in der bisher veröffentlichten Literatur, die Optineurin in Signalwegen der angeborenen Immunantwort beschreiben und stehen in einer Reihe mit Veröffentlichungen, die Optineurin als negativen Regulator charakterisieren.

6. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

ATP	Adenosintriphosphat
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
APEX	Askorbat-Peroxidase
AIP4	<i>Atrophin interacting protein 4</i>
Atg	<i>Autophagy related gene</i>
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CARDs	<i>Caspase activating and recruiting domains</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
Cas9	<i>CRISPR associated protein 9</i>
Cr-RNA	CRISPR-RNA
CLRs	<i>C-type lectine receptors</i>
c-GAS	<i>cyclic-GMP-AMP synthase</i>
CYLD	Cylindromatosis
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
eGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
eCas9-1.1	<i>Enhanced-Cas9-1.1</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay</i>
FCS	<i>Fetal calfs serum</i>
FTD	Frontotemporale Demenz
FUS	<i>Fused in sarcoma</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HACE1	<i>HECT domain-containing-E3 ligases</i>
RNF125	<i>Homo sapiens ring finger protein 125</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>

HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IKK	<i>I-kappa-B-kinase</i>
IKK ϵ	<i>I-kappa-B-kinase-epsilon</i>
IKB	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa B</i>
IFN	Interferon
IRF-3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
ISG15	<i>Interferon-stimulated gene 15</i>
IL-1 β	Interleukin-1 β
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
LIR	<i>LC3 interacting region</i>
LC3	<i>Lipidated microtubule-associated protein light chain 3</i>
LPA	Lipopolysaccharide
LB-Medium	<i>Lysogeny-broth-Medium</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated factor 5</i>
MARCH5	<i>Membrane-associated ring finger (C3HC4) 5</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MOI	Multiplizität der Infektion
MEFs	Murine-embryonische-Fibroblasten
NAP1	<i>NAK-associated protein</i>
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NDP52	<i>Nuclear dot protein 52kDa</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding and oligomerization-domain</i>
NLRs	<i>(NOD)-like receptors</i>
OPTN	Optineurin
PAMPS	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline solution</i>

Poly(I:C)	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PAM-Motiv	<i>protospacer adjacent motif</i>
PINK1	<i>PTEN-induced putative kinase 1</i>
Rab	<i>Ras-related in brain</i>
RT-qPCR	<i>Real-time-quantitative-polymerase-chain-reaction</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RPM	<i>revolutions per minute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RLRs	<i>RIG-I-like-Receptors</i>
Scr-RNA	<i>Scrambled-RNA</i>
SINTBAD	<i>Similar to NAP1 TBK1 adaptor</i>
Sg-RNA	<i>Single-guide-RNA</i>
SEM	Standardfehler
STING	<i>stimulator of interferon genes</i>
TBK1	<i>Tank-binding kinase-1</i>
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
TAX1BP1	<i>Tax-1 binding protein 1</i>
TNC	Tenascin C
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TNFR	TNF α -Rezeptor
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
TLRs	<i>Toll-like receptors</i>
TANK	TRAF family member-associated- NF- κ B activator
TIM	TRAF-Interaktions-Motiv
Tracer-RNA	<i>Trans-activating-CRISPR-RNA</i>
TRIM25	<i>Tripartite motif-containing protein 25</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS-T	<i>Tris-buffered-saline</i> mit Tween

TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UBD	Ubiquitinbindedomäne
UTR	Untranslatierte Region
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
WT	Wildtyp
YFV	<i>Yellow fever virus</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
5´-	5´-triphosphat RNA
pppRNA	

7. Referenzen

1. Li Y, Kang J, Horwitz MS. Interaction of an adenovirus E3 14.7-kilodalton protein with a novel tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 1601–1610.
2. Nagabhushana A, Bansal M, Swarup G. Optineurin is required for CYLD-dependent inhibition of TNF α -induced NF- κ B activation. *PLoS One* 2011; 6: e17477.
3. Weil R, Laplantine E, Génin P. Regulation of TBK1 activity by Optineurin contributes to cell cycle-dependent expression of the interferon pathway. *Cytokine Growth Factor Rev* 2016; 29: 23–33.
4. O'Loughlin T, Kruppa AJ, Ribeiro ALR, Edgar JR, Ghannam A, Smith AM, Buss F. OPTN recruitment to a Golgi-proximal compartment regulates immune signalling and cytokine secretion. *J Cell Sci.*; 2020: 239822.
5. Tanishima M, Takashima S, Honda A, Yasuda D, Tanikawa T, Ishii S, et al. Identification of optineurin as an interleukin-1 receptor-associated kinase 1-binding protein and its role in regulation of MyD88-dependent signaling. *J Biol Chem* 2017; 292: 17250–17257.
6. Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, et al. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 4039–4044.
7. Chew TS, O'Shea NR, Sewell GW, Oehlers SH, Mulvey CM, Crosier PS, et al. Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis Model Mech* 2015; 8: 817–829.
8. Obaid R, Wani SE, Azfer A, Hurd T, Jones R, Cohen P, et al. Optineurin Negatively Regulates Osteoclast Differentiation by Modulating NF- κ B and Interferon Signaling: Implications for Paget's Disease. *Cell Rep* 2015; 13: 1096–1102.
9. Akizuki M, Yamashita H, Uemura K, Maruyama H, Kawakami H, Ito H, et al. Optineurin suppression causes neuronal cell death via NF- κ B pathway. *J Neurochem* 2013; 126: 699–704.
10. Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1: 1–13.
11. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.
12. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart J-M, Hoffmann JA. Pillars article: the dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996. 86: 973-983. *J Immunol* 2012; 188: 5210–5220.
13. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, JR. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394–397.
14. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *SCIENCE* 1998; 282: 2085–2088.
15. Murphy K, Weaver C. *Janeway Immunologie*. 9th ed.: Springer-Verlag GmbH Deutschland, ein Teil von Springer Nature; 2018.

16. Moresco EMY, LaVine D, Beutler B. Toll-like receptors. *Current biology* : CB 2011; 21: R488-93.
17. Geijtenbeek TBH, Gringhuis SI. Signalling through C-type lectin receptors: Shaping immune responses. *Nature reviews. Immunology* 2009; 9: 465–479.
18. Hoving JC, Wilson GJ, Brown GD. Signalling C-type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular microbiology* 2014; 16: 185–194.
19. Kim YK, Shin JS, Nahm MH. NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases. *Yonsei medical journal* 2016; 57: 5–14.
20. Zhong Y, Kinio A, Saleh M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Frontiers in immunology* 2013; 4: 333.
21. Brunette RL, Young JM, Whitley DG, Brodsky IE, Malik HS, Stetson DB. Extensive evolutionary and functional diversity among mammalian AIM2-like receptors. *The Journal of experimental medicine* 2012; 209: 1969–1983.
22. Brubaker SW, Bonham KS, Zanoni I, Kagan JC. Innate immune pattern recognition: A cell biological perspective. *Annu Rev Immunol* 2015; 33: 257–290.
23. Loo Y-M, Gale M. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity* 2011; 34: 680–692.
24. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 347: 1260419.
25. Luo D, Ding SC, Vela A, Kohlway A, Lindenbach BD, Pyle AM. Structural insights into RNA recognition by RIG-I. *Cell* 2011; 147: 409–422.
26. Dong-chul Kang, Rahul V. Gopalkrishnan, Qingping Wu, Eckhard Jankowsky, Anna Marie Pyle, Paul B. Fisher. mda-5 An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99 (2): 637–642.
27. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101–105.
28. Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *SCIENCE* 2006; 314(5801): 994–997.
29. Machlin ES, Sarnow P, Sagan SM. Masking the 5' terminal nucleotides of the hepatitis C virus genome by an unconventional microRNA-target RNA complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 3193–3198.
30. Xiao S, Scott F, Fierke CA, Engelke DR. Eukaryotic ribonuclease P: A plurality of ribonucleoprotein enzymes. *Annu Rev Biochem* 2002; 71: 165–189.
31. Decatur WA, Fournier MJ. RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem* 2003; 278: 695–698.
32. Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, Herzner A-M, Zillinger T, Goldeck M, et al. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* 2015; 43: 41–51.

33. Andreas Schmidta,1, Tobias Schwerda,1, Wolfgang Hamma,1, Johannes C. Hellmutha, Sheng Cuib, Michael Wenzela, Franziska S. Hoffmanna, Marie-Cecile Michalletc, Robert Beschd, Karl-Peter Hopfnerb, Stefan Endresa, and Simon Rothenfusse. 5 γ -triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I 2009; 106(29): 12067–12072.
34. Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Puijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, et al. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014; 514: 372–375.
35. Chen YG, Kim MV, Chen X, Batista PJ, Aoyama S, Wilusz JE, et al. Sensing Self and Foreign Circular RNAs by Intron Identity. *Mol Cell* 2017; 67: 228-238.e5.
36. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Satoh E, Hirai R, Kawai T, Matsushita K, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *The Journal of experimental medicine* 2008; 205: 1601–1610.
37. Triantafilou K, Vakakis E, Kar S, Richer E, Evans GL, Triantafilou M. Visualisation of direct interaction of MDA5 and the dsRNA replicative intermediate form of positive strand RNA viruses. *J Cell Sci* 2012; 125: 4761–4769.
38. Sumpter R, Loo Y-M, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005; 79: 2689–2699.
39. Lamborn IT, Jing H, Zhang Y, Drutman SB, Abbott JK, Munir S, et al. Recurrent rhinovirus infections in a child with inherited MDA5 deficiency. *The Journal of experimental medicine* 2017; 214: 1949–1972.
40. Pothlichet J, Burtsey A, Kubarenko AV, Caignard G, Solhonne B, Tangy F, et al. Study of human RIG-I polymorphisms identifies two variants with an opposite impact on the antiviral immune response. *PLoS One* 2009; 4: e7582.
41. Jørgensen SE, Christiansen M, Ryø LB, Gad HH, Gjedsted J, Staeheli P, Mikkelsen JG, Storgaard M, Hartmann R, Mogensen TH. Defective RNA sensing by RIG-I in severe influenza virus infection. *Clin Exp Immunol.* 2018; 192(3): 366–376.
42. Lee S, Zhang Y, Newhams M, Novak T, Thomas PG, Mourani PM, et al. DDX58 Is Associated With Susceptibility to Severe Influenza Virus Infection in Children and Adolescents. *J Infect Dis* 2022; 226: 2030–2036.
43. Robinson T, Kariuki SN, Franek BS, Kumabe M, Kumar AA, Badaracco M, et al. Autoimmune disease risk variant of IFIH1 is associated with increased sensitivity to IFN- α and serologic autoimmunity in lupus patients. *J Immunol* 2011; 187: 1298–1303.
44. Sutherland A, Davies J, Owen CJ, Vaikkakara S, Walker C, Cheetham TD, et al. Genomic polymorphism at the interferon-induced helicase (IFIH1) locus contributes to Graves' disease susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92: 3338–3341.
45. Ferreira RC, Pan-Hammarström Q, Graham RR, Gateva V, Fontán G, Lee AT, et al. Association of IFIH1 and other autoimmunity risk alleles with selective IgA deficiency. *Nat Genet* 2010; 42: 777–780.

46. Oda H, Nakagawa K, Abe J, Awaya T, Funabiki M, Hijikata A, et al. Aicardi-Goutières syndrome is caused by IFIH1 mutations. *Am J Hum Genet* 2014; 95: 121–125.
47. Pettersson M, Bergendal B, Norderyd J, Nilsson D, Anderlid B-M, Nordgren A, et al. Further evidence for specific IFIH1 mutation as a cause of Singleton-Merten syndrome with phenotypic heterogeneity. *Am J Med Genet A* 2017; 173: 1396–1399.
48. Saito T, Hirai R, Loo YM, Owen D, Johnson CL, Sinha SC, Akira S, Fujita T, Gale M Jr. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jan; 9;104(2): 582–587.
49. Berke IC, Modis Y. MDA5 cooperatively forms dimers and ATP-sensitive filaments upon binding double-stranded RNA. *EMBO J* 2012; 31: 1714–1726.
50. Kowalinski E, Lunardi T, McCarthy AA, Louber J, Brunel J, Grigorov B, et al. Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA. *Cell* 2011; 147: 423–435.
51. Jiang F, Ramanathan A, Miller MT, Tang G-Q, Gale M, Patel SS, et al. Structural basis of RNA recognition and activation by innate immune receptor RIG-I. *Nature* 2011; 479: 423–427.
52. Civril F, Bennett M, Moldt M, Deimling T, Witte G, Schiesser S, et al. The RIG-I ATPase domain structure reveals insights into ATP-dependent antiviral signalling. *EMBO Rep* 2011; 12: 1127–1134.
53. Patel JR, Jain A, Chou Y, Baum A, Ha T, García-Sastre A. ATPase-driven oligomerization of RIG-I on RNA allows optimal activation of type-I interferon. *EMBO Rep* 2013; 14: 780–787.
54. Gack MU, Shin YC, Joo C-H, Urano T, Liang C, Sun L, et al. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007; 446: 916–920.
55. Oshiumi H, Matsumoto M, Hatakeyama S, Seya T. Riplet/RNF135, a RING finger protein, ubiquitinates RIG-I to promote interferon-beta induction during the early phase of viral infection. *J Biol Chem* 2009; 284: 807–817.
56. Oshiumi H, Miyashita M, Inoue N, Okabe M, Matsumoto M, Seya T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. *Cell Host Microbe* 2010; 8: 496–509.
57. Oshiumi H, Miyashita M, Matsumoto M, Seya T. A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003533.
58. Arimoto K, Takahashi H, Hishiki T, Konishi H, Fujita T, Shimotohno K. Negative regulation of the RIG-I signaling by the ubiquitin ligase RNF125. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 May; 1;104(18): 7500–7505.
59. Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: Their regulation and roles in RNA sensing. *Nature reviews. Immunology* 2020; 20: 537–551.
60. Gack MU, Nistal-Villán E, Inn K-S, García-Sastre A, Jung JU. Phosphorylation-mediated negative regulation of RIG-I antiviral activity. *J Virol* 2010; 84: 3220–3229.

61. Maharaj NP, Wies E, Stoll A, Gack MU. Conventional Protein Kinase C- (PKC-) and PKC- Negatively Regulate RIG-I Antiviral Signal Transduction. *J Virol* 2012; 86: 1358–1371.
62. Wies E, Wang MK, Maharaj NP, Chen K, Zhou S, Finberg RW, et al. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity* 2013; 38: 437–449.
63. Wu B, Peisley A, Tetrault D, Li Z, Egelman EH, Magor KE, et al. Molecular Imprinting as a Signal-Activation Mechanism of the Viral RNA Sensor RIG-I. *Mol Cell* 2014; 55: 511–523.
64. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, et al. The RNA Helicase Lgp2 Inhibits TLR-Independent Sensing of Viral Replication by Retinoic Acid-Inducible Gene-I. *J Immunol* 2005; 175: 5260–5268.
65. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol* 2005; 175: 2851–2858.
66. Satoh T, Kato H, Kumagai Y, Yoneyama M, Sato S, Matsushita K, et al. LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 1512–1517.
67. Seth RB, Sun L, Ea C-K, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell* 2005; 122: 669–682.
68. Potter JA, Randall RE, Taylor GL. Crystal structure of human IPS-1/MAVS/VISA/Cardif caspase activation recruitment domain. *BMC Struct Biol* 2008; 8: 11.
69. Odendall C, Dixit E, Stavru F, Bierne H, Franz KM, Durbin AF, et al. Diverse intracellular pathogens activate type III interferon expression from peroxisomes. *Nature immunology* 2014; 15: 717–726.
70. Dixit E, Boulant S, Zhang Y, Lee ASY, Odendall C, Shum B, et al. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. *Cell* 2010; 141: 668–681.
71. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 14590–14595.
72. Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang Q-X, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011; 146: 448–461.
73. Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, Sun L, Chen ZJ. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* 2013 Aug; 14;2.
74. Supriya K Saha,^{1,2,*} Eric M Pietras,^{1,*} Jeannie Q He,¹ Jason R Kang,¹ Su-Yang Liu,² Gagik Oganessian,^{1,2} Arash Shahangian,^{1,2} Brian Zarnegar,¹ Travis L Shiba,¹ Yao Wang,¹ and Genhong Cheng^{1,3,a}. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. *EMBO J* 2006 Jul 26; 25(14): 3257–3263.
75. Oganessian G, Saha SK, Guo B, He JQ, Shahangian A, Zarnegar B, et al. Critical role of TRAF3 in the Toll-like receptor-dependent and -independent antiviral response. *Nature* 2006; 439: 208–211.

76. Shi Y, Yuan B, Qi N, Zhu W, Su J, Li X, et al. An autoinhibitory mechanism modulates MAVS activity in antiviral innate immune response. *Nat Commun* 2015; 6: 7811.
77. Fang R, Jiang Q, Zhou X, Wang C, Guan Y, Tao J, et al. MAVS activates TBK1 and IKKε through TRAFs in NEMO dependent and independent manner. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006720.
78. Zhao T, Yang L, Sun Q, Arguello M, Ballard DW, Hiscott J, et al. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-κB and interferon regulatory factor signaling pathways. *Nature immunology* 2007; 8: 592–600.
79. Zeng W, Xu M, Liu S, Sun L, Chen ZJ. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. *Mol Cell* 2009; 36: 315–325.
80. Ryzhakov G RF. SINTBAD, a novel component of innate antiviral immunity, shares a TBK1-binding domain with NAP1 and TANK. *EMBO J* 2007 Jul; 11;26(13): 3180–3190.
81. Sasai M, Shingai M, Funami K, Yoneyama M, Fujita T, Matsumoto M, et al. NAK-associated protein 1 participates in both the TLR3 and the cytoplasmic pathways in type I IFN induction. *J Immunol* 2006; 177: 8676–8683.
82. Helgason E, Phung QT, Dueber EC. Recent insights into the complexity of Tank-binding kinase 1 signaling networks: The emerging role of cellular localization in the activation and substrate specificity of TBK1. *FEBS Lett* 2013; 587: 1230–1237.
83. Li S, Wang L, Berman M, Kong Y-Y, Dorf ME. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. *Immunity* 2011; 35: 426–440.
84. Korac J, Schaeffer V, Kovacevic I, Clement AM, Jungblut B, Behl C, et al. Ubiquitin-independent function of optineurin in autophagic clearance of protein aggregates. *J Cell Sci* 2013; 126: 580–592.
85. Bodur C, Kazyken D, Huang K, Ekim Ustunel B, Siroky KA, Tooley AS, et al. The IKK-related kinase TBK1 activates mTORC1 directly in response to growth factors and innate immune agonists. *EMBO J* 2018; 37: 19–38.
86. Ikeda F, Hecker CM, Rozenknop A, Nordmeier RD, Rogov V, Hofmann K, Akira S, Dötsch V, Dikic I. Involvement of the ubiquitin-like domain of TBK1/IKK-ε kinases in regulation of IFN-inducible genes. *EMBO J*. 2007 Jul; 25;26(14): 3451–3462.
87. Ma X, Helgason E, Phung QT, Quan CL, Iyer RS, Lee MW, et al. Molecular basis of Tank-binding kinase 1 activation by transautophosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 9378–9383.
88. Liu S, Cai X, Wu J, Cong Q, Chen X, Li T, et al. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. *Science (New York, N.Y.)* 2015; 347: aaa2630.
89. Yang H, Lin CH, Ma G, Baffi MO, Wathélet MG. Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators. *J Biol Chem* 2003; 278: 15495–15504.
90. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol*. 1998 May; 18(5): 2986–2996.

91. Lin R, Mamane Y, Hiscott J. Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol Cell Biol.*; 1999 Apr: 2465–2474.
92. Li Deng, Wang C, Spencer E, Yang L, Braun A, You J, et al. Activation of the I κ B Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain. *Cell* 2000; 103: 351–361.
93. Chariot A, Leonardi A, Muller J, Bonif M, Brown K, Siebenlist U. Association of the adaptor TANK with the I kappa B kinase (IKK) regulator NEMO connects IKK complexes with IKK epsilon and TBK1 kinases. *J Biol Chem* 2002; 277: 37029–37036.
94. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat Cell Biol* 2005 Aug; 7(8): 758–765.
95. Wu C-J, Conze DB, Li T, Srinivasula SM, Ashwell JD. Sensing of Lys 63-linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF-kappaB activation corrected. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 398–406.
96. Chen L-F, Greene WC. Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 392–401.
97. Panne D. The enhanceosome. *Curr Opin Struct Biol* 2008; 18: 236–242.
98. Perng Y-C, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol* 2018; 16: 423–439.
99. Rackov G, Shokri R, Mon MÁ de, Martínez-A C, Balomenos D. The Role of IFN- β during the Course of Sepsis Progression and Its Therapeutic Potential. *Frontiers in immunology* 2017; 8: 493.
100. Akira S KT. IL-6 and NF-IL6 in Acute-Phase Response and Viral Infection. *Immunol Rev* 1992; 127: 25–50.
101. Ivashkiv LB, Donlin LT. Regulation of type I interferon responses. *Nature reviews. Immunology* 2014; 14: 36–49.
102. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 2011; 472: 481–485.
103. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 2014; 32: 513–545.
104. Hervas-Stubbs S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin Cancer Res* 2011; 17: 2619–2627.
105. Li M, Chen Y, Chen T, Hu S, Chen L, Shen L, et al. A host-based whole genome sequencing study reveals novel risk loci associated with severity of influenza A(H1N1)pdm09 infection. *Emerg Microbes Infect* 2021: 1–76.
106. Pothlichet J, Niewold TB, Vitour D, Solhonne B, Crow MK, Si-Tahar M. A loss-of-function variant of the antiviral molecule MAVS is associated with a subset of systemic lupus patients. *EMBO Mol Med* 2011; 3: 142–152.

107. Funabiki M, Kato H, Miyachi Y, Toki H, Motegi H, Inoue M, et al. Autoimmune disorders associated with gain of function of the intracellular sensor MDA5. *Immunity* 2014; 40: 199–212.
108. Qi N, Shi Y, Zhang R, Zhu W, Yuan B, Li X, et al. Multiple truncated isoforms of MAVS prevent its spontaneous aggregation in antiviral innate immune signalling. *Nat Commun* 2017; 8: 15676.
109. Brubaker SW, Gauthier AE, Mills EW, Ingolia NT, Kagan JC. A bicistronic MAVS transcript highlights a class of truncated variants in antiviral immunity. *Cell* 2014; 156: 800–811.
110. Ren Z, Ding T, Zuo Z, Xu Z, Deng J, Wei Z. Regulation of MAVS Expression and Signaling Function in the Antiviral Innate Immune Response. *Frontiers in immunology* 2020; 11: 1030.
111. Yoo Y-S, Park Y-Y, Kim J-H, Cho H, Kim S-H, Lee H-S, et al. The mitochondrial ubiquitin ligase MARCH5 resolves MAVS aggregates during antiviral signalling. *Nat Commun* 2015; 6: 7910.
112. Choi YB, Shembade N, Parvatiyar K, Balachandran S, Harhaj EW. TAX1BP1 Restrains Virus-Induced Apoptosis by Facilitating Itch-Mediated Degradation of the Mitochondrial Adaptor MAVS. *Mol Cell Biol* 2016 Dec; 19;37(1): e00422-16.
113. Liu B, Zhang M, Chu H, Zhang H, Wu H, Song G, et al. The ubiquitin E3 ligase TRIM31 promotes aggregation and activation of the signaling adaptor MAVS through Lys63-linked polyubiquitination. *Nature immunology* 2017; 18: 214–224.
114. Dai T, Wu L, Wang S, Wang J, Xie F, Zhang Z, et al. FAF1 Regulates Antiviral Immunity by Inhibiting MAVS but Is Antagonized by Phosphorylation upon Viral Infection. *Cell Host Microbe* 2018; 24: 776-790.e5.
115. Liu C, Huang S, Wang X, Wen M, Zheng J, Wang W, et al. The Otubain YOD1 Suppresses Aggregation and Activation of the Signaling Adaptor MAVS through Lys63-Linked Deubiquitination. *J Immunol* 2019; 202: 2957–2970.
116. Vitour D, Dabo S, Ahmadi Pour M, Vilasco M, Vidalain P-O, Jacob Y, et al. Polo-like kinase 1 (PLK1) regulates interferon (IFN) induction by MAVS. *J Biol Chem* 2009; 284: 21797–21809.
117. Song T, Wei C, Zheng Z, Xu Y, Cheng X, Yuan Y, et al. c-Abl tyrosine kinase interacts with MAVS and regulates innate immune response. *FEBS Lett* 2010; 584: 33–38.
118. Xiang W, Zhang Q, Lin X, Wu S, Zhou Y, Meng F, et al. PPM1A silences cytosolic RNA sensing and antiviral defense through direct dephosphorylation of MAVS and TBK1. *Sci Adv* 2016; 2: e1501889.
119. Jiang C, Zhou Z, Quan Y, Zhang S, Wang T, Zhao X, et al. CARMA3 Is a Host Factor Regulating the Balance of Inflammatory and Antiviral Responses against Viral Infection. *Cell Rep* 2016; 14: 2389–2401.
120. Nie Y, Ran Y, Zhang H-Y, Huang Z-F, Pan Z-Y, Wang S-Y, et al. GPATCH3 negatively regulates RLR-mediated innate antiviral responses by disrupting the assembly of VISA signalosome. *PLoS Pathog* 2017; 13: e1006328.

121. Jin S, Tian S, Luo M, Xie W, Liu T, Duan T, et al. Tetherin Suppresses Type I Interferon Signaling by Targeting MAVS for NDP52-Mediated Selective Autophagic Degradation in Human Cells. *Mol Cell* 2017; 68: 308-322.e4.
122. Xia M, Gonzalez P, Li C, Meng G, Jiang A, Wang H, et al. Mitophagy enhances oncolytic measles virus replication by mitigating DDX58/RIG-I-like receptor signaling. *J Virol* 2014; 88: 5152–5164.
123. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160: 189–200.
124. Onoguchi K, Onomoto K, Takamatsu S, Jogi M, Takemura A, Morimoto S, et al. Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001012.
125. Yasukawa K, Oshiumi H, Takeda M, Ishihara N, Yanagi Y, Seya T, et al. Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling. *Sci Signal* 2009; 2: ra47.
126. Ben-Sahra I, Howell JJ, Asara JM, Manning BD. Stimulation of de novo pyrimidine synthesis by growth signaling through mTOR and S6K1. *Science (New York, N.Y.)* 2013; 339: 1323–1328.
127. Bothe V. Identification and characterization of activators and modulators in the antiviral RIG-I-like receptor pathway [Dissertationen]. München: Ludwig-Maximilians-Universität; 2019.
128. Bryk R, Lima CD, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C. Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein. *Science (New York, N.Y.)* 2002; 295: 1073–1077.
129. Slowicka K, Vereecke L, van Loo G. Cellular Functions of Optineurin in Health and Disease. *Trends Immunol* 2016; 37: 621–633.
130. Kachaner D, Génin P, Laplantine E, Weil R. Toward an integrative view of Optineurin functions. *Cell Cycle* 2012; 11: 2808–2818.
131. Rezaie T, Sarfarazi M. Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin. *Genomics* 2005; 85: 131–138.
132. Rezaie T, Child A, Hitchings R, Brice G, Miller L, Coca-Prados M, Héon E, Krupin T, Ritch R, Kreutzer D, Crick RP, Sarfarazi M. Adult-onset primary open-angle glaucoma caused by mutations in optineurin. *SCIENCE* 2002; 295: 1077–1079.
133. Willoughby CE, Chan LL, Herd S, Billingsley G, Noordeh N, Levin AV, Buys Y, Trope G, Sarfarazi M, Héon E. Defining the Pathogenicity of Optineurin in Juvenile. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Sep; 45(9): 3122–3130.
134. Schwamborn K, Weil R, Courtois G, Whiteside ST, Israël A. Phorbol esters and cytokines regulate the expression of the NEMO-related protein, a molecule involved in a NF-kappa B-independent pathway. *J Biol Chem* 2000; 275: 22780–22789.
135. Sudhakar C, Nagabhushana A, Jain N, Swarup G. NF-kappaB mediates tumor necrosis factor alpha-induced expression of optineurin, a negative regulator of NF-kappaB. *PLoS One* 2009; 4: e5114.

136. Mankouri J, Fragkoudis R, Richards KH, Wetherill LF, Harris M, Kohl A, et al. Optineurin negatively regulates the induction of IFN β in response to RNA virus infection. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000778.
137. Stroissnigg H, Repitz M, Miloloza A, Linhartova I, Beug H, Wiche G, et al. FIP-2, an IkappaB-kinase-gamma-related protein, is associated with the Golgi apparatus and translocates to the marginal band during chicken erythroblast differentiation. *Exp Cell Res* 2002; 278: 133–145.
138. Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, et al. Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth. *Science (New York, N.Y.)* 2011; 333: 228–233.
139. Chan EYW, Kir S, Tooze SA. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 25464–25474.
140. Itakura E, Mizushima N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 2010; 6: 764–776.
141. Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, et al. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 2008; 182: 685–701.
142. Polson HEJ, Lartigue J de, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 2010; 6: 506–522.
143. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131–24145.
144. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 2000 Nov; 19(21): 5720–5728.
145. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7: 279–296.
146. Samie M, Lim J, Verschueren E, Baughman JM, Peng I, Wong A, et al. Selective autophagy of the adaptor TRIF regulates innate inflammatory signaling. *Nature immunology* 2018; 19: 246–254.
147. Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature reviews. Immunology* 2013; 13: 722–737.
148. Slowicka K, Vereecke L, Mc Guire C, Sze M, Maelfait J, Kolpe A, et al. Optineurin deficiency in mice is associated with increased sensitivity to *Salmonella* but does not affect proinflammatory NF- κ B signaling. *Eur J Immunol* 2016; 46: 971–980.
149. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* 2015; 125: 42–46.
150. Liu Z, Chen P, Gao H, Gu Y, Yang J, Peng H, et al. Ubiquitylation of autophagy receptor Optineurin by HACE1 activates selective autophagy for tumor suppression. *Cancer Cell* 2014; 26: 106–120.

151. Wauer T, Simicek M, Schubert A, Komander D. Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature* 2015; 524: 370–374.
152. Heo J-M, Ordureau A, Paulo JA, Rinehart J, Harper JW. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Mol Cell* 2015; 60: 7–20.
153. Moore AS, Holzbaur ELF. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E3349-58.
154. Hattula K, Peränen J. FIP-2, a coiled-coil protein, links Huntingtin to Rab8 and modulates cellular morphogenesis. *Current Biology* 2000; 10: 1603–1606.
155. Del Toro D, Alberch J, Lázaro-Diéguez F, Martín-Ibáñez R, Xifró X, Egea G, et al. Mutant huntingtin impairs post-Golgi trafficking to lysosomes by delocalizing optineurin/Rab8 complex from the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 2009; 20: 1478–1492.
156. Sahlender DA, Roberts RC, Arden SD, Spudich G, Taylor MJ, Luzio JP, et al. Optineurin links myosin VI to the Golgi complex and is involved in Golgi organization and exocytosis. *J Cell Biol* 2005; 169: 285–295.
157. Quigley HA VS. Models of open-angle glaucoma prevalence and incidence in the United States. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997; 38(1): 83–91.
158. Kwon YH, Fingert JH, Kuehn MH, Alward WLM. Primary open-angle glaucoma. *N Engl J Med* 2009; 360: 1113–1124.
159. Sarfarazi M. Recent advances in molecular genetics of glaucomas. *Hum Mol Genet* 1997; 6(10): 1667–1677.
160. Smith AM, Sewell GW, Levine AP, Chew TS, Dunne J, O'Shea NR, et al. Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn's disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology* 2015; 144: 45–55.
161. Galson DL, Roodman GD. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *J Bone Metab* 2014; 21: 85–98.
162. Albagha OME, Visconti MR, Alonso N, Langston AL, Cundy T, Dargie R, et al. Genome-wide association study identifies variants at CSF1, OPTN and TNFRSF11A as genetic risk factors for Paget's disease of bone. *Nat Genet* 2010; 42: 520–524.
163. Maruyama H, Morino H, Ito H, Izumi Y, Kato H, Watanabe Y, et al. Mutations of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 2010; 465: 223–226.
164. Osawa T, Mizuno Y, Fujita Y, Takatama M, Nakazato Y, Okamoto K. Optineurin in neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 2011; 31: 569–574.
165. Chalasani MLS, Kumari A, Radha V, Swarup G. E50K-OPTN-induced retinal cell death involves the Rab GTPase-activating protein, TBC1D17 mediated block in autophagy. *PLoS One* 2014; 9: e95758.
166. Tschurtschenthaler M, Adolph TE. The Selective Autophagy Receptor Optineurin in Crohn's Disease. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 766.

167. Minegishi Y, Iejima D, Kobayashi H, Chi Z-L, Kawase K, Yamamoto T, et al. Enhanced optineurin E50K-TBK1 interaction evokes protein insolubility and initiates familial primary open-angle glaucoma. *Hum Mol Genet* 2013; 22: 3559–3567.
168. Sirohi K, Chalasan MLS, Sudhakar C, Kumari A, Radha V, Swarup G. M98K-OPTN induces transferrin receptor degradation and RAB12-mediated autophagic death in retinal ganglion cells. *Autophagy* 2013; 9: 510–527.
169. Sirohi K, Kumari A, Radha V, Swarup G. A Glaucoma-Associated Variant of Optineurin, M98K, Activates Tbk1 to Enhance Autophagosome Formation and Retinal Cell Death Dependent on Ser177 Phosphorylation of Optineurin. *PLoS One* 2015; 10: e0138289.
170. Shen W-C, Li H-Y, Chen G-C, Chern Y, Tu P-H. Mutations in the ubiquitin-binding domain of OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of misfolded proteins by a dominant-negative mechanism. *Autophagy* 2015; 11: 685–700.
171. Ea C-K, Li Deng, Xia Z-P, Pineda G, Chen ZJ. Activation of IKK by TNFalpha requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol Cell* 2006; 22: 245–257.
172. Zhu G, Wu C-J, Zhao Y, Ashwell JD. Optineurin negatively regulates TNFalpha-induced NF-kappaB activation by competing with NEMO for ubiquitinated RIP. *Current biology : CB* 2007; 17: 1438–1443.
173. Montecalvo A, Watkins SC, Orange J, Kane LP. Inducible turnover of optineurin regulates T cell activation. *Molecular immunology* 2017; 85: 9–17.
174. Génin P, Cuvelier F, Lambin S, Côte-Real Filipe J, Autrusseau E, Laurent C, et al. Optineurin regulates the interferon response in a cell cycle-dependent manner. *PLoS Pathog* 2015; 11: e1004877.
175. Munitic I, Giardino Torchia ML, Meena NP, Zhu G, Li CC, Ashwell JD. Optineurin insufficiency impairs IRF3 but not NF-κB activation in immune cells. *J Immunol* 2013; 191: 6231–6240.
176. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science (New York, N.Y.)* 2003; 301: 640–643.
177. Sakaguchi T, Irie T, Kawabata R, Yoshida A, Maruyama H, Kawakami H. Optineurin with amyotrophic lateral sclerosis-related mutations abrogates inhibition of interferon regulatory factor-3 activation. *Neurosci Lett* 2011; 505: 279–281.
178. Morton S, Hesson L, Peggie M, Cohen P. Enhanced binding of TBK1 by an optineurin mutant that causes a familial form of primary open angle glaucoma. *FEBS Lett* 2008; 582: 997–1002.
179. Gleason CE, Ordureau A, Gourlay R, Arthur JSC, Cohen P. Polyubiquitin binding to optineurin is required for optimal activation of TANK-binding kinase 1 and production of interferon β. *J Biol Chem* 2011; 286: 35663–35674.
180. Meena NP, Zhu G, Mittelstadt PR, Giardino Torchia ML, Pourcelot M, Arnoult D, et al. The TBK1-binding domain of optineurin promotes type I interferon responses. *FEBS Lett* 2016; 590: 1498–1508.

181. Song G, Liu B, Li Z, Wu H, Wang P, Zhao K, et al. E3 ubiquitin ligase RNF128 promotes innate antiviral immunity through K63-linked ubiquitination of TBK1. *Nature immunology* 2016; 17: 1342–1351.
182. Bakshi S, Taylor J, Strickson S, McCartney T, Cohen P. Identification of TBK1 complexes required for the phosphorylation of IRF3 and the production of interferon β . *Biochem J* 2017; 474: 1163–1174.
183. Yoneyama M, Suhara W, Fukuhara Y, Sato M, Ozato K, Fujita T. Autocrine amplification of type I interferon gene expression mediated by interferon stimulated gene factor 3 (ISGF3). *J Biochem* 1996; 120: 160–169.
184. Lin R, Heylbroeck C, Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 2986–2996.
185. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science (New York, N.Y.)* 2016; 351: 84–88.
186. Kim S, Bae T, Hwang J, Kim J-S. Rescue of high-specificity Cas9 variants using sgRNAs with matched 5' nucleotides. *Genome Biol* 2017; 18: 218.
187. Xing Y, Liqi Z, Jian L, Qinghua Y, Qian Y. Doxycycline Induces Mitophagy and Suppresses Production of Interferon- β in IPEC-J2 Cells. *Front Cell Infect Microbiol* 2017; 7: 21.
188. Ahmed M, McKenzie MO, Puckett S, Hojnacki M, Poliquin L, Lyles DS. Ability of the matrix protein of vesicular stomatitis virus to suppress beta interferon gene expression is genetically correlated with the inhibition of host RNA and protein synthesis. *J Virol* 2003; 77: 4646–4657.
189. Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, et al. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 4039–4044.
190. Outlioua A, Pourcelot M, Arnoult D. The Role of Optineurin in Antiviral Type I Interferon Production. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 853.
191. Mosca JD PPM. Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. *Mol Cell Biol.* 1986 Jun; 6(6): 2279–2283.
192. Manghwar H, Li B, Ding X, Hussain A, Lindsey K, Zhang X, et al. CRISPR/Cas Systems in Genome Editing: Methodologies and Tools for sgRNA Design, Off-Target Evaluation, and Strategies to Mitigate Off-Target Effects. *Adv Sci (Weinh)* 2020; 7: 1902312.
193. Hruscha A, Krawitz P, Rechenberg A, Heinrich V, Hecht J, Haass C, et al. Efficient CRISPR/Cas9 genome editing with low off-target effects in zebrafish. *Development* 2013; 140: 4982–4987.
194. Newton MD, Taylor BJ, Driessen RPC, Roos L, Cveticic N, Allyjaun S, et al. DNA stretching induces Cas9 off-target activity. *Nat Struct Mol Biol* 2019; 26: 185–192.
195. Borrelli VMG, Brambilla V, Rogowsky P, Marocco A, Lanubile A. The Enhancement of Plant Disease Resistance Using CRISPR/Cas9 Technology. *Front Plant Sci* 2018; 9: 1245.

196. Pourcelot M, Zemirli N, Da Silva Costa L, Loyant R, Garcin D, Vitour D, et al. The Golgi apparatus acts as a platform for TBK1 activation after viral RNA sensing. *BMC Biol* 2016; 14: 69.
197. Clark K, Plater L, Peggie M, Cohen P. Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and I κ B kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* 2009; 284: 14136–14146.
198. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 2007; 282: 11817–11826.
199. Chau T-L, Gioia R, Gatot J-S, Patrascu F, Carpentier I, Chapelle J-P, et al. Are the IKKs and IKK-related kinases TBK1 and IKK-epsilon similarly activated? *Trends Biochem Sci* 2008; 33: 171–180.
200. Guo B, Cheng G. Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK. *J Biol Chem* 2007; 282: 11817–11826.
201. Jin SM, Lazarou M, Wang C, Kane LA, Narendra DP, Youle RJ. Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 2010; 191: 933–942.
202. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* 2015; 524: 309–314.
203. Sun X, Sun L, Zhao Y, Li Y, Lin W, Chen D, et al. MAVS maintains mitochondrial homeostasis via autophagy. *Cell Discov* 2016; 2: 16024.
204. Tal MC, Sasai M, Lee HK, Yordy B, Shadel GS, Iwasaki A. Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Feb; 24;106(8): 2770–2775.
205. Wong YC, Holzbaur ELF. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111: E4439-48.
206. Nguyen TN, Sawa-Makarska J, Khuu G, Lam WK, Adriaenssens E, Fracchiolla D, et al. Unconventional initiation of PINK1/Parkin mitophagy by Optineurin. *Mol Cell* 2023; 83: 1693-1709.e9.
207. Fukushi M, Ohsawa R, Okinaka Y, Oikawa D, Kiyono T, Moriwaki M, et al. Optineurin deficiency impairs autophagy to cause interferon beta overproduction and increased survival of mice following viral infection. *PLoS One* 2023; 18: e0287545.
208. Wang Y, Jiang K, Zhang Q, Meng S, Ding C. Autophagy in Negative-Strand RNA Virus Infection. *Front Microbiol* 2018; 9: 206.
209. Gkikas I, Palikaras K, Tavernarakis N. The Role of Mitophagy in Innate Immunity. *Frontiers in immunology* 2018; 9: 1283.
210. Pomerantz JL BD. NF- κ B activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J*. 1999; 1;18(23): 6694–6704.

8. Danksagung

Bedanken möchte ich mich vorrangig bei meinem Doktorvater Prof. Simon Rothenfußer, der mich stets bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützte. Er verstand es immer, mir Motivation und Begeisterung an der Wissenschaft zu vermitteln. Die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten sowie seine Ideen und Ratschläge waren jederzeit ausschlaggebend. Zusätzlich empfand ich es als Privileg, in kontinuierlichem Kontakt die Ergebnisse diskutieren zu können und so neue Gedanken gemeinsam zu formulieren und umzusetzen. Auch in der Realisation eigener Ideen und Vorschläge war Prof. Rothenfußer stets tatkräftiger Unterstützer und Befürworter.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Viktoria Bothe bedanken, die durch ihre Vorarbeiten und Erkenntnisse die Grundlage dieser Arbeit schaffte. Zusätzlich leitete sie mich in den praktischen Laborarbeiten an und vermittelte mir so die nötigen Fähigkeiten für die Realisation der Experimente. Außerdem stand sie mir ebenfalls immer für Diskussionen und Fragen zur Seite.

Des Weiteren möchte ich mich bei dem gesamten Team der Klinischen Pharmakologie für ein wissenschaftlich anregendes und kameradschaftliches Umfeld bedanken, das es auch in weniger einfachen Zeiten zu einer Freude machte, in die Klinische Pharmakologie zu kommen.

Namentlich möchte ich mich bei Prof. Stefan Endres bedanken, der wesentlich für die Entstehung dieses Arbeitsumfelds verantwortlich ist und der es mir ermöglichte, in der Klinischen Pharmakologie zu arbeiten.

Letztendlich gilt großer Dank meinen Eltern, die mir sowohl finanziell als auch durch ihre immerwährende Unterstützung in jedweder Lebenslage den Abschluss des Studiums und dieser Dissertation ermöglichten.