
Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik Innenstadt

Klinikum der Universität

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Die Erkennung viraler RNA durch den zytoplasmatischen Rezeptor
Retinoic Acid-Inducible Gene I**

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



vorgelegt von
Tobias Schwerd
aus München

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Gunnar Schotta
- Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Ulrich Koszinowski
Prof. Dr. rer. nat. Heiko Hermeking
- Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß
Dr. rer. nat. Andreas Schmidt
- Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR
- Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.2011

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Das Immunsystem des Menschen.....	1
1.1.1	Die zwei Säulen des humanen Immunsystems.....	1
1.1.2	Angeborene und adaptive Immunität bedienen sich unterschiedlicher Erkennungsstrategien.....	1
1.2	Viren und der Mensch.....	2
1.2.1	Das Typ-I-Interferonsystem.....	3
1.2.2	Viruserkennung durch die Wirtszelle.....	3
1.2.2.1	Die Familie der <i>Toll-like</i> -Rezeptoren.....	4
1.2.2.2	Die Familie der <i>RIG-I-like</i> -Rezeptoren.....	4
1.2.2.3	Die Rezeptoren für die DNA-Erkennung.....	5
1.2.3	Die Liganden der <i>RIG-I-like</i> -Rezeptoren.....	6
1.2.4	Signaltransduktion durch RNA-Helikasen.....	7
1.2.5	Die Bedeutung des Interferonsystems.....	9
1.3	Fragestellung.....	10
2.	Material und Methoden.....	12
2.1	Reagenzien, Verbrauchsmittel und Geräte.....	12
2.1.1	Geräte.....	12
2.1.2	Reagenziensätze.....	12
2.1.3	Chemikalien für den Umgang mit Proteinen.....	12
2.1.4	Chemikalien für den Umgang mit Nukleinsäuren.....	13
2.1.5	Materialien für die Zellkultur.....	14
2.1.6	Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen.....	15
2.1.7	Sequenzen von RNA-Oligonukleotiden und <i>Small-interfering</i> -RNA.....	16
2.1.8	DNA-Primer, <i>-templates</i> und -Oligonukleotide.....	17
2.1.9	Plasmide.....	18
2.1.10	Zelllinien.....	18
2.2	Zellulär-immunologische Methoden.....	19
2.2.1	Zellkultur.....	19
2.2.2	Aufreinigung von Zellpopulationen.....	19

2.2.3	Transfektion und Stimulation von Zellen.....	21
2.2.3.1	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Tumorzellen.....	21
2.2.3.2	Stimulation von primären Zellen oder Tumorzellen mit RNA.....	22
2.2.4	ELISA zur Quantifizierung von Interferon- α	22
2.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot.....	23
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	24
2.3.1	<i>In-vitro</i> -Transkription.....	24
2.3.2	Präzipitationsexperimente.....	27
2.3.3	Bindungsstudien mit rekombinantem Protein.....	28
2.3.4	Luciferase-Assay.....	29
2.3.5	ADP-Assay.....	29
2.3.6	Denaturierendes Polyacrylamidgel mit RNA-Oligonukleotiden.....	31
3.	Ergebnisse.....	32
3.1	5'-Triphosphat-RNA als Ligand von RIG-I.....	32
3.1.1	<i>In vitro</i> transkribierte RNA-Oligonukleotide induzieren Interferon- α in humanen Monozyten und Tumorzelllinien.....	32
3.1.2	<i>In vitro</i> transkribierte RNA stimuliert Sequenz-unabhängig – aber 5'-Triphosphat-abhängig.....	35
3.1.3	5'-Triphosphat-RNA induziert Typ-I-Interferon über den zytosolischen Rezeptor RIG-I.....	37
3.2	Der Rezeptor RIG-I und seine RNA-Bindungseigenschaft.....	39
3.2.1	RIG-I bindet 5'-Triphosphat-RNA über seine C-terminalen Domänen.....	39
3.2.2	5'-Triphosphat-RNA bindet an die C-terminale Domäne von RIG-I.....	42
3.2.3	Doppelstrang-RNA verdrängt 5'-Triphosphat-RNA aus der Bindung an RIG-I	43
3.2.4	RIG-I bindet kurze Doppelstrang-RNA unabhängig vom 5'-Ende.....	45
3.3	Der Rezeptor RIG-I und seine ATPase-Funktion.....	47
3.3.1	RIG-I-Interferonsignal setzt aktive ATP-Hydrolyse durch den Rezeptor voraus.....	47
3.3.2	Rekombinantes RIG-I-Protein hydrolysiert ATP <i>in vitro</i>	48
3.3.3	<i>In vitro</i> transkribierte 5'-Triphosphat-RNA und synthetische Doppelstrang-RNA induzieren ATP-Verbrauch von RIG-I.....	49
3.3.4	<i>In vitro</i> transkribierte 5'-Triphosphat-RNA aktiviert RIG-I ATP-Hydrolyse unabhängig vom 5'-Triphosphat.....	50

3.4	Die virale T7-Polymerase erzeugt <i>Copy-back</i> -RNAs als verlängerte Nebenprodukte.....	52
3.4.1	<i>In vitro</i> transkribierte 5'-Triphosphat-RNAs enthalten unerwartete Nebenprodukte.....	52
3.4.2	Lange Nebenprodukte der <i>in-vitro</i> -Transkription aktivieren RIG-I.....	53
3.5	Synthetische 5'-Triphosphat-RNA als definierter RIG-I-Ligand.....	55
3.5.1	5'-Triphosphat-RNA benötigt Basen-gepaarte Abschnitte zur Aktivierung einer RIG-I-vermittelten Interferonantwort.....	55
3.5.2	RIG-I-Liganden benötigen eine freie 5'-Triphosphatgruppe.....	56
4.	Diskussion.....	59
4.1	Übersicht über die experimentellen Befunde.....	59
4.2	Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur.....	62
4.2.1	Der Ligand von RIG-I.....	62
4.2.2	Die strukturellen Mechanismen einer RIG-I-Aktivierung.....	66
4.3	Vergleich mit natürlichen Liganden.....	68
4.4	Immuntherapie mit RIG-I-Liganden.....	69
5.	Zusammenfassung.....	71
6.	Literaturverzeichnis.....	73
7.	Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme.....	78
8.	Danksagung.....	80
9.	Publikationen.....	81
10.	Lebenslauf.....	82

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem des Menschen

Der Mensch lebt in der ständigen Gefahr durch pathogene Keime oder krankhaft veränderte Zellen in seiner Unversehrtheit verletzt zu werden. Das Immunsystem mit seinen Spielern und Effektormechanismen besitzt die Fähigkeit, den menschlichen Organismus vor eindringenden Kleinstlebewesen und pathologisch transformierten Zellen, wie Tumorzellen oder Virus-infizierten Zellen, zu schützen. Das Immunsystem muss dabei körpereigene von fremden Molekülen abgrenzen, um gezielt die Beseitigung von schädlichen Strukturen zu ermöglichen. Diese Unterscheidung zwischen „gesundem Selbst“ und „Fremd“ spielt eine Schlüsselrolle, um die Integrität des Menschen aufrecht zu erhalten.

1.1.1 Die zwei Säulen des humanen Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus einem komplexen Netzwerk von Organen, Zellen und Molekülen. Die zwei funktionellen Grundpfeiler dieses Netzwerkes sind die angeborene und die adaptive Immunität. B- und T-Lymphozyten stellen die zellulären Vertreter der adaptiven Immunität dar. Durch ihre einzigartige Fähigkeit, Antigenrezeptoren durch somatische Rekombination zu bilden, erhalten sie die Eigenschaft ein breites Repertoire an Antigenen zu erkennen. Ein Lymphozyt, ausgestattet mit seinem strukturell einmaligen Rezeptor, beantwortet die Erkennung seines entsprechenden Antigens mit Aktivierung, klonaler Proliferation und effektiven Abwehrstrategien. Diese dreiteilige Antwort, die unter dem Schlagwort der „klonalen Selektion“ zusammengefasst wird, erlaubt es dem Lymphozyten dem schädigenden Agens schlagkräftig gegenüber zu treten. Der Prozess benötigt jedoch drei bis fünf Tage und bedeutet für den Organismus während dieser Zeit unzureichenden Schutz. Diese Schwäche wird durch die angeborene Immunität kompensiert, indem sie Pathogene frühzeitig erkennt. Anschließende Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation ermöglichen die Aktivierung der adaptiven Immunität. Die angeborene Immunität besitzt somit eine duale Funktion: Erstens, Sicherstellung der frühen Abwehr pathogener Invasion und zweitens, Alarmierung des adaptiven Immunsystems. Folglich sind diese zwei Säulen der Immunität nicht isoliert zu betrachten, sondern als vernetztes System, das eine effiziente Immunantwort ermöglicht.

1.1.2 Angeborene und adaptive Immunität bedienen sich unterschiedlicher Erkennungsstrategien

Die angeborene Immunität galt lange als unspezifische Reaktion auf Mikroorganismen und fremde Substanzen, die mit Aufnahme und Verdauung derselbigen beantwortet wurde.

Dieses System agiert jedoch außerordentlich geschickt in der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“. Bereits in den frühen 90er Jahren postulierte Charles Janeway, dass das angeborene Immunsystem molekulare Schlüsselstrukturen, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen kann [1]. Die Erkennung dieser Strukturen macht es dem angeborenen Immunsystem möglich eine erste Verteidigungslinie zu bilden. Obwohl die molekularen Erkennungsstrukturen in ihrem chemischen Aufbau stark differieren, kann man dieser Gruppe drei wesentliche Charakteristika zuschreiben: Erstens sind sie unerlässlich für das Überleben des Mikroorganismus und daher ist eine Mutation ihrer Struktur höchst unwahrscheinlich. Zweitens werden sie von mehreren Spezies geteilt und ermöglichen somit die Erkennung einer gesamten Gruppe an Keimen. Drittens kommen diese Strukturmerkmale im Wirtsorganismus nicht vor, weshalb sie eine Diskriminierung gegenüber eigenen Strukturen gestatten.

Die angeborene Immunität findet man bereits in Invertebraten. Der Selektionsdruck einer langen Evolutionsgeschichte bildete eine Gruppe von Rezeptoren heraus, die diese hochkonservierten Strukturen krankmachender Keime erkennen. Diese von Janeway vorhergesagten Rezeptoren werden *Pathogen-recognition-Rezeptoren* (PRR) genannt. Der lange Evolutionsprozess gewährleistete, dass sich nur „bewährte“ Rezeptoren in der Keimbahn hielten und an die nächste Generation weitergegeben werden konnten. Dies ist sinnvoll, da sich im Vergleich zur Selektionsmöglichkeit von B- und T-Zellen in der adaptiven Immunität der einzelne Mensch unpassender PRRs nicht entledigen kann. Ein Problem stellt jedoch die begrenzte Anzahl der keimbahnkodierten Rezeptoren dar und damit die Bandbreite der erkennbaren fremden Strukturen. Im Lauf eines Lebens können ca. 10^{14} bis 10^{18} verschiedene T- und B-Zellrezeptoren bzw. Immunglobuline durch den Prozess der somatischen Rekombination gebildet werden. Im Vergleich dazu kodieren nur 0,1 bis 1 Prozent der Gene des menschlichen Genoms mit seinen insgesamt ca. 25 000 Genen für Bestandteile des Immunsystems.

1.2 Viren und der Mensch

Viren sind infektiöse Partikel, die in ihrer kleinsten Form aus Proteinen und Nukleinsäuren bestehen. Um sich zu replizieren, dringen Viren in eine Wirtszelle ein, nutzen deren Proteinsynthese und schädigen sie schließlich durch die Bildung von Nachkommenviren. Viren haben die Entstehung der Menschheit koevolutionär begleitet. Daher ist es nicht verwunderlich, dass zur Abwehr dieser Pathogene ein komplexes System entstanden ist. Die unmittelbare Antwort auf eine Virusinfektion beruht auf dem angeborenen Immunsystem, welches lange vor neutralisierenden Antikörpern und zytotoxischen T-Zellen aktiviert wird. Ein wesentlicher Bestandteil des angeborenen Immunsystems ist die Bildung von

Typ-I-Interferonen (IFN), einer Familie von anti-viralen Zytokinen mit IFN- β und zahlreichen IFN- α -Subtypen, deren Wirkung den viralen Lebenszyklus unterbricht und somit die Verbreitung der Viren verhindert [2].

1.2.1 Das Typ-I-Interferonsystem

Im Jahre 1957 veröffentlichten Isaacs und Lindenmann ihre Beobachtung zum Typ-I-Interferonsystem. Sie entdeckten, dass hitzeinaktivierte Influenzaviren in Hühnereizellen eine Resistenz gegen die Vermehrung von lebenden Grippeviren induzieren und auf diese Weise mit der viralen Replikation „interferieren“ [3]. Zahlreiche Arbeiten der vergangenen Jahrzehnte erfassten die potente Wirksamkeit dieser Zytokinfamilie in der Abwehr viraler Infektionen. Van den Broek et al. zeigten 1995 die hohe und schnelle Letalität von Mäusen nach Virusinfektionen bei einer Defizienz für den Typ-I-Interferonrezeptor [4]. Vergleichbar damit stellt sich die Situation bei Kindern dar, die an genetischen Mutationen in Molekülen der Signaltransduktion des Interferonsystems leiden. Die Restaktivität des Abwehrsystems bestimmt hier die Schwere von Virusinfektionen oder kann nach viralen Erkrankungen für eine frühe Letalität verantwortlich sein [5, 6].

Das Typ-I-Interferonsystem vermittelt seine Effekte über eine Kaskade aus zwei Stufen: In der frühen Phase kommt es nach primärer Erkennung eines Pathogens in der Virusinfizierten Zelle direkt zur Sekretion von IFN- β und weiteren Mediatorsubstanzen. Anschließend wird in einer zweiten Phase das Signal amplifiziert. IFN- β bindet auto- und parakrin an den gemeinsamen Rezeptor für Typ-I-Interferone und beeinflusst über den JAK (*Janus kinase*) – STAT (*signal transducer and activator of transcription*) Signalweg die transkriptionelle Induktion einiger hundert Gene, sogenannter *interferon-stimulated genes* (ISGs), darunter IFN- α und erneut IFN- β . Typ-I-Interferone beeinflussen Proteinsynthese, Zellwachstum und Apoptose mit dem gemeinsamen Ziel ein antivirales Milieu in ihrem Zellverband zu schaffen [7]. Darüber hinaus können Interferone die Antwort des adaptiven Immunsystems modulieren. Sie spielen eine Rolle bei der Reifung dendritischer Zellen, fördern die Präsentation viraler Antigene an CD8+ T-Zellen und aktivieren natürliche Killer-Zellen. Damit stellen sie ein Verbindungsglied zwischen den beiden Säulen des Immunsystems dar und sichern die schnelle Eradikation eines Virus [8].

1.2.2 Viruserkennung durch die Wirtszelle

Die Erkennung von Viren als Pathogen setzt voraus, dass ein PRR der Wirtszelle mit molekularen Bausteinen eines Virus (z. B. virale Proteine, Lipide, Nukleinsäuren) interagiert [9]. Bereits wenige Jahre nach der Entdeckung des Typ-I-Interferonsystems wurde erkannt, dass die Induktion antiviraler Typ-I-Interferone von dem molekularen Baustein der „viralen

Nukleinsäure“ bestimmt wird [10, 11]. Eine Beobachtung, die sich bestätigte, so dass Nukleinsäuren heute als die bedeutendste Gruppe viraler PAMPs angesehen werden. Nukleinsäuren von Mikroorganismen sind in ihrer molekularen Grundstruktur identisch mit der RNA und DNA von Wirtszellen. Entsprechend müssen hochentwickelte Rezeptoren vorhanden sein, die eine „Selbst-Nukleinsäuren-“ versus „Fremd-Nukleinsäuren-Erkennung“ in einer Wirtszelle ermöglichen.

Ein Virus durchläuft in seinem Lebenszyklus verschiedene Zellkompartimente. Dementsprechend existieren Mechanismen, die einen viralen Zellbefall zu den unterschiedlichen Zeitpunkten erkennen. Zwei große PRR-Klassen wurden bisher identifiziert, die sich hinsichtlich ihrer Zelllokalisierung wesentlich unterscheiden: Die Familie der membrangebundenen *Toll-like-Rezeptoren* (TLRs) und die Familie der zytoplasmatischen Rezeptoren, die sich wiederum in ihrer Erkennung von viraler RNA oder DNA unterscheiden. *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP-2) werden zur Familie der *RIG-I-like-Rezeptoren* (RLR) zusammengefasst und reagieren auf die Existenz von viraler RNA im Zytoplasma [12, 13]. Für die Detektion zytosolischer, viraler DNA ist eine heterogene Gruppe von Rezeptoren beschrieben (z. B. AIM2, DAI) [14].

1.2.2.1 Die Familie der *Toll-like-Rezeptoren*

Die Familie der TLRs besitzt mehr als zehn Mitglieder, die auf eine Vielfalt molekularer Strukturen aus Mikroorganismen, wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren, reagieren [12]. TLR3, TLR7 bzw. TLR8 und TLR9 sind in der Membran von Endosomen lokalisiert und werden nach Kontakt mit aufgenommenen Nukleinsäuren aktiviert. Zelleigene RNA oder DNA kommt in diesem Zellkompartiment normalerweise nicht vor. Die Lokalisation im Endosom zusammen mit CpG-Motiven in mikrobieller DNA stellen das Erkennungsmotiv für TLR9 dar, TLR3 reagiert mit Doppelstrang-RNA und TLR7 bzw. TLR8 mit Einzelstrang-RNA. Interessanterweise sind die Nukleinsäuren-erkennenden TLRs nicht ubiquitär in allen Zellen des Körpers exprimiert, sondern in ihrer Expression auf wenige Zelltypen, insbesondere des Immunsystems, beschränkt.

1.2.2.2 Die Familie der *RIG-I-like-Rezeptoren*

Yoneyama et al. und Andrejeva et al. identifizierten im Jahr 2004 RIG-I bzw. MDA-5 als zytoplasmatische Rezeptoren für virale RNA [15, 16]. Im Gegensatz zur Familie der TLRs sind diese Rezeptoren ubiquitär exprimiert und initiieren eine antivirale Antwort auch in Zellen, die nicht dem Immunsystem zugeordnet werden. Sowohl RIG-I, als auch MDA-5 enthalten zwei N-terminale *caspase activating and recruitment domains* (CARDs), eine zentrale DExD/H Box ATPase/Helikase-Domäne und eine C-terminale Domäne.

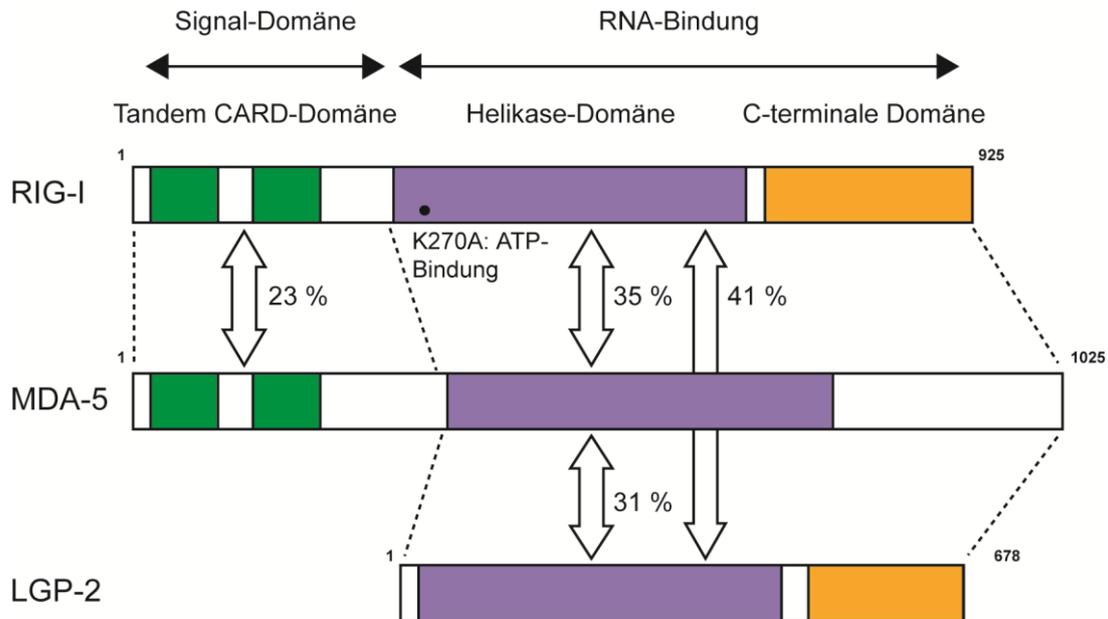


Abb. 1.1 Schematische Darstellung der Domänen der *RIG-I-like*-Rezeptoren. Die Sequenz der Aminosäuren von CARD- und Helikase-Domäne ist zwischen den drei Rezeptoren konserviert (Angabe der Analogie in Prozent). Nach Substitution der Aminosäure Lysin zu Alanin an Position 270 (K270A) kann die Helikase-Domäne von RIG-I kein ATP mehr binden und hydrolysieren. Modifiziert nach Yoneyama und Fujita, [17].

Die Überexpression der isolierten CARD-Domäne von RIG-I führt unabhängig von viraler RNA konstitutiv zu einer Interferonantwort [16]. Gleichzeitig wirkt ein Proteinkonstrukt ohne CARD-Domäne als ein dominant negativer Inhibitor. Es wurde daraus geschlossen, dass die N-terminale CARD-Domäne für die weitere Signaltransduktion verantwortlich ist, während der C-terminale Teil des Rezeptors die Bindung der viralen RNA vermittelt. Diese Beobachtung konnte inzwischen, unter anderem durch Röntgenstrukturanalyse, untermauert werden [18, 19]. Zur Aktivierung des Interferonsignals muss der Rezeptor RIG-I ATP hydrolysieren.

LGP-2 ist der dritte Rezeptor aus der RLR-Familie. Er besitzt eine strukturhomologe DExD/H Box Helikase-Domäne und eine C-terminale Domäne, aber keine N-terminale CARD-Domäne [16, 20]. Aus *in-vitro*-Experimenten mit LGP-2 weiß man, dass dieses Protein als negativer Regulator der RIG-I- bzw. MDA-5-Aktivierung agiert [21, 22, 23]. Im Gegensatz dazu stehen Versuche mit LGP-2-*knock-out*-Mäusen, bei denen ein positiver Effekt für LGP-2 bei der Abwehr von *encephalomyocarditis virus* gezeigt wurde [24].

1.2.2.3 Die Rezeptoren für die DNA-Erkennung

Entsprechend der Existenz von DNA-Viren, neben der Gruppe der RNA-Viren, wurde das Vorhandensein zytoplasmatischer Rezeptoren für virale DNA erwartet. Im Jahr 2006 konnte

nachgewiesen werden, dass es unabhängig von der Existenz von TLR oder RLR, in Gegenwart von mikrobieller DNA im Zytosol einer Zelle zur Bildung von Typ-I-Interferonen kommt [25, 26]. Allerdings ist das Verständnis zu dieser Gruppe von Rezeptoren bisher begrenzt. Es ist Gegenstand aktueller Forschung, ob dieser Erkennung ein definierter Rezeptor zugrunde liegt, wie z. B. DAI [27], oder die virale DNA nach Transkription durch die RNA-Polymerase III über den RIG-I-Signalweg erkannt wird [28, 29]. Ein dritter Weg der Erkennung von Fremd-DNA führt über die Bildung des *AIM2- (absent in melanoma 2) inflammasomes* zur Aktivierung der Caspase-1 und schließlich zur Bildung von Zytokinen der Interleukin-1 β -Familie [30].

1.2.3 Die Liganden der *RIG-I-like*-Rezeptoren

Versuche mit Fibroblasten aus Mäuseembryonen mit einer Gendeletion für RIG-I oder MDA-5 haben gezeigt, dass trotz der strukturellen Ähnlichkeit beider Moleküle ihre Funktion nicht redundant ist [31]. Während RIG-I unter anderem für die Erkennung von Sendavirus, *newcastle disease virus* (Paramyxoviren), Influenza-A-Virus (Orthomyxoviren), Hepatitis-C-Virus (Flaviviren) und *vesicular stomatitis virus* (Rhabdoviren) verantwortlich ist, scheint MDA-5 die Immunantwort auf Picornaviridae wie *encephalomyocarditis virus*, Poliovirus oder Hepatitis-A-Virus, zu initiieren. Das selektive Erkennen von Viren durch RIG-I bzw. MDA-5 spiegelt sich auch im unterschiedlichen Ansprechen auf künstliche RNA-Produkte wieder. So wurde beobachtet, dass die Transfektion von *in vitro* transkribierter RNA (IVT-RNA) selektiv RIG-I aktiviert [32]. Die Transfektion des synthetischen Doppelstrang-RNA-Analogon Poly I:C aktiviert hauptsächlich MDA-5 [33].

Im Jahr 2006 erklärten zwei Forschungsgruppen diese Beobachtungen auf molekularer Ebene: Die Erkennung von fremder, viraler RNA im Zytosol durch den Rezeptor RIG-I hängt von der Anwesenheit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende der viralen RNA ab [34, 35]. Diese Phosphatgruppe wird durch virale RNA-Polymerasen erzeugt und ist in den meisten viralen RNA-Genomen und in IVT-RNA präsent. Die Transkription von zellulärer RNA findet hingegen im Nukleus statt. Wie bei viralen RNA-Transkripten entsteht zwar auch hier primär ein 5'-Triphosphat, das jedoch vor Verlassen des Kerns und Transport in das zytoplasmatische Kompartiment der RLRs auf verschiedene Arten prozessiert wird: *messenger* RNA erhält eine Kappe aus 7-Methyl-Guanosin am 5'-Ende, *transfer* RNA verliert ihr 5'-Ende und zusätzlich werden Nukleotide modifiziert und ribosomale RNA versteckt ihr Triphosphat im Proteinanteil von Ribonukleopartikeln [17]. In Analogie zu dieser Beobachtung zeigt sich folgende Situation bei Viren: RIG-I-abhängige Viren offenbaren während ihres Lebenszyklus das 5'-Triphosphat an ihrem RNA-Genom, wohingegen das 5'-Ende von Picornaviridae durch ein kovalent gebundenes virales Protein VPg versteckt wird [36].

Neben dem 5'-Triphosphat wurden weitere molekulare Motive für RIG-I-Liganden beschrieben: Im Jahr 2007 veröffentlichte Malathi et al. Daten, die eine RIG-I-Aktivierung durch 3'-Monophosphat-RNA zeigten, welche aus zellulärer Wirt-RNA entstand, die durch Virus-induzierte RNase L verdaut wurde [37]. Andere Autoren sahen relativ kurze Doppelstrang-RNA mit mindestens einem 3'- oder 5'-Monophosphat als ausreichendes Motiv für eine RIG-I-vermittelte Interferoninduktion an [19]. Die potentielle Aktivierung von RIG-I, auch durch Liganden ohne ein 5'-Triphosphat, wird gestützt durch eine Studie, die beschreibt, dass RIG-I Doppelstrang-RNA ohne 5'-Triphosphat detektiert, solange sie nur eine bestimmte Länge besitzt [38]. Für Hepatitis-C-Viren wurde bekannt, dass Poly-Uridin-Abschnitte in der nicht-translatierten 3'-Region des HCV-Genoms für die antivirale RIG-I-Antwort verantwortlich sind [39]. Daraus wurde abgeleitet, dass für die Erkennung durch RIG-I eine bestimmte Basenkomposition des Liganden erforderlich ist, um eine Aktivierung des Rezeptors auslösen zu können.

Über den physiologischen Liganden von MDA-5 ist bisher wenig bekannt. Da Picornaviridae bei der Replikation in infizierten Zellen lange Doppelstrang-RNA als Intermediärprodukte bilden, postuliert man „lange Doppelstrang-RNA“ als Ligand von MDA-5 [40]. Diese Aussage wurde aus der Beobachtung abgeleitet, dass Poly I:C mit einer Länge von mehr als 1000 Basen, selektiv über MDA-5 eine Immunantwort einleitet, während kürzere Formen von Poly I:C eine Abhängigkeit von RIG-I zeigen [38]. Der physiologische Ligand von LGP-2 ist bisher nicht erforscht. Aus *in-vitro*-Daten ist jedoch bekannt, dass LGP-2 kurze Doppelstrang-RNA mit hoher Affinität bindet. Diese Bindung ist unabhängig von der 5'-Triphosphatgruppe, wird über die C-terminale Domäne der Helikase vermittelt und induziert die Dimerisierung von LGP-2 [41, 42].

1.2.4 Signaltransduktion durch RNA-Helikasen

Nach Bindung ihrer Liganden an RIG-I und MDA-5 kommt es zur Aktivierung einer gemeinsamen Signalkaskade, welche die Transkription von IFN- α bzw. IFN- β und inflammatorischen Zytokinen bewirkt [9]. Für den Schritt der Aktivierung ist die Interaktion mit der exponierten Tandem CARD-Domäne von RIG-I und MDA-5 essentiell. Die CARD-Domäne von RIG-I und MDA-5 interagiert über eine CARD-CARD-Interaktion mit dem nachfolgenden Molekülpartner MAVS/IPS-1/Cardif/VISA [43, 44, 45, 46], der in der äußeren Membran des Mitochondriums verankert ist. Diese Lokalisation ist für die Auslösung einer Interferonantwort entscheidend und legt die Vermutung nahe, dass das Mitochondrium eine zentrale Rolle im antiviralen Signalweg spielt.

MAVS funktioniert als ein Adaptorprotein, das die Rezeptoren RIG-I und MDA-5 mit einem Kinasekomplex aus TBK1 und IKK- ϵ (*TANK-binding kinase 1* und *I κ B kinase- ϵ*) und

IKK- $\alpha/\beta/\gamma$ (*I κ B kinase- $\alpha/\beta/\gamma$*) verbindet. TBK1 oder das induzierbare IKK- ϵ phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7 (*interferon-regulatory factor 3 und 7*). Beide Moleküle stellen ein zentrales Element bei der Expression von Typ-I-Interferon und der Interferon-induzierten Genexpression dar [7, 47]. Nach Phosphorylierung dimerisieren das zytosolische IRF3 und IRF7 zu Homo- und Heterodimeren, translozieren in den Nukleus und aktivieren dort die Expression von IFN- β , einigen IFN- α -Subtypen und Chemokinen (z. B. Cxcl 10). Auf einer zweiten Schiene agiert der IKK- $\alpha/\beta/\gamma$ -Komplex, welcher den *inhibitor of NF κ -B* (I κ B) phosphoryliert und damit degradiert. Daraufhin transloziert NF κ -B in den Nukleus und induziert gemeinsam mit IRFs und anderen Transkriptionsfaktoren die Transkription von inflammatorischen Zytokinen und IFN- α bzw. IFN- β .

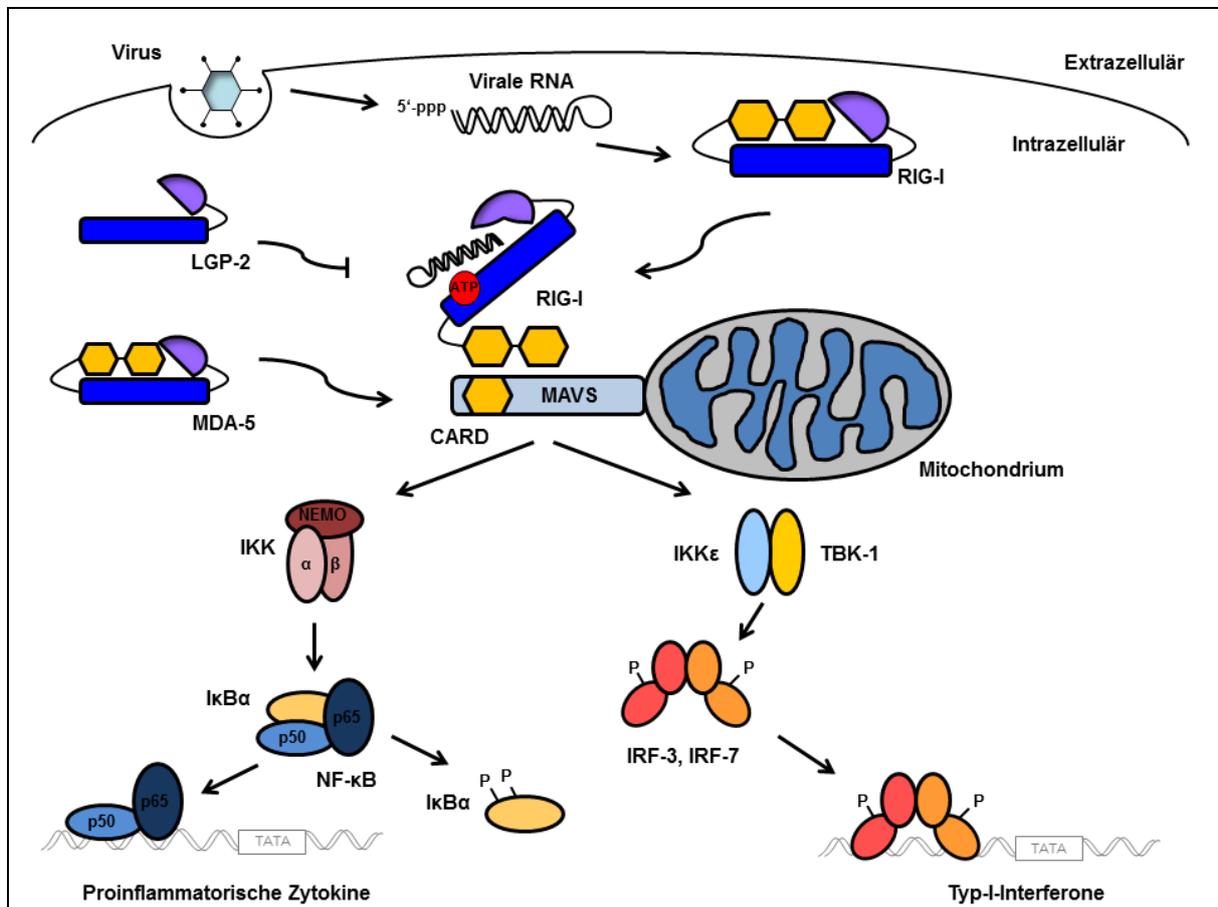


Abb. 1.2 Die Signaltransduktion der RLR-Helikasen: RIG-I, MDA-5 und LGP-2. Modifiziert nach Hiscott et al., 2006 und Yoneyama et al., 2010 [48, 49].

Nach Sekretion von IFN- α bzw. IFN- β und Bindung an den gemeinsamen Rezeptor (IFNAR), kommt es über auto- und parakrine Wege zur Aktivierung einer positiven Feedbackschleife. IFNAR aktiviert über die Moleküle JAK und STAT die Transkription hunderter *interferon-stimulated genes* (ISGs), welche für antivirale Proteine kodieren. Darunter befinden sich auch die drei Familienmitglieder der RLR, die auf diese Weise eine positive

Feedbackschleife unterhalten. Ein weiteres ist IRF7, welches physiologisch nur in geringen Mengen im Zytosol vorliegt. Induziertes IRF7 bewirkt nach TBK1- und IKK- ϵ -abhängiger Phosphorylierung die Transkription einer großen Vielfalt von IFN- α -Subtypen [50]. Weitere Beispiele durch Infektionen induzierter antiviraler Effektormoleküle sind die Proteinkinase R (PKR) und 2', 5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS).

1.2.5 Die Bedeutung des Interferonsystems

Das Interferonsystem schützt den Wirt vor viralen Infektionen. Die Bedeutung dieses Schutzsystems lässt sich daran ablesen, dass Organismen mit einem defekten Interferonsignalweg früh an Virusinfektionen versterben [4, 5, 6]. Dupuis et al. beschreiben zwei Kinder, die an einer homozygoten Mutation im Gen für STAT1 leiden und im Alter von 12 bzw. 16 Monaten einer Virusinfektion erliegen. Betrachtet man *Knock-out*-Mäuse mit einem Defekt in den Rezeptoren für virale RNA (RIG-I bzw. MDA-5), so führen auch hier Virusinfekte zu einer höheren Letalität als in Wild-Typ-Tieren, welche nach Erkennung des viralen Befalls eine antivirale Interferonantwort einleiten können [31].

Für den Virus stellt das Interferonsystem eine Bedrohung seiner Replikationsfähigkeit dar. Daher haben Viren im Laufe der Evolution Wege entwickelt, dieses System zu blockieren. Zusammenfassend kann ein Virus die Interferonsekretion in drei Abschnitten unterbrechen [51, 52, 53]: Erstens können Viren sich der Erkennung durch die Wirtszelle entziehen oder direkt die Initiierung des Interferonsignals verhindern. Mibayashi et al. zeigten, dass das *Nonstructural Protein 1* (NS1) von Influenza-A-Viren mit dem RIG-I-MAVS-Komplex interagiert und auf diese Weise die Ausschüttung von Interferon verhindert [54]. Einige Negativstrang-RNA-Viren sind in der Lage ihr 5'-Triphosphatende zu entfernen und somit der Erkennung zu entgehen [55]. Analog dazu bindet das V-Protein von vielen Paramyxoviren MDA-5 und inhibiert auf diese Weise seine Funktion [15, 56]. Polioviren induzieren die Spaltung von MDA-5 über Caspasen [57]. Eines weiteren Mechanismus bedient sich das Hepatitis-C-Virus. Es kodiert für die Protease NS3/4A, welche das Adapterprotein MAVS vom Mitochondrium schneidet. Mit dem Verlust der für den Signalweg entscheidenden Lokalisation kommt es zur Zerstörung der Signaltransduktion [13]. Zweitens besitzen Viren Strategien, um mit dem Interferonrezeptor und seinem Signalweg zu interferieren. So verhindern Rabiesvirus über das P-Protein und Hantavirus NY-1 über sein G1-Glykoprotein die Phosphorylierung von IRF3 durch TBK1 [58, 59]. Schließlich können einige Herpesviren, wie z. B. das Humane Herpesvirus Typ 8 (HHV8), homologe Proteine zu IRF3 exprimieren, welche als Inhibitoren des Interferonsignals wirken [60]. Joo et al. konnten zeigen, dass HHV8 ein virales IRF3-Homolog produziert, das zelluläres IRF7 bindet und damit seine Wirkung blockiert [61]. Drittens wehren sich Viren gegen die Interferon-induzierten Effektormoleküle. Vacciniaviren oder Influenza-A-Viren kodieren für die Proteine E3L bzw.

NS1, welche Doppelstrang-RNA binden und auf diese Weise die Aktivierung der Doppelstrang-RNA-abhängigen Proteinkinase R (PKR) verhindern. Aktivierte PKR stoppt die weitere Proteinsynthese der Wirtszelle und beeinträchtigt so die virale Replikation [62, 63].

1.3 Fragestellung

Virale RNA ist ein potentes Aktivierungssignal für das angeborene Immunsystem, das in befallenen Zellen ein antivirales Klima schafft und durch die Ausschüttung antiviraler Botenstoffe eine schützende humorale und zelluläre Immunantwort erwirkt. Die Anwesenheit viraler RNA im Zytosol einer Zelle wird u. a. von dem Rezeptor RIG-I erkannt. Detailliertes Wissen über das PAMP von RIG-I hat zahlreiche medizinische Implikationen: RIG-I nimmt eine zentrale Rolle bei der Abwehr einiger wichtiger humanpathogener Viren, wie z. B. Influenza-A-Viren und den Hepatitis-C-Viren, ein [35, 64]. Die genaue Kenntnis der Virus-Wirt-Interaktion auf molekularer Ebene fördert das Verständnis über Abwehrmechanismen gegen Viren und hilft bei der Entwicklung antiviraler Therapien. Außerdem können basierend auf dem Wissen über das exakte PAMP von RIG-I synthetische Aktivatoren von RIG-I hergestellt werden. Eine RIG-I-Aktivierung und dadurch induzierte Interferonantwort könnte im Kampf gegen Virusinfektionen oder Tumoren therapeutisch genutzt werden [65].

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Natur des Liganden von RIG-I kontrovers diskutiert. Nachdem Kim et al. anfänglich sahen, dass Zellen nach Stimulation mit *in vitro* transkribierter RNA IFN- α bzw. IFN- β ausschütten, konnten zwei Arbeitsgruppen diese Beobachtung später auf eine durch den Rezeptor RIG-I-vermittelte Immunantwort zurückführen [32, 34, 35]. IVT-RNA besitzt wie virale RNA eine 5'-Triphosphatgruppe, welche daraufhin als zentrales Motiv des RIG-I-Liganden gedeutet wurde. Die Gruppen folgerten aus ihren Studien, dass Einzelstrang- und Doppelstrang-RNA RIG-I aktiviert, vorausgesetzt, sie trägt ein 5'-Triphosphat. Das Konzept, dass ein 5'-Triphosphat das komplette PAMP des RIG-I-Liganden darstellt, wurde durch andere Veröffentlichungen in Frage gestellt. Als weitere molekulare Motive wurden 3'-Monophosphat-RNAs, wie sie durch aktivierte RNase L entstehen, als RIG-I-Liganden beschrieben [37]. Außerdem soll Doppelstrang-RNA ohne 5'-Triphosphat über RIG-I immunstimulatorisch wirken, wenn sie entweder glatte Enden hat, ein 5'-Monophosphat trägt oder eine mittlere Länge zwischen 300 bis 2000 Basen besitzt [19, 38, 66]. Andere Autoren berichteten über die Notwendigkeit von Uridin- bzw. Adeninreichen Abschnitten in 5'-Triphosphat-RNA als Voraussetzung für die Aktivierung von RIG-I [39].

Vergleicht man die veröffentlichten RIG-I-Liganden untereinander, so ergibt sich ein ausgesprochen heterogenes Bild der molekularen Strukturen, die alle denselben Rezeptor aktivieren sollen. Das so gezeichnete Bild möglicher RIG-I-Liganden widerspricht der

Vorstellung einer umschriebenen PRR-PAMP-Interaktion. Die Schlüsselfrage welche Struktureigenschaften für virale RNA wirklich erforderlich sind, um zur Bindung und Aktivierung von RIG-I zu führen, war nicht abschließend geklärt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher das molekulare Erkennungsmuster bzw. PAMP von RIG-I zu charakterisieren. Dabei wurde die zentrale Frage beantwortet, welche minimalen Strukturmerkmale RIG-I-Liganden für eine Aktivierung ihres Rezeptors benötigen. Im Detail ergaben sich daraus folgende Unterfragen:

- Ist die 5'-Triphosphatgruppe von RIG-I-Liganden ausreichend, unbedingt notwendig oder sogar entbehrlich?
- Genügt die molekulare Struktur einer Doppelstrang-RNA oder ist der RIG-I-Ligand ein Einzelstrang mit einer Modifikation am 5'-Ende?
- Gibt es eine Sequenzabhängigkeit oder ist eine bestimmte Länge für Liganden von RIG-I erforderlich?
- Welche Rolle spielt die ATPase-Funktion von RIG-I bei der Aktivierung?
- Welche Domänen des Rezeptors RIG-I binden den Liganden?

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien, Verbrauchsmittel und Geräte

2.1.1 Geräte

<i>Alpha Imager HP</i>	Fa. Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Begasungsbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Eismaschine	Fa. Ziegra (Isernhagen, D)
Entwickler Curix 60	Fa. AGFA (Köln, D)
FluoroMax-P Fluorimeter	Fa. Horiba Jobin Yvon (Unterhaching, D)
<i>Lamin Air Flow</i> (HB 2448)	Fa. Heraeus (Hanau, D)
MidiMACS	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)
Mikroskop	Fa. Zeiss (Jena, D)
<i>Multiplate Reader Mithras LB 940</i>	Fa. Berthold Technologies (Bad Wildbach, D)
NanoPhotometer	Fa. Implen (München, D)
pH-Meter SB70P symphony	Fa. VWR (Darmstadt, D)
<i>Power Pac 200</i> Spannungsgerät	Fa. Biorad (München, D)
<i>Thermocycler T3</i>	Fa. Biometra (Göttingen, D)
<i>Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Fa. Biorad (München, D)
Vortexer	Fa. Janke & Kunkel (Staufen, D)
Waage LP 6209	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
Waage SBC 21	Fa. Scaltec Instruments (Heiligenstadt, D)
Zentrifuge 5415 R	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Sepatech Omnifuge	Fa. Heraeus (Hanau, D)

2.1.2 Reagenziensätze

<i>ADP Quest Kinase Assay</i>	Fa. DiscoverX (Hannover, D)
<i>Human Interferon-α ELISA</i>	Fa. Bender MedSystems (Wien, AU)
<i>JETQUICK Plasmid Spin Kit</i>	Fa. Genomed (Löhne, D)
<i>Luciferase-Assay Kit</i>	Fa. BioThema (Handen, S)
<i>MegaShortscript T7 Kit</i>	Fa. Ambion (Darmstadt, D)
<i>Monocyte Isolation Kit II</i>	Fa. Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, D)

2.1.3 Chemikalien für den Umgang mit Proteinen

Western Blot und Präzipitation

Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Blotting-Papier</i>	Fa. Schleicher & Schuell (Dassel, D)
Bromphenolblau	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<i>Enhanced chemiluminescence detection system</i> (ECL)	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Glycin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
β -Mercaptoethanol	Fa. Biorad (München, D)

Milchpulver	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumdodecylsulfat	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Nitrocellulosemembran	Fa. Amersham (Little Chalfont, GB)
<i>Prestained protein molecular weight marker</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Fa. Amersham (Braunschweig, D)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Streptavidin-Agarose- <i>beads</i>	Fa. Pierce (Bonn, D)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Tris-Hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
TRIS-Hydrochlorid	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Zelllyse

Glycerin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumorthovanadat	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Nonidet P-40	Fa. Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Fa. Fluka Biochemika (Buchs, CH)
<i>Protease inhibitor cocktail tablets</i>	Fa. Roche (Mannheim, D)

ELISA

Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<i>Bovine serum albumin (BSA)</i>	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Antikörper

Anti-Flag-Antikörper	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Anti-Biotin-Antikörper, HRP-konjugiert	Fa. Cell Signaling (Denvers, MA, USA)
Anti-Mouse-Antikörper, HRP-konjugiert	Fa. Promega (Mannheim, D)

Luciferase-Assay

Coelenterazine	Fa. Promega (Mannheim, D)
<i>Passive lysis buffer</i>	Fa. Promega (Mannheim, D)

2.1.4 Chemikalien für den Umgang mit Nukleinsäuren

Transfektion

<i>Fugene</i>	Fa. Roche (Mannheim, D)
<i>Genejuice</i>	Fa. Merck Chemicals (Darmstadt, D)
<i>Lipofectamine 2000</i>	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
<i>Lipofectamine RNAiMax</i>	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Poly I:C	Fa. Amersham/GE Healthcare (Braunschweig, D)
Polyethylenimin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

In-vitro-Transkription

Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Ethanol absolut	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<i>Mini Quick Spin Oligo Columns</i>	Fa. Roche (Mannheim, D)

<i>MinElute Gel Extraction Kit</i>	Fa. Quiagen (Hilden, D)
Phenol-Chloroform	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
UTP-Biotin	Fa. TriLink (San Diego, CA, USA)
<u>Visualisierung</u>	
Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Formamid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>GeneRuler DNA Ladder Mix</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Harnstoff	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Rotiphorese Gel 40	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
SiRNA-Marker	Fa. New England Biolabs (Frankfurt a. M., D)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<u>Enzyme und Sonstiges</u>	
<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i> , CIAP	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Desoxyribonukleotide	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
ExoKlenow	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Pfu-Polymerase	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
RNase-Inhibitor	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)

2.1.5 Materialien für die Zellkultur

Aqua ad injectabilia	Fa. Braun (Melsungen, D)
Biocoll-Separationsmedium	Fa. Biochrom (Berlin, D)
Calciumchlorid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Fetales Kälberserum	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
Heparin-Natrium	Fa. Braun (Melsungen, D)
Insulin, Lösung vom Rinderpankreas	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Leibovitz L-15 Medium	Fa. PAA (Linz, A)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
MCDB 153	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Optimem	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ortho-mune Lyse-Reagenz	Fa. OrthoClinical Diagnostics (Neckarsgmünd, D)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline</i> (PBS)	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (RPMI)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen Greiner (Frickhausen, D), Falcon (Heidelberg, D), Becton Dickinson (Le Pont de Claix, F), Bibby Sterilin (Stone, Staffordshire, GB) und Corning (Corning, USA) bezogen.

2.1.6 Zellkulturmedien, Puffer und Lösungen

Folgende Medien und Puffer wurden für die Zellkultur verwendet:

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>RPMI-Vollmedium</u>	<u>1205LU-Medium</u>
100 IU/ ml Penicillin	100 IU/ ml Penicillin	80 Vol % MCDB153
100 µg/ ml Streptomycin	100 µg/ ml Streptomycin	20 Vol % Leibovitz L-15
1,5 mM L-Glutamin	1,5 mM L-Glutamin	2 Vol % FCS
10 Vol % FCS	10 Vol % FCS	5 µg/ml Insulin
in DMEM-Medium	in RPMI-1640-Medium	1,68 mM CaCl ₂
<u>MACS-Puffer</u>	<u>Erythrozyten-Lysepuffer</u>	
2 mM EDTA	Ortho-mune Lyseagenz	
0,5 Vol % BSA	in PBS	
in PBS		

Lösungen für molekularbiologische Methoden:

<u>Laufpuffer</u>	<u>Transferpuffer</u>	<u>TBE-Puffer</u>
192 mM Glycin	192 mM Glycin	89 mM Tris
25 mM Tris-Base	25 mM Tris-Base	89 mM Borsäure
0,1 Vol % SDS	10 Vol % Methanol	2 mM EDTA
in Aqua dest.	in Aqua dest.	pH 8,3 in Aqua dest.
<u>PBS-Tween</u>	<u>Blocking Lösung</u>	<u>Hybridisierungspuffer</u>
0,1 Vol % Tween 20	5 Vol % Milchpulver	10 mM Tris-Base
in PBS	in PBS-Tween	1 mM EDTA
		pH 7,4 in Aqua dest.
<u>Lysepuffer</u>	<u>Lämmli-Puffer (5-fach)</u>	
10 Vol % Glycerol	250 mM Tris-HCL (pH 6,8)	
20 mM Tris-HCl (ph 7)	40 Vol % Glycerol	
137 mM Nacl	5 % (w/v) SDS	
2 mM EDTA	10 Vol % Mercaptoethanol	
1 Vol % NP-40	0,05 % (w/v) Bromphenolblau	
1 mM PMSF	in Aqua dest.	
1 x <i>Protease inhibitor tablet</i>		
1 mM Natriumorthovanadat		
in Aqua dest.		

2.1.7 Sequenzen von RNA-Oligonukleotiden und *Small-interfering-RNA*

Tabelle 2.1 RNA-Oligonukleotide zur Zellstimulation

Typ	Modifikation	Name	Sequenz	
syn	5'-OH	2.2s	GCAUGCGACCUCUGUUUGA	
		2.2as	UCAAACAGAGGUCGCAUGC	
		2.2 5mer	UCAAAA	
		2.2 10mer	UCAAACAGAG	
		2.2 15mer	UCAAACAGAGGUCGC	
		2.2as OH +A	UCAAACAGAGGUCGCAUGCA	
		2.2as OH +AGG	UCAAACAGAGGUCGCAUGCAGG	
		5'-p	2.2s	GCAUGCGACCUCUGUUUGA
	2.2as	UCAAACAGAGGUCGCAUGC		
	5'-ppp	2.2s	GCAUGCGACCUCUGUUUGA	
	IVT	5'-ppp	2.2s	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA
			2.2as	GUCAACAGAGGUCGCAUGC
			8 ACU	GACACUUU
12 ACU			GACACACACUUU	
16 ACU			GACACACACACACUUU	
20 ACU			GACACACACACACACUUU	
24 ACU			GACACACACACACACACUUU	
28 ACU			GACACACACACACACACACUUU	
GC			GCGGGGCGCGGGCGGCC	
GA			GGGGGGGGGGGAAAAAAAAAAAA	
2.1s			AUGCCUUUGUGGAACUAUA	
2.1as			UAUAGUCCACAAAGGCAU	
1 A			GCGUGACAGCGCUGUUU	
2 A			GCGUGACCGCGCUGUUU	
3 A			GCGUGACGGCGCUGUUU	
1 B1.1			GCGUGACCGGCCUGUUU	
2 B1.1			GCGUGACUGGCCUGUUU	
3 B1.1			GCGUGACUGGUCUGUUU	
1 B1.2			GCGUGACGGAACUGUUU	
2 B1.2			GCGUGACUGAACUGUUU	
5 B1.2	GCGUGACCGAACUGUUU			

Chemisch synthetisierte RNA (5'-OH oder 5'-Monophosphat) wurden bei Metabion (Martinsried, D) bestellt. Eurogentec (Leiden, Belgien) stellte chemisch synthetisierte 5'-Triphosphat-RNA her.

Tabelle 2.2 *Small-interfering-RNA*

Zielprotein	Sequenz
RIG-I	ATCACGGATTAGCGACAAA
MAVS	CCACCTTGATGCCTGTGAA

Dargestellt ist die 19 Basen-messende Sequenz im *Sense*-Strang der Ziel-mRNA. Am 3'-Überhang befand sich der dTdT-Rest. *Small-interfering-RNA* wurden bei Metabion (Martinsried, D) erworben.

2.1.8 DNA-Primer, *-templates* und *-Oligonukleotide*

Tabelle 2.3 DNA-Primer, *-templates* und *-Oligonukleotide*

Name	Sequenz
Primer Ambion T7 Promotor	TAATACGACTCACTATA
Primer 200 GFP <i>forward</i>	TAATACGACTCACTATAGGATGGTGAGCAAGGG
Primer 200 GFP <i>backward</i>	GCCGAAGGTGGTCAC
Template 2.2s	TCAAACAGAGGTCGCATGCCTATAGTGAGTCGTA
Template 2.2as	GCATGCGACCTCTGTTTGACTATAGTGAGTCGTA
Template 8 ACU	AAAGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template 12 ACU	AAAGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template 16 ACU	AAAGTGTGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template 20 ACU	AAAGTGTGTGTGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template 24 ACU	AAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template 28 ACU	AAAGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTCTATAGTGAGTCGTA
Template GC	GGCGCCCCGCCGCGCCCCGCTATAGTGAGTCG
Template GA	TTTTTTTTTTTTCCCCCCCCCTATAGTGAGTCG
Template 2.1s	TATAGTTCCACAAAGGCATCTATAGTGAGTCG
Template 2.1as	ATGCCTTTGTGGAACTATACTATAGTGAGTCG
Template 1 A	AAACAGCGCTGTCACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 2 A	AAACAGCGCGGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 3 A	AAACAGCGCCGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 1 B1.1	AAACAGGCCGGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 2 B1.1	AAACAGGCCAGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 3 B1.1	AAACAGACCAGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 1 B1.2	AAACAGTTCGTCACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 2 B1.2	AAACAGTTCAGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
Template 5 B1.2	AAACAGTTCGGTACGCTATAGTGAGTCGTATTA
2.2as (DNA)	TCAAACAGAGGTCGCATGC

DNA-Primer, *-templates* und *-Oligonukleotide* wurden bei Metabion (Martinsried, D) gekauft.

2.1.9 Plasmide

Tabelle 2.4 Plasmid-DNA kodierte Proteine

Name	Aminosäuren	Vektor	Referenz
RIG-I-Flag	1 - 925	pEF-BOS	Yoneyama, 2004 [16]
RIG-I K270A-Flag	1 - 925	pEF-BOS	Yoneyama, 2004 [16]
RIG-IC-Flag	218 - 925	pEF-BOS	Yoneyama, 2004 [16]
RIG-I Δ C-Flag	1 - 604	pEF-BOS	Yoneyama, 2004 [16]

Die Plasmide wurden von Herrn Fujita zur Verfügung gestellt. Alle Proteine trugen einen N-terminalen Flag-Rest.

Tabelle 2.5 Rekombinante Proteine

Name	Aminosäuren	Referenz
RIG-I	1 - 925	RIG-I WT aus Cui et al., 2008 [18]
RIG-IC	230 - 925	Δ CARD-RIG-I aus Cui et al., 2008 [18]
RIG-I C-terminale Domäne (CTD)	802 - 925	RD (RIG-I) aus Cui et al., 2008 [18]
MDA-5 C-terminale Domäne (CTD)	897 - 1025	RD (MDA-5) aus Cui et al., 2008 [18]

Rekombinante Proteine wurden von Herrn Cui aus dem Labor Prof. Hopfner (Genzentrum, LMU München) zur Verfügung gestellt. Vollängen-RIG-I und RIG-IC wurden in Insektenzellen (High-five insect cells, Invitrogen) exprimiert, die beiden CTD-Konstrukte von RIG-I und MDA-5 in E.coli BL21 Rosetta Zellen (Novagen).

2.1.10 Zelllinien

Tabelle 2.6 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Herkunft
Hek293	Humane embryonale Nierenzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC)
1205LU	Humane Melanomzellen isoliert aus einer Lungenmetastase	M. Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, PA, USA)

2.2 Zellulär-immunologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Allgemeine Kulturbedingungen

Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂-Luft-Gemisch in Kultur gehalten. Sämtliche Experimente und Handhabungen der Zellen erfolgten ausschließlich unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Air Flow.

Kultivierung von Tumorzelllinien

Tumorzelllinien wurden in Kulturflaschen von 25 bis 75 ml Größe gehalten. HEK293-Zellen wurden in DMEM-Vollmedium und humane Melanomzellen in 1205LU-Medium kultiviert. Dem Wachstum der Tumorzellen angepasst wurde das Medium alle zwei bis drei Tage erneuert und überschüssige Zellen verworfen. Das Lichtmikroskop diente der Begutachtung der Zellen, um Infektionen und Zelltod erkennen zu können. Eine Infektion mit Mykoplasmen wurde mehrfach überprüft und ausgeschlossen. Für Versuche wurden die Zellen entsprechend der benötigten Zellzahl in 6- bis 96-well-Flachboden-Platten kultiviert.

Kultivierung von humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Primäre humane mononukleäre Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMCs) und isolierte humane Monozyten aus peripherem Blut wurden in 96-well-Flachboden-Platten in RPMI-Vollmedium kultiviert.

Bestimmung der Lebendzellzahl

Tumorzellen und primäre humane Zellen wurden zur Bestimmung der Lebendzellzahl mit Trypanblau angefärbt und lichtmikroskopisch begutachtet. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und erscheinen blau. Die Zellzahl wurde in geeigneter Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt.

2.2.2 Aufreinigung von Zellpopulationen

Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die Isolation von humanen mononukleären Zellen (PBMCs) aus peripherem Blut gelang mit der Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Hypaque-Lösung. Ficoll-Separationsmedium hat eine spezifische Dichte von 1,077 g/ml und trennt die flüssigen und festen Bestandteile des Blutes in verschiedene Phasen auf. Die gewünschten mononukleären Zellen (Monozyten und Lymphozyten) reichern sich nach Zentrifugation im *buffy coat*, einer Phasenschicht zwischen Serum oben und Ficoll-Lösung unten, an. Mit ihrer höheren Dichte sedimentieren

Erythrozyten und Granulozyten unter die Ficoll-Lösung. Thrombozyten bleiben zum großen Teil im Blutserum in Lösung. Nach Dichtegradientenzentrifugation ergibt sich folgendes Bild: Serum, Ring mit mononukleären Zellen (*buffy coat*), Ficoll-Lösung, Erythrozyten.

Zur Gewinnung von PBMCs wurden gesunden Spendern 200 ml Blut abgenommen und mit 100 µl Heparin (5000 IE/ml) pro 10 ml Blut versetzt. Das Blut wurde im Verhältnis 1:2 mit PBS-Puffer verdünnt und auf 50 ml Leucosep-Röhrchen verteilt. In diese wurden zuvor 15 ml Ficoll-Lösung unter einer Separationsmembran eingebracht. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 1000 G, ohne Bremse, bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der *buffy coat* wurde vorsichtig abpipetiert, in ein neues 50 ml Gefäß übertragen und mit PBS-Puffer gewaschen (300 G, 10 Minuten, Raumtemperatur). Um verbliebene Erythrozyten zu entfernen, wurde das Zellpellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bevor das Zellpellet in dem gewünschten Kulturmedium aufgenommen wurde, wurde es ein weiteres Mal gewaschen.

Aufreinigung von humanen Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung

Monozyten und Lymphozyten sind die Hauptvertreter der PBMCs. Die Isolation von humanen Monozyten aus dem Gemisch mononukleärer Zellen des peripheren Blutes gelingt mit Hilfe der magnetischen Zellsortierung (*magnetic-activated cell sorting*). Damit können aus der Zellpopulation der mononukleären Zellen alle Nicht-Monozyten (T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, basophile Zellen etc.) markiert und entfernt werden. In einem ersten Schritt werden diese unerwünschten Zellen mit einem Gemisch aus Biotin-konjugierten-Antikörpern markiert. Diese erkennen eine Reihe von Oberflächenmolekülen, die nicht auf Monozyten vorhanden sind, wie z. B. CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123 und Glykoprotein A. In einem zweiten Schritt werden Antikörper gegen Biotin verwendet, die an paramagnetische Mikropartikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Anschließend wird die markierte Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die eine paramagnetische Matrix enthält. Die Säule wird in ein Magnetfeld eingebracht und somit alle mit Mikropartikeln beladenen Zellen in der Matrix zurückgehalten. Alle unmarkierten Zellen werden durch mehrmaliges Spülen mit Puffer aus der Säule entfernt, so dass nur die unerwünschte Zellpopulation in der Säule zurückbleibt. Man bezeichnet dieses Verfahren als „negative Selektion“ oder „Depletion“. Der Durchfluss der Säule enthält die gereinigte Monozytenpopulation. Bei der Aufreinigung von humanen Monozyten wurde nach dem Protokoll von Miltenyi Biotech (*Monocyte Isolation Kit II*) vorgegangen.

2.2.3 Transfektion und Stimulation von Zellen

Um Plasmid-DNA zur Proteinexpression oder RNA zur Zellstimulation in das Zytosol einzubringen, wurden Transfektionsreagenzien verwendet. Diese schließen Nukleinsäuren in liposomenartige Vesikel ein. Nach Kontakt mit der Zellmembran fusioniert der Phospholipidmantel eines Liposoms mit dieser und der Inhalt des Vesikels ergießt sich in das Zytoplasma.

2.2.3.1 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Tumorzellen

Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Zur Durchführung von Luciferase-Assays (siehe 2.3.4) wurden HEK293-Zellen (2×10^4 Zellen in 100 $\mu\text{l/well}$ in 96-*well*-Platten) mit je 40 ng Plasmid-DNA für Firefly-Luciferase und Renilla-Luciferase transfiziert. Entsprechend der Fragestellung wurde Plasmid-DNA für verschiedene RIG-I-Konstrukte ko-transfiziert und die Bedingungen auf 200 ng Gesamt-DNA mit Plasmid-DNA für *green fluorescent protein* (GFP) aufgefüllt. Zur Transfektion wurden 0,5 μl *Genejuice* nach dem Protokoll von Novagen verwendet. Der Transfektionserfolg wurde im Fluoreszenzmikroskop überprüft. Die Zellen wurden 24 Stunden später stimuliert.

Für die Präzipitationsversuche (siehe 2.3.2) wurden die jeweiligen Proteinkonstrukte in HEK293-Zellen ($3,5 \times 10^6$ Zellen in 10 cm Schalen) überexprimiert. Die Transfektion erfolgte bei einer Zellkonfluenz von 40 bis 60 % mit Polyethylenimin (PEI). Dazu wurden jeweils 23 μl PEI in 500 μl Optimem vorgemischt und anschließend 15 μg Plasmid-DNA hinzugefügt. Diese Mischung wurde für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das PEI-DNA Gemisch wurde danach direkt in das Zellmedium gegeben und die Zellen nach 24 Stunden lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 Minuten, 13000 G, 4°C) und die Überstände für *Pull-down*-Assays verwendet.

Transiente Transfektion von 1205LU-Zellen

Für Luciferase-Assays (siehe 2.3.4) mit Melanomzellen wurden 1205LU-Zellen (1×10^4 Zellen in 100 $\mu\text{l/well}$ in 96-*well*-Platten) mit 100 ng Plasmid-DNA und 0,3 μl *Fugene* nach dem Protokoll von Roche transfiziert. Da die Zellen RIG-I exprimierten, wurden ausschließlich die beiden Reporterstrukture (je 40 ng) und GFP-Plasmid (20 ng) pro Bedingung verwendet. Nach 24 Stunden folgte die Immunstimulation.

Für Versuche mit *Small-interfering-RNA* (siRNA) in 1205LU-Melanomzellen wurde das Protokoll wie folgt verändert: 1×10^5 Zellen wurden in einer 24-*well*-Platte in 200 μl Medium kultiviert. Je 200 ng der Reporterstrukture wurden zusammen mit 10 pmol der jeweiligen siRNA und 1,5 μl *Lipofectamin RNAiMax* in 150 μl Optimem transfiziert. 24 Stunden später wurde das Medium erneuert und die Zellen mit 200 ng RNA stimuliert. Zusätzlich zur

stimulatorischen RNA wurden erneut 10 pmol der jeweiligen siRNA mit *Lipofectamin RNAiMax* transfiziert.

2.2.3.2 Stimulation von primären Zellen oder Tumorzellen mit RNA

Stimulation von primären Zellen

Zur Stimulation von primären humanen Monozyten ($1,5 \times 10^5$ Zellen in 100 μl /well in 96-well-Platten) wurden 200 ng RNA mit *Lipofectamin 2000* komplexiert. Hierzu verdünnte man 200 ng RNA und 0,5 μl *Lipofectamin 2000* in jeweils 25 μl Serum-freiem Medium. Nach fünf Minuten Inkubation wurden diese zwei Vorverdünnungen zusammengegeben und nach weiteren 20 Minuten, in denen sich die liposomenartigen Komplexe bilden konnten, das komplette Volumen dem Zellmedium hinzugefügt. Nach 36 Stunden im Brutschrank wurde der Überstand abgenommen und IFN- α mit ELISA bestimmt.

Stimulation von Tumorzellen

Die Stimulation von HEK293-Zellen erfolgt wie bei primären humanen Zellen. Um den Zelltod von 1205LU-Melanomzellen nach RNA-Stimulation zu reduzieren, wurden diese Zellen mit nur 100 ng RNA aktiviert. Die Transfektion erfolgte mit *Lipofectamin RNAiMax* nach den Herstellerangaben von Novagen. Das Chemilumineszenzsignal des Luciferase-Assays wurde immer nach 12 Stunden Stimulationszeit gemessen.

2.2.4 ELISA zur Quantifizierung von Interferon- α

Der *Enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) ist ein immunologisches Nachweisverfahren für Proteine, wie z. B. Zytokine, das sich der sensitiven Bindungseigenschaft von Antikörpern bedient. Das gesuchte Protein wird über einen ersten Antikörper (*Coating*-Antikörper) an der Oberfläche des Versuchsgefäßes immobilisiert. Ein zweiter Antikörper (*Capture*-Antikörper) erkennt das gebundene Protein an einem anderen Epitop. Dieses Verfahren bezeichnet man als *Sandwich*-ELISA, da sich das gewünschte Protein umschlossen von zwei Antikörpern befindet. Der *Capture*-Antikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, welches chromogenes Substrat in Farbe umsetzt. Die Intensität dieses Farbumschlages ist verhältnismäßig zur Konzentration des gesuchten Zytokins im Probengefäß. Die Verwendung einer Standardreihe bekannter Konzentration ermöglicht die Quantifizierung.

In zellfreien Kulturüberständen wurde die Konzentration von IFN- α 36 Stunden nach Stimulation bestimmt. Der ELISA wurde nach den Empfehlungen des Herstellers *Bender Systems* verwendet.

2.2.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Allgemeine Funktionsprinzipien

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld. Als Trennmedium dient ein Gel aus Acrylamid und N'-N'-Methylenbisacrylamid, welches über eine radikalische Polymerisationsreaktion hergestellt wird. Der Volumenanteil von Acrylamid bestimmt die Porengröße des Gels.

Bevor die Proteinproben zur Trennung geladen werden, findet eine Probenvorbereitung statt. Deren Ziel ist es, erstens die Proteine zu denaturieren, d.h. ihre Sekundär- und Tertiärstruktur aufzubrechen und zweitens sie zu einem geladenen Molekül zu machen, um eine elektrische Auftrennung zu erreichen. Dazu werden die Proteinlysate mit Natriumdodecylsulfat (SDS) im Überschuss versetzt. Das ist ein anionisches Tensid und amphiphiles Molekül, welches sich mit seiner hydrophoben Gruppe an Proteine anlagert und diese denaturiert. Die hydrophile Gruppe von SDS gibt dem Protein eine negative Ladung. Zusätzlich werden die Proben für fünf Minuten bei 95° C aufgeköcht.

Nach dem Aufbringen der Proben auf ein Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) wird eine elektrische Spannung angelegt. Diese bewirkt die Migration der geladenen Teilchen durch das Gel. Das Gel wirkt dabei wie ein Sieb. Kleine Proteine wandern relativ leicht durch die Maschen des Gels, während große Proteine eher zurückgehalten werden und dadurch langsamer wandern. Am Ende des Vorganges sind alle Proteine nach Größe sortiert und können durch weitere Verfahren sichtbar gemacht werden. Zusätzlich zu den Proben wird ein Größenmarker auf das Gel geladen. Dieser besteht aus Proteinen mit bekannter Größe und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Größe von analysierten Proteinen in den Proben.

Das aufgetrennte Proteingemisch wird in einem weiteren Schritt aus der Gelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (engl. *blot*). Durch ein senkrecht zum PAA-Gel gerichtetes elektrisches Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran und verbleiben dort aufgrund hydrophober Wechselwirkungen. Das Muster der elektrophoretischen Auftrennung bleibt dabei erhalten. Proteinbanden können nun mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Unspezifische Bindungsstellen werden mit Milchproteinen abgesättigt und somit geblockt. Die Membran wird mit einer geeigneten Verdünnung des primären Antikörpers gegen das zu untersuchende Antigen inkubiert. Schwächer haftende, unspezifisch gebundene Antikörper werden mit Waschpuffer entfernt. Nach Waschschritten erfolgt das Zusammenbringen der Membran mit ihrem Sekundärantikörper. Der sekundäre Antikörper ist gegen die Spezies gerichtet, aus der der primäre Antikörper stammt. Dieser ist an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt, das das zugegebene Substrat Luminol in seine oxidierte Form verwandelt. Die Chemi-

lumineszenz dieser Reaktion wird von einem Photofilm wahrgenommen, welcher zur Visualisierung entwickelt werden muss.

Versuchsablauf

Die Proben wurden zur Vorbereitung mit 2-fach SDS-haltigem Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95° C aufgekocht. Es wurden Gele mit einem Volumenanteil von 10 % Acrylamid verwendet. Die Proteinlysate wurden bei konstant gehaltener Stromstärke von 30 mA aufgetrennt. Zum Transfer nutzte man das *Semidry-blot*-System von Biorad und Transferpuffer mit 10 % Methanol. Der Transfer erfolgte bei 50 mA über eine Zeit von 90 Minuten. Anschließend wurde in PBSTween-Lösung mit 5 % Milch geblockt. Kommerziell erworbener Anti-Flag-Primärantikörper fand in einer Konzentration von 1:3000 in PBS mit 2 % BSA Verwendung. Der Sekundärantikörper wurde 1:5000 in PBSTween-Lösung mit 5 % Milch verdünnt. Die Membran wurde für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit der Antikörperlösung umspült. Jeder Waschschrift erfolgte für dreimal 10 Minuten in PBSTween-Lösung. Zur Visualisierung wurden die Membran mit 0,5 ml ECL-Substrat benetzt und die Filme in der Dunkelkammer belichtet.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 *In-vitro*-Transkription

Allgemeine Funktionsprinzipien

Die *in-vitro*-Transkription ist ein molekularbiologisches Verfahren zur enzymatischen Synthese von Ribonukleinsäuren in einem zellfreien Milieu. Als Enzyme stehen rekombinant-hergestellte virale Phagenpolymerasen zur Verfügung. Ein kommerzielles System von Ambion (*Megashort Script Kit*) arbeitet mit der T7-Phagenpolymerase. Sie funktioniert als DNA-abhängige RNA-Polymerase in einem Puffersystem, wenn ihr Ribonukleotid-Bausteine und eine DNA-Matrize mit ihrer Promotorsequenz zur Verfügung stehen. Ein besonderes Strukturmerkmal der *in vitro* transkribierten RNA (IVT-RNA) ist eine Triphosphatgruppe am 5'-Ende des RNA-Stranges, welcher beim Einbau des ersten Nukleotids entsteht. Nach der Synthese wird die DNA mit DNasen zerstört und die Enzyme mit Ammoniumacetat denaturiert. Die RNA kann anschließend mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt werden.

Zur Aufreinigung der RNA wird die Nukleinsäurelösung nacheinander mit Phenol-Chloroform und Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils zentrifugiert und die obere, wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase abgenommen und in ein weiteres Reaktionsgefäß überführt. Die Verschmutzungen werden denaturiert und sammeln sich in der organischen Phase oder an der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen an. Die

Nukleinsäuren bleiben hingegen in der wässrigen Phase gelöst. Unter Zugabe von Ethanol wird die RNA bei minus 20° C gefällt und kann durch Zentrifugation präzipitiert werden. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet in RNase-freiem Wasser resuspendiert. Über eine Säulenchromatographie wird die RNA von einzelnen Basen und Oligonukleotiden, die weniger als acht Basen haben, befreit.

Vorbereiten der kurzen templates

Templates für RNA-Oligonukleotide bis 28 Basen Länge wurden nach folgendem Protokoll generiert: Ausgehend von der gewünschten RNA wurde der *Antisense*-Strang der DNA-Matrize als synthetisches DNA-Oligonukleotid bestellt. Dieser enthielt zusätzlich zur gewünschten RNA-Sequenz am 3'-Ende 14 komplementäre Basen zur T7-Promotorsequenz. In einem ersten Schritt wurde an diesen *Antisense*-Strang ein DNA-Oligonukleotid hybridisiert, welches für den T7-Promotor kodierte (*Sense*-Strang). Da der T7-Promotor bei allen *in vitro* transkribierten RNAs gleich war, konnte man diesen zur Herstellung jeder gewünschten RNA verwenden. Der Hybridisierungsansatz enthielt 10 µl DNA-Hybridisierungspuffer und jeweils 2 µl der beiden DNA-Einzelstränge (100 pmol/ml). Die Reaktion fand durch Denaturierung bei 70° C und anschließendem langsamen Abkühlen über zwei Stunden auf 4° C statt. In einem zweiten Schritt wurde der unvollständige Doppelstrang mit Hilfe der ExoKlenow-Polymerase an beiden 3'-Enden aufgefüllt. Hierzu wurde zum Hybridisierungsansatz 5 µl RNase-freies Wasser, 2 µl ExoKlenow-Puffer, 2 µl Desoxyribonukleotide (2,5 mM) und 2 µl Enzym gegeben. Die Reaktion fand bei 37° C für eine halbe Stunde statt. Daraufhin wurde der Reaktionsansatz zum Denaturieren der Enzyme für fünf Minuten auf 70° C erhitzt und der Hybridisierung wegen wieder langsam abgekühlt.

Vorbereiten des langen templates

Zur Herstellung einer DNA-Matrize für biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP der Länge 200 Basen wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Als DNA-Matrize dieser PCR-Reaktion diente ein DNA-Plasmid, das für GFP kodierte. Die Primer wurden so bestimmt, dass der Vorwärtsprimer und der Rückwärtsprimer ein 200 Nukleotide langes DNA-Stück umfassten. Am 5'-Ende des Vorwärtsprimers wurde die Sequenz des T7-Promotors als nicht-komplementärer Teil angefügt. Die PCR wurde mit folgendem Ansatz pipettiert: Zu 40 µl Wasser wurden 5 µl 10-fach Pfu-Puffer, je 1,25 µl Primer (10 µM), 1 µl dNTP (10 mM), 1 µl *template* (10 ng/µl) und 0,5 µl Pfu-Polymerase (2,5 U/µl) gegeben. Die Zeiten der einzelnen PCR-Schritte waren nach einem Standardprotokoll gewählt. Im Anschluss an die Reaktion wurde das komplette Reaktionsprodukt auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch bei 200 V aufgetrennt. Die Laufzeit wurde regelmäßig, bis zur sichtbaren Auftrennung, kontrolliert. Das gewünschte DNA-Fragment wurde unter

UV-Licht ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe eines kommerziellen Kits von Qiagen isoliert.

Transkription der Ribonukleinsäuren

Für die *in-vitro*-Transkription wurde das *MEGAscript T7 Kit* von Ambion verwendet. Der zur Transkription erforderliche Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 6 µl Wasser, jeweils 2 µl ATP, GTP, CTP, UTP (je 75 mM), 2 µl 10-fach Puffer-Mix und 2 µl Enzym-Mix. Zum Ansatz wurden 2 µl der frisch-hergestellten und gereinigten DNA gegeben. Inkubiert wurde für 12 Stunden bei 37° C.

Transkription der biotinylierten Ribonukleinsäuren

Für die *in-vitro*-Transkription von biotinylierter 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP wurde auch das *MEGAscript T7 Kit* von Ambion verwendet. Der Ansatz wurde in folgendem Punkt verändert: Uridintriphosphat wurde zu zwei Dritteln als unmarkiertes Triphosphat (1,33 µl UTP mit 75 mM) und zu einem Drittel als biotinyliertes UTP (1 µl UTP-16-Biotin mit 50 mM) eingesetzt.

Extraktion der Ribonukleinsäuren

Nach der enzymatischen Transkription wurde die DNA-Matrize mit 1 µl DNase für 30 Minuten bei 37° C zerstört. Es wurden 15 µl Ammoniumacetat hinzugefügt und zu 150 µl Gesamtvolumen mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt. Die RNA wurde mit 150 µl Phenol-Chloroform und 150 µl Chloroform ausgeschüttelt. Die Zentrifugation erfolgte bei 12 000 G für fünf Minuten. Gefällt wurde mit 300 µl 100 % Ethanol für mindestens zwei Stunden bei minus 20° C. Das RNA-Pellet wurde durch Zentrifugation bei maximaler Umdrehung für 30 Minuten bei 4° C gewonnen und in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen. Abschließend wurden die RNAs über *Mini Quick Spin Oligo Columns* von Roche gereinigt.

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Mittels photometrischer Bestimmung der Absorption bei 260 und 280 nm wurde die Konzentration der RNA bestimmt. Als Grundlage diente die Annahme, dass eine optische Dichte 40 µg/ml entspricht (gemessen bei 260 nm, Schichtdicke 1 cm). Durch die Bestimmung des Quotienten der bei 260 nm und 280 nm gemessenen Absorption (A_{260}/A_{280}), erhielt man zusätzlich Information über die Reinheit der Nukleinsäurepräparation. Lag der Quotient für RNA im Bereich 1,8 – 2,0, wurde von einer ausreichend reinen Präparation ausgegangen. Phenol absorbiert ebenfalls bei 260 nm Licht, wodurch eine höhere RNA-Konzentration vorgetäuscht werden kann. Bei niedrigeren Quotienten konnte man von einer Verunreinigung durch Proteine ausgehen. Eine genaue Bestimmung der Nukleinsäuremenge war dann nicht möglich.

Dephosphorylierung von in vitro transkribierter RNA

In vitro transkribierte RNA wurde mit dem Enzym *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) dephosphoryliert. Das Enzym entfernt Phosphatgruppen vom 5'- und 3'-Ende der RNA. 10 µg 5'-Triphosphat-RNA (IVT) wurden mit 30 U CIAP für drei Stunden bei 37° C in einem Puffer mit 50 mM Tris-HCl und 0,1 mM EDTA behandelt. Jeder Ansatz enthielt 10 U RNase-Inhibitor. Anschließend wurde das Enzym CIAP für 15 Minuten bei 65° C inaktiviert und die RNA erneut gefällt und aufgereinigt. Bevor man die RNA für Versuche verwendete wurde ihre Konzentration im Photometer kontrolliert.

2.3.2 Präzipitationsexperimente

Allgemeine Funktionsprinzipien

Die Interaktion von RNA-Rezeptoren oder deren isolierten Proteindomänen mit ihren Liganden kann biochemisch mit Präzipitationsexperimenten nachgewiesen werden. Das Prinzip besteht darin, das Protein über den RNA-Liganden an „schwere Partikel“ (engl. *beads*) zu koppeln. Die RNA als Ligand ist an den Uridin-Basen mit einem Biotin-Rest versehen. Die Biotin-Reste vermitteln eine nicht-kovalente, aber hoch-affine Bindung an das Protein Streptavidin, welches wiederum auf Agarose-*beads* geschichtet ist. Zentrifugiert man die *beads* nach unten, entfernt man damit an biotinylierte RNA gebundenes Protein aus dem Lysat. Anschließend wird mit einem Western Blot die gebundene Proteinmenge der *beads* mit der verbliebenen Menge im Überstand des Lysates verglichen.

Versuchsablauf

Die Proteine wurden in HEK293-Zellen überexprimiert und nach 24 Stunden Kultur lysiert. Ein Teil des Lysates wurde zu Beginn des Experimentes beiseite getan, um als Ladungs- bzw. *Input*-Kontrolle Verwendung zu finden. Für die eigentliche Präzipitation wurde zu 200 µl Lysat 20 µg biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Volumen mit gewaschenen Streptavidin-Agarose-*beads* (40 µl *Bead*-Volumen) versetzt. Diese Mischung wurde für weitere zwei Stunden bei 4° C und konstanter Drehbewegung inkubiert. Dies verhinderte, dass sich die *beads* am Grund des Reaktionsgefäßes absetzten. Eine unspezifische, d.h. nicht-RNA-vermittelte Bindung des Proteins an die Streptavidin-Agarose-*beads* wurde durch Verwendung von Lysat ohne biotinylierte RNA ausgeschlossen. Mittels Zentrifugation (3000 G, 3 Minuten, Raumtemperatur) wurden die *beads* nach vollständiger Inkubationszeit gesammelt und der Überstand abgenommen. Es folgten drei Waschschriffe mit jeweils 400 µl Lysepuffer. Die Proteine der Ladungskontrolle, des Überstandes und der *beads* wurden mit 4-fach Lämmli-Puffer versetzt und für 5 Minuten bei 95° C denaturiert. Jeweils 20 µl wurden zur Immunoblot-Analyse herangezogen.

2.3.3 Bindungsstudien mit rekombinantem Protein

Allgemeine Funktionsprinzipien

Neben Präzipitationsversuchen wurde die Bindung von RNA an ihren Rezeptor bzw. dessen isolierte Domänen mit dem folgenden Bindungs-Assay untersucht: Rekombinantes Protein wird in einem zellfreien System an Polystyren-Oberflächen immobilisiert. Polystyren ist ein Polymer, das unspezifisch Protein bindet. Freie Proteinbindungsstellen auf der Polystyren-Oberfläche werden durch Zugabe von fetalem Kälberserum abgesättigt. Biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP dient als Indikator einer RNA-Rezeptor Interaktion. Die Bindung der biotinylierten RNA an das immobilisierte Rezeptorprotein kann mit einem Anti-Biotin-Antikörper visualisiert werden. Der Antikörper ist an das Enzym Meerrettichperoxidase (engl. *horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Zugegebenes Substrat wird von HRP umgesetzt. Die Höhe des Umsatzes ist an der Intensität des Farbumschlags messbar und korreliert mit der Menge gebundener RNA an den Rezeptor. Für Bindungsstudien wird die Indikator-RNA isoliert oder mit verschiedenen Kompetitoren auf den Assay gegeben. Nach Einstellung eines chemischen Gleichgewichtes wird die verbliebene Menge Indikator-RNA bestimmt. Da das System zell-frei arbeitet, kann die Bindung zwischen RNA und Rezeptor nicht von anderen Ko-Faktoren, die in Zellen präsent wären, beeinflusst werden.

Versuchsablauf

Das Immobilisieren (*Coaten*) des Proteins geschah über Nacht bei 4° C. Pro Bedingung wurden 100 µl Proteinlösung der Konzentration 10 µg/ml auf einer 96-*well*-Platte verwendet. Die Proteine wurden in PBS verdünnt. Anschließend wurde einmal mit 150 µl PBSTween-Puffer gewaschen. Dieser Waschpuffer fand auch im restlichen Experiment Verwendung. Geblockt wurde mit 10 % FCS-haltigem PBS. Alle folgenden Inkubationen wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur ausgeführt. Zwischen den Schritten wurde je dreimal gewaschen. 100 µl biotinylierte RNA der Konzentration 10 ng/µl wurden hinzugefügt. Die Konzentration von RNA oder Protein als Kompetitoren wurde je nach Fragestellung gewählt und bei den jeweiligen Experimenten mit angegeben. Der Anti-Biotin-HRP-Antikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung eingesetzt. Vor Substratzugabe wurde fünfmal gewaschen. Das Substratvolumen belief sich auf 50 µl. Bei sichtbarem Farbumschlag wurde zum Stoppen der HRP-Reaktion 25 µl zweinormale Schwefelsäure verwendet. Die Absorption des Farbumschlages wurde in einem *Multiplate Reader Mithras* bei 450 nm mit Referenzwellenlänge von 490 nm ausgelesen.

2.3.4 Luciferase-Assay

Allgemeine Funktionsprinzipien

Mit dem hier verwendeten Luciferase-Assay konnte die Induktion des IFN- β -Promotors beurteilt werden. Bei diesem System ist das Gen für die Firefly-Luciferase in einem Plasmidkonstrukt hinter Teile des IFN- β -Promotors eingebracht. Wird dieser aktiviert, kommt es zur Expression des Enzyms. Firefly-Luciferase (*Photinus pyralis*) oxidiert das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin. Dabei wird chemische Energie frei, die in Form eines Elektronenübergangs Lichtblitze erzeugt. Die Anzahl an Lichtblitzen ist der Menge an Enzymkatalysatoren proportional und spiegelt die Aktivität des Promotors wieder. Die Auswertung bezieht sich auf die x-fache Induktion des Leerwertes. Zur Normalisierung der unterschiedlichen Bedingungen hinsichtlich ihres Stoffwechsels wird in jede Bedingung ein zweites Plasmidkonstrukt mit dem Gen einer anderen Luciferasespezies transfiziert. Die Renilla-Luciferase (*Renilla reniformis*) befindet sich hinter einem konstitutiv-aktiven CMV-Promotor. Sie setzt nur das Substrat Coelenterazine um. Luciferase-Assays eignen sich für die Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktion in Säugetierzellen, da kein endogenes Chemolumineszenz-System existiert und weder Firefly- noch Renilla-Luciferase posttranslationale Modifikationen benötigen.

Versuchsablauf

Nach 24 Stunden Überexpression der Luciferasekonstrukte erfolgte die Stimulation der Zellen mit den jeweiligen Liganden. Nach weiteren 12 Stunden Kultivierung wurden die Zellen mit 50 μ l *passive lysis puffer* von Promega versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das entstandene Lysat wurde zu je 20 μ l auf zwei weiße, undurchsichtige 96-*well*-Platten verteilt. Anschließend wurde auf jede Bedingung einer Platte 20 μ l des Substrats für das Enzym Firefly-Luciferase gegeben, auf die andere 20 μ l des Substrats für das Enzym Renilla-Luciferase. Der Umsatz des Substrats erfolgte sofort. Die Substrate wurden nach Herstellerangaben benutzt. Die entstehende Chemilumineszenz wurde innerhalb von 15 Minuten in einem *Mithras Multiplate Reader* gemessen.

2.3.5 ADP-Assay

Mit dem *ADP Quest Assay* kann allgemein die Entstehung von ADP in ATP-verbrauchenden Reaktionen gemessen werden. In dieser Arbeit wurde die jeweilige ATP-Hydrolyse von rekombinantem RIG-I, nach Interaktion mit verschiedenen Liganden untersucht.

Allgemeine Funktionsprinzipien

Eine Kinase setzt im Verlauf der Reaktion ATP um. Das entstehende ADP kann über sekundäre Enzymreaktionen detektiert werden. Dabei wird in einem ersten Schritt ADP mit Phosphoenolpyruvat durch die Pyruvatkinase zu Pyruvat umgesetzt. Bei einer weiteren Reaktion entsteht aus dem gebildeten Pyruvat mit Hilfe der Pyruvatoxidase das Beiprodukt H_2O_2 . Eine Peroxidase bildet nun unter Verbrauch von Wasserstoffperoxid den fluoreszierenden Farbstoff Resofurin aus seinem Vorläufer Acetyldihydroxyphenoxazine (ADHP). Das Fluoreszenzsignal wird nach Anregung mit Licht der Wellenlänge 530 nm und anschließender Detektion von Emissionslicht der Wellenlänge 590 nm ausgelesen.

Versuchsablauf

Für den ADP-Assay wurde eine Kinasereaktion in einem Gesamtansatz von 10 μ l in ADP-Assay Puffer pipettiert. Alle Substanzen wurden in diesem Puffer verdünnt. Das rekombinante Enzym RIG-I in der Endkonzentration von 100 ng/ml, der Ligand in der Endkonzentration von 10 ng/ml und ATP in der Endkonzentration von 100 μ M wurden der Reaktion auf Eis zugegeben, um einen Start der ATP-Hydrolyse zu erschweren. Anschließend wurde für 120 Minuten bei physiologischer Temperatur von 37° C inkubiert und danach die entstandene Menge ADP nach dem Protokoll des Herstellers gemessen. Die Assay-Zeit von 120 Minuten wurde auf der Basis einer durchgeführten Kinetik und dem optimalen Verhältnis von Signal zu Hintergrundrauschen gewählt.

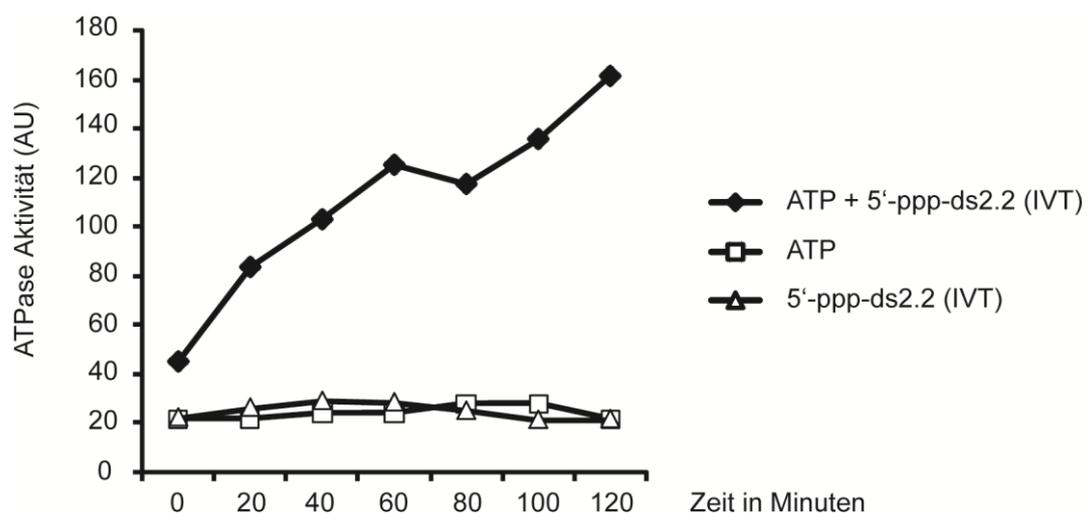


Abb. 2.1 Kinetik des ATPase-Assays. Sieben Ansätze mit rekombinantem RIG-I-Protein wurden parallel mit *in vitro* transkribierter 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA 2.2 auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen im Abstand von 20 Minuten mit ATP im Überschuss gestartet, bei 37° C für die angegebene Zeit inkubiert und der Ansatz nach dem Protokoll des *ADP Quest Assays* entwickelt. Bei diesem Etablierungsversuch wurde rekombinantes RIG-I in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml Protein verwendet.

Wie in Abbildung 2.1 zu sehen ist, steigt mit der Inkubationszeit die Menge an gebildetem ADP an. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden zeigte die ADP-Messung einen 8-fachen Anstieg des Fluoreszenzsignals verglichen mit dem Hintergrund der Kontrollbedingungen. Die Kontrollen schlossen eine Verunreinigung mit Spuren von ADP aus.

2.3.6 Denaturierendes Polyacrylamidgel mit RNA-Oligonukleotiden

Die elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ist in Agarose- und in Polyacrylamid-Gelen möglich. Während Agarose-Gele bei der Elektrophorese von größeren DNA-Fragmenten im Rahmen von Klonierungsarbeiten Verwendung finden, eignen sich hochprozentige Polyacrylamid-Gele zur sichtbaren Auftrennung von RNA-Oligonukleotiden, die kürzer als 50 Basen sind. In einem 20 % Gel werden Laufunterschiede von einer Base erkennbar. Da RNA eine Vielzahl von Sekundärstrukturen bilden kann, müssen für eine exakte Abbildung der Länge der RNA denaturierende Bedingungen geschaffen werden. Daher enthält das Gel Harnstoff und der Laufpuffer wird konstant über 65° C gehalten.

Für ein 20 % Polyacrylamid-Gel wurde folgender Ansatz verwendet: 7,2 g Harnstoff wurden abgewogen und mit 1,5 ml 10-fach Tris-Buffer-EDTA (TBE) vermischt. Anschließend wurde 6,8 ml 40 % Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid = 19:1) hinzugegeben und auf 15 ml Gesamtlösung mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Um die Harnstoffkristalle besser zu lösen wurde der Ansatz kurz angewärmt. Die Polymerisationsreaktion wurde mit 75 µl Ammoniumpersulfat und 15 µl TEMED gestartet und in eine Vorrichtung für 0,5 mm-dicke Gele gegossen. Zur Analyse wurden je Bedingung 2 µg RNA verwendet und mit 2-fachem Ladungspuffer (90 % Formamid, 10 % TBS) versetzt. Vor dem Beladen wurden die RNA-Proben für 5 Minuten bei 95° C erhitzt. Das fertige Gel wurde in eine Laufkammer eingespannt und die Proben aufgetragen. Als Laufpuffer diente 0,3-fach TBE. Die Spannung betrug 20 V/cm Gel. Um eine möglichst vollständige Denaturierung der RNA zu erreichen, wurde die Temperatur des Laufpuffers konstant über 65° C gehalten. Nach dem Lauf wurde die RNA mit Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) im Gel angefärbt und unter UV-Licht beurteilt.

3. Ergebnisse

3.1 5'-Triphosphat-RNA als Ligand von RIG-I

Im Jahr 2004 konnten Kim et al. zeigen, dass *Small-interfering-RNA*, welche in einer *in-vitro*-Transkription (IVT) mit der viralen T7-Phagenpolymerase hergestellt wurde, ein potenter Induktor von Typ-I-Interferonen in einer Vielzahl von Zelllinien ist [32]. Bei der enzymatischen Herstellung der Nukleinsäure entsteht eine Triphosphatgruppe am 5'-Ende der RNA. Das 5'-Triphosphat wurde von Kim et al. als kritisches Motiv für die Aktivierung der antiviralen Zytokinantwort beschrieben. Zwei Jahre später gelang zwei Arbeitsgruppen der Beweis, dass diese Interferonantwort TLR-unabhängig über die zytoplasmatische RNA-Helikase RIG-I vermittelt wird [34, 35]. Das exakte PAMP von RIG-I wird jedoch kontrovers diskutiert.

3.1.1 *In vitro* transkribierte RNA-Oligonukleotide induzieren Interferon- α in humanen Monozyten und Tumorzellen

Vorausgehende Studien haben gezeigt, dass kurze *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA mit 19 bis 21 Basen IFN- α bzw. IFN- β in primären humanen Monozyten induzieren. Die Ausschüttung von Interferon ist in primären humanen Monozyten unabhängig von TLRs und wird über RIG-I vermittelt [32, 34, 35]. Um das minimale Strukturmotiv für eine RIG-I-Aktivierung zu definieren, wurden verschiedene Versionen der 19 Nukleotide langen Modell-RNA 2.2 mit unterschiedlichen molekularen Gruppen am 5'-Enden auf ihre immunstimulatorische Aktivität in humanen Monozyten getestet (für Sequenzen der RNA siehe Tabelle 1).

Die chemisch synthetisierte 5'-OH-Einzelstrang-RNA-*sense* 2.2, die komplementäre 5'-OH-Einzelstrang-RNA-*antisense* 2.2 und die zusammengefügte Doppelstrang-RNA 2.2 konnten nach Transfektion in primäre humane Monozyten keine Interferonausschüttung induzieren (siehe Abb. 3.1 A, Daten für den *Sense*-Strang nicht gezeigt). Das gleiche Ergebnis erhielt man nach Transfektion der chemisch synthetisierten 5'-Monophosphat-RNA 2.2 in *Sense*-, *Antisense*- und Doppelstrang-Konfiguration. Stimulierte man humane Monozyten jedoch mit 5'-Triphosphat-Einzel- oder Doppelstrang-RNA 2.2 (IVT), so kam es zu einer starken Interferonantwort (siehe Abb. 3.1 A).

Transfizierte man dieselben beschriebenen chemisch synthetisierten oder *in vitro* transkribierten RNA-Oligonukleotide 2.2 in humane *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs), so waren alle RNAs immunstimulatorisch aktiv (siehe Abb. 3.1 B). PBMCs enthalten neben Monozyten auch Lymphozyten und plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs), die RNA zusätzlich über andere PRRs erkennen, z. B. TLR3 oder TLR7 bzw. TLR8 [67, 68]. Als Voraussetzung für eine Immunstimulation mussten alle RNA-Oligonukleotide 2.2

mit einer Transfektion in das Zytosol der Zelle eingebracht werden (siehe Abb. 3.1 B). Zur Transfektion wurde in den beschriebenen Experimenten eine Komplexierung mit anionischen Lipiden verwendet.

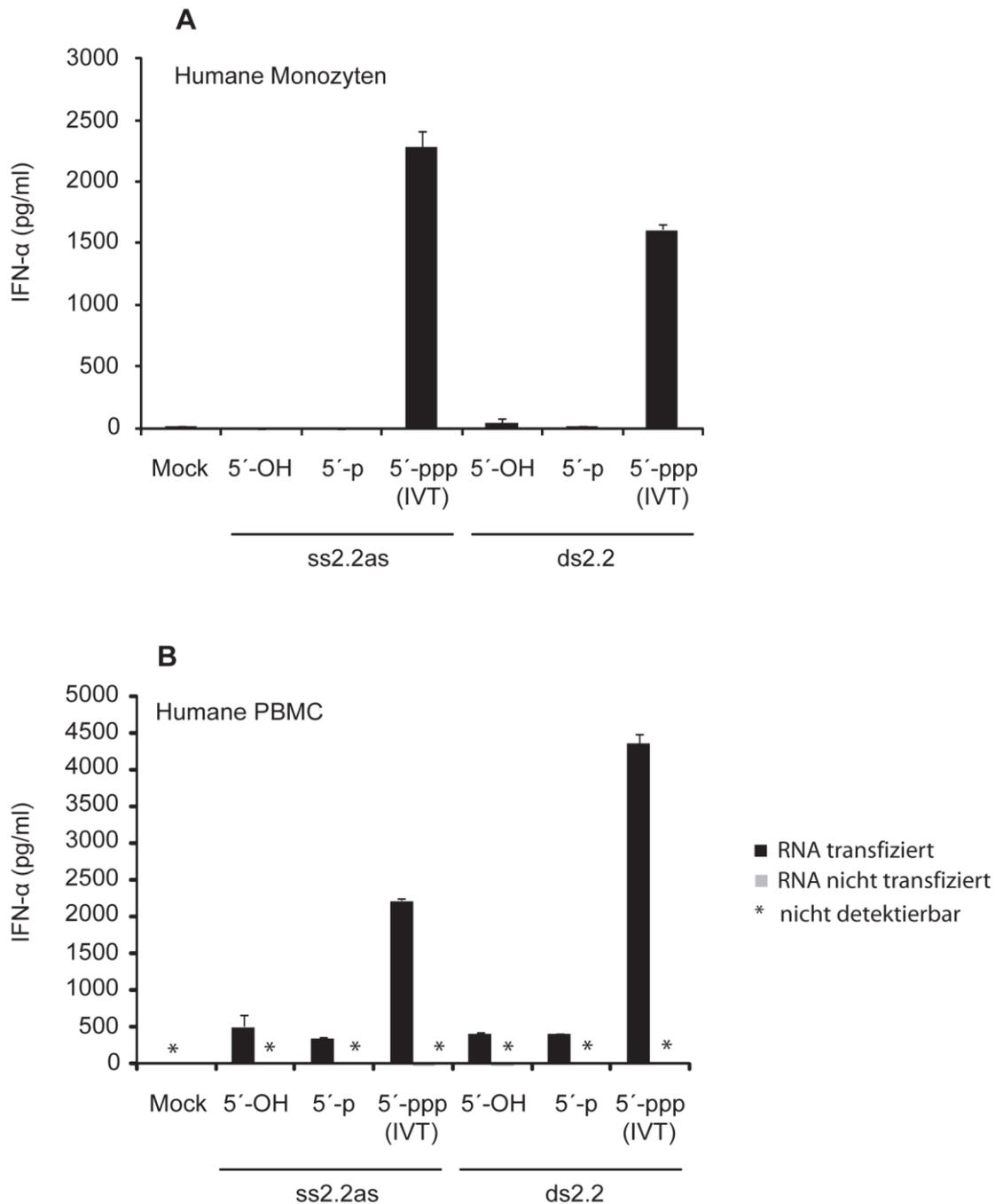


Abb. 3.1 5'-Triphosphat-RNA (IVT) induziert IFN- α in humanen Monozyten. Primäre humane Monozyten und PBMCs wurden mit der Einzel- (ss2.2as) bzw. Doppelstrang- (ds2.2) RNA 2.2 aus chemischer Synthese (5'-OH oder 5'-p) oder *in-vitro*-Transkription (5'-ppp) stimuliert und nach 36 Stunden IFN- α im Überstand mit ELISA bestimmt. **(A)** 150 000 Monozyten wurden mit 200 ng RNA transfiziert. **(B)** 500 000 PBMCs wurden entweder mit 200 ng RNA transfiziert oder die RNA in nicht-komplexierter Form direkt in das Zellmedium gegeben.

Nachdem die Verfügbarkeit von primären humanen Zellen begrenzt ist, wurde nach einem Modellsystem mit Zelllinien gesucht, in denen die Ergebnisse reproduziert werden konnten. Wie primäre humane Monozyten reagiert die Melanomzelllinie 1205LU konstitutiv auf *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-Einzel- und Doppelstrang-RNA 2.2 (siehe Abb. 3.2 A). Die Aktivierung des Interferonsignalweges wurde dabei mit einem Luciferasesystem gemessen, das unter der Kontrolle des IFN- β -Promotors stand. Im Vergleich zu 1205LU-Zellen, wurde in der nativen embryonalen Nierenzelllinie HEK293 nach Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) keine Induktion des IFN- β -Reporterkonstrukts gesehen (Daten nicht gezeigt). Überexprimierte man in diesen Zellen den Rezeptor RIG-I und stimulierte ihn mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT), so ließ sich in diesem Modellsystem eine RIG-I-vermittelte antivirale Antwort zeigen (siehe Abb. 3.2 B). Die Transfektion von synthetisch hergestellten RNA-Oligonukleotiden 2.2 (5'-OH und 5'-Monophosphat) führt weder in 1205LU-Zellen noch in HEK293-Zellen mit RIG-I-Überexpression zur Induktion des IFN- β -Promotors (siehe Abb. 3.2 A und B).

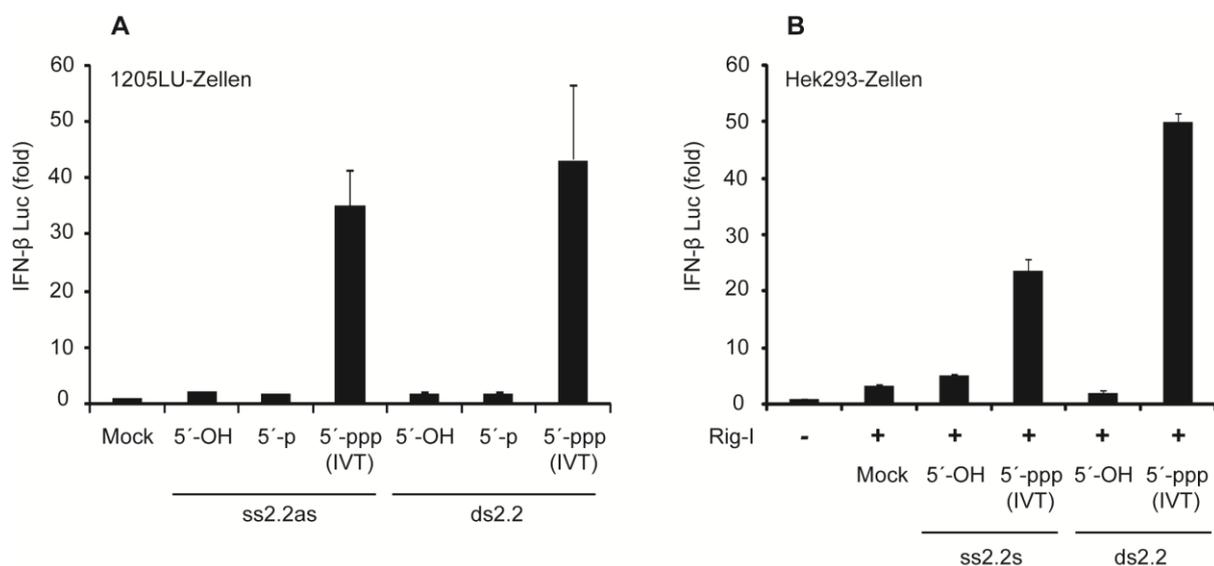


Abb. 3.2 5'-Triphosphat-RNA (IVT) aktiviert den IFN- β -Promotor in Tumorzelllinien. IFN- β -Luciferasereporter wurde für 24 Stunden in **(A)** 1205LU-Zellen oder **(B)** HEK293-Zellen überexprimiert. Anschließend wurden die Tumorzellen mit der chemisch synthetisierten (5'-OH oder 5'-p) oder *in vitro* transkribierten (5'-ppp) Einzel- (ss2.2as, ss2.2s) bzw. Doppelstrang- (ds2.2) RNA 2.2 stimuliert. HEK293-Zellen wurden zusätzlich mit 5 ng eines RIG-I-kodierenden Plasmids kotransfiziert. Die Aktivität des Luciferasereporters wurde nach 12 Stunden bestimmt.

3.1.2 *In vitro* transkribierte RNA stimuliert Sequenz-unabhängig – aber 5'-Triphosphat-abhängig

Die vorangegangenen Experimente belegen, dass 5'-Triphosphat-RNA (IVT) in humanen Monozyten und Tumorzelllinien immunstimulatorisch aktiv ist. Um den Einfluss der Basenzusammensetzung und der Länge der RNA auf den stimulatorischen Effekt zu untersuchen, wurden 1205LU-Melanomzellen mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) verschiedener Sequenzen und Längen stimuliert. *In vitro* transkribierte Einzelstrang-RNA mit GA-, GC- oder ACU-reicher Sequenz induziert eine vergleichbare Interferonantwort wie die 5'-Triphosphat-RNA 2.2 (siehe Abb. 3.3 A). Ebenso unterscheiden sich die zwei untersuchten IVT-Doppelstrang-RNAs der Sequenz 2.2 und 2.1 nicht in ihrer Aktivität. Vergleicht man die Induktion des IFN- β -Promotors nach Transfektion von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) der Länge 8 bis 28 Basen, so führen nur RNAs mit einer minimalen Länge von 12 Nukleotiden zur Immunstimulation von Melanomzellen.

Kim et al. beobachteten im Jahr 2004, dass die immunstimulatorische Aktivität von IVT-RNA kritisch von der Triphosphatgruppe am 5'-Ende der RNA abhängt. Diese Beobachtung wurde durch eigene Versuche bestätigt: 5'-Triphosphat-RNA (IVT) der Sequenz 12 ACU zeigte nach Transfektion in Melanomzellen die erwartete Aktivierung des IFN- β -Reporterkonstrukts. Behandelt man diese RNA mit der Phosphatase *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) und dephosphoryliert somit das 5'-Ende, so verliert die RNA 12 ACU ihre immunstimulatorische Kapazität (siehe Abb. 3.3 B). Als Kontrolle diente RNA 12 ACU, die mit hitzeinaktivierter Phosphatase behandelt wurde. Sie induzierte eine äquivalente Immunantwort wie eine unbehandelte 5'-Triphosphat-RNA 12 ACU (IVT).

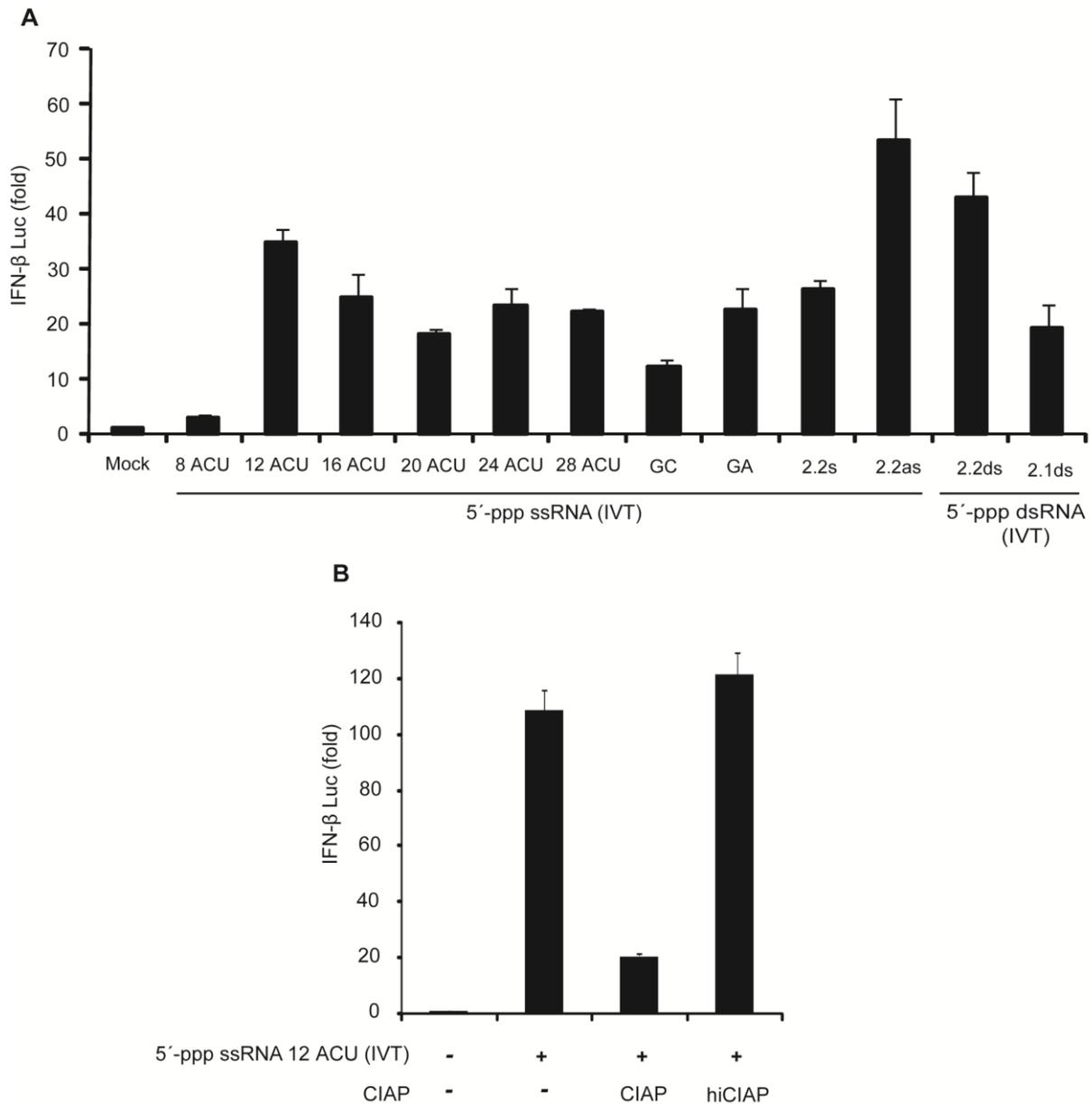


Abb. 3.3 5'-Triphosphat-RNA (IVT) ist unabhängig von der Basenzusammensetzung und abhängig von der 5'-Triphosphatgruppe immunstimulatorisch aktiv. 1205LU-Melanomzellen wurden vorab mit einem IFN-β-Reporterkonstrukt transfiziert und nach 24 Stunden mit 100 ng IVT-RNA für weitere 12 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Reporteraktivität der Luciferase bestimmt. **(A)** 5'-Triphosphat Einzel- (5'-ppp ssRNA) bzw. Doppelstrang- (5'-ppp dsRNA) RNA (IVT) verschiedener Sequenzen und Längen wurden auf ihre Immunstimulation hin untersucht. **(B)** Die 5'-Triphosphat-RNA 12 ACU (IVT) wurde mit aktiver Phosphatase (CIAP) bzw. hitzeinaktivierter Phosphatase (hiCIAP) vorbehandelt und anschließend transfiziert. Nicht-behandelte RNA 12 ACU (IVT) diente als Kontrolle.

3.1.3 5'-Triphosphat-RNA induziert Interferon über den zytosolischen Rezeptor RIG-I

Vorarbeiten von anderen Gruppen zeigten bereits, dass die Interferonantwort auf 5'-Triphosphat-RNA (IVT) TLR-unabhängig vermittelt wird und das Einbringen der RNA in das Zytoplasma erfordert (siehe auch Abb. 3.4 A) [34, 35]. Um die RIG-I-Abhängigkeit der Interferoninduktion in unserem Versuchssystem nachzuweisen, wurden in einem Experiment siRNA-Moleküle gegen den Rezeptor RIG-I oder sein Adapterprotein MAVS eingesetzt. Auf diese Weise konnte das Expressionsniveau dieser beiden Gene auf posttranskriptioneller Ebene herunterreguliert werden. Richtet man eine siRNA in 1205LU-Zellen direkt gegen den Rezeptor RIG-I, so reduziert sich das 5'-Triphosphat-RNA (IVT)-vermittelte IFN- β -Luciferasesignal auf 27 %, verglichen mit einer stimulierten Kontrollbedingung (siehe Abb. 3.4 B). Die Sequenz der Kontroll-siRNA hat kein Ziel auf *messenger* RNA-Ebene. Entsprechend dieser Beobachtung sah man eine Reduktion der Induktion des IFN- β -Promotors um 54 %, wenn eine siRNA gegen das RIG-I-Adapterprotein MAVS eingeführt wurde. Mit diesen Befunden wurde bestätigt, dass der Rezeptor RIG-I in Melanomzellen für die Erkennung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) verantwortlich ist.

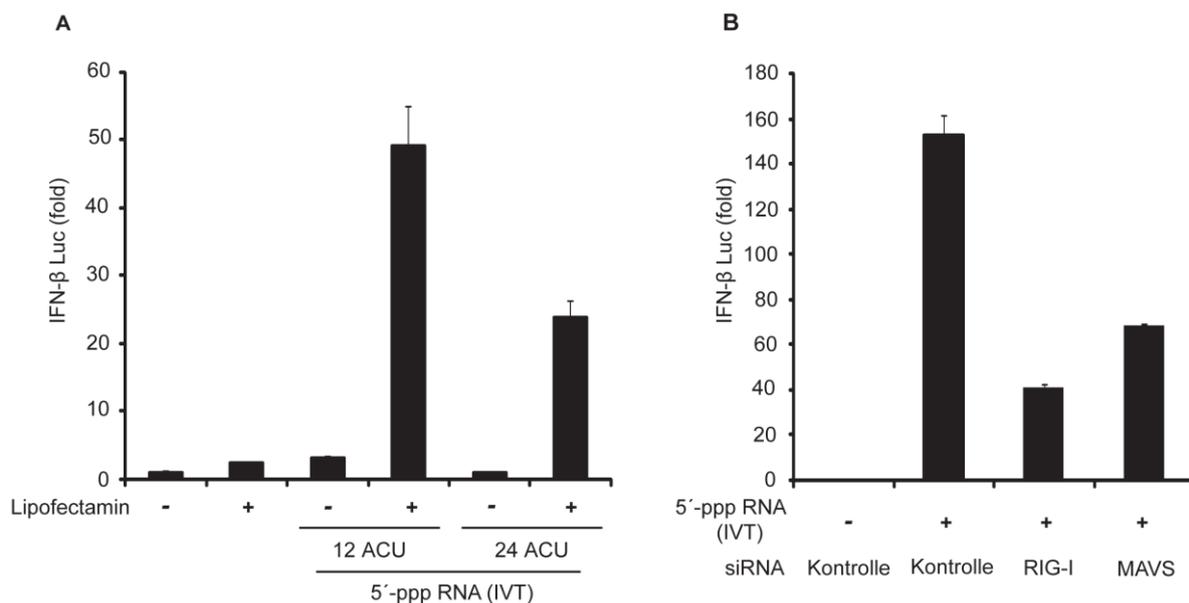


Abb. 3.4 5'-Triphosphat-RNA (IVT) muss in das Zytosol transfiziert werden und wird über den Rezeptor RIG-I erkannt. (A) 1205LU-Melanomzellen wurden mit einem IFN- β -Reporterkonstrukt transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit der 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA 12 ACU bzw. 24 ACU (IVT) für 12 Stunden stimuliert. Zur Stimulation wurden 100 ng RNA entweder transfiziert oder nicht-komplexiert in das Zellmedium gegeben. (B) 1205LU-Zellen wurden parallel mit dem IFN- β -Reporterkonstrukt und siRNA gegen den Rezeptor RIG-I oder das Adapterprotein MAVS transfiziert. Nach 24 Stunden wurde mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) für weitere 12 Stunden stimuliert und abschließend die Aktivität des IFN- β -Reporters gemessen.

Nicht-transfizierte HEK293-Zellen reagieren nicht auf IVT-RNA Stimulation (siehe Abschnitt 3.1.1). Wie aus Abbildung 3.5 zu entnehmen ist, kommt es nach RIG-I-Überexpression und anschließender Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) zu einer starken Induktion des IFN- β -Reporterkonstrukts. Wird in einem weiteren Schritt neben RIG-I die Defektmutante RIG-IC ko-exprimiert, so führt bereits die Zugabe der geringsten Menge von Plasmid-DNA zu einer Aufhebung der gemessenen IFN- β -Reporteraktivität. RIG-IC fehlen die N-terminalen CARD-Domänen, die das Interferonsignal über die Interaktion mit dem Adapterprotein MAVS initiieren, und es wird als dominant-negative RIG-I-Mutante beschrieben. Die Mutante RIG-IC besitzt die vollständige Helikase- und C-terminale Domäne von RIG-I. Das Ergebnis wird in dem Sinne interpretiert, dass RIG-IC 5'-Triphosphat-RNA (IVT) über die Helikase- und C-terminale Domäne effektiv binden kann und den Liganden von dem Volllängen-Rezeptor RIG-I wegfängt. Die schnelle Reduktion der IFN- β -Reporteraktivität nach Ko-Expression von RIG-IC erklärte man sich damit, dass die Mutante RIG-IC ohne die N-terminalen CARD-Domänen als „offener Rezeptor“ funktioniert, der den Liganden 5'-Triphosphat-RNA (IVT) effektiver binden kann als Volllängen-RIG-I. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde das Interferonsignal nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) als RIG-I-abhängig erachtet.

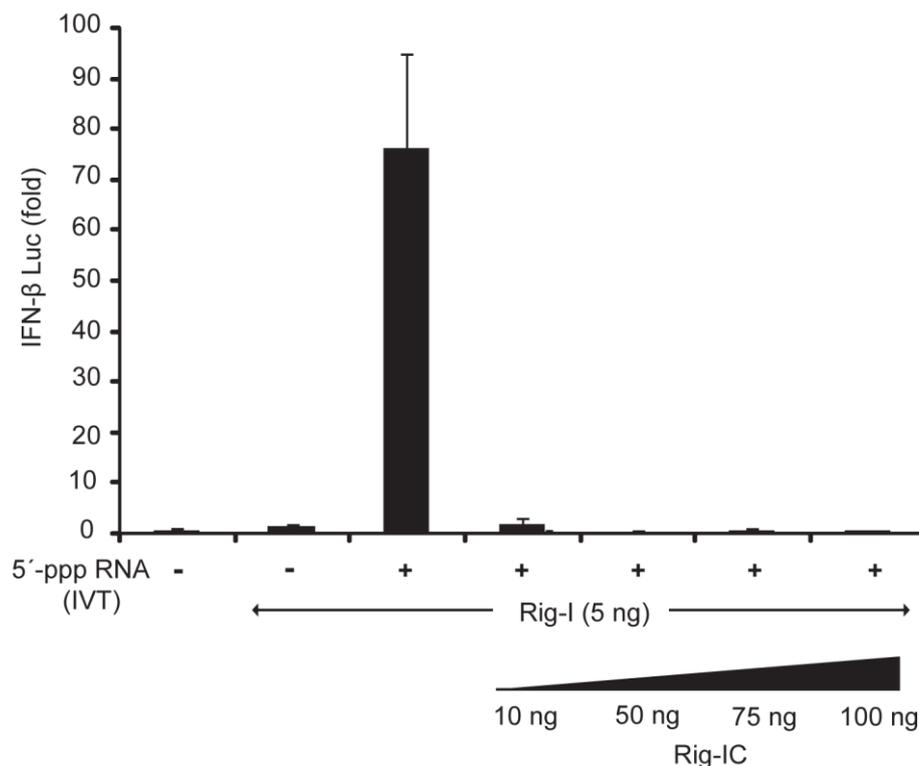


Abb. 3.5 RIG-IC agiert als dominant-negative RIG-I-Mutante. HEK293-Zellen wurden mit dem Luciferasereporter für IFN- β und den angegebenen Mengen Plasmid-DNA für die Helikasen RIG-I bzw. RIG-IC transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation folgte die Stimulation der Zellen für 12 Stunden mit 200 ng 5'-Triphosphat-RNA (IVT) der Sequenz 2.2. Anschließend wurde die Reporteraktivität bestimmt.

3.2 Der Rezeptor RIG-I und seine RNA-Bindungseigenschaft

Zunächst wurde angenommen, dass es sich bei dem Liganden der RNA-Helikase RIG-I um Doppelstrang-RNA handelt. Yoneyama et al. zeigten in ihrer Veröffentlichung eine Bindung von RIG-I an das Doppelstrang-RNA-Analogon Poly I:C und stellten erste Vermutungen über die dabei beteiligten Domänen an [16]. Andere Arbeitsgruppen beschrieben, dass RIG-I 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA (IVT) bindet [34]. In den folgenden Experimenten wurde die Fragestellung welche Domänen den Liganden binden, weiterverfolgt. Gleichzeitig wurden molekulare Strukturmerkmale des Liganden charakterisiert, die eine Bindung an den Rezeptor ermöglichen.

3.2.1 RIG-I bindet 5'-Triphosphat-RNA über die C-terminale Domäne des Rezeptors

Aus den Vordaten lässt sich erkennen, dass RIG-I für die Erkennung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) erforderlich ist (siehe Abschnitt 3.1.3). Um weitere Aussagen über eine direkte Bindung des Liganden 5'-Triphosphat-RNA (IVT) an RIG-I zu gewinnen, wurden *Pull-down*-Versuche durchgeführt: Dazu wurde RIG-I bzw. die drei Defektmutanten (RIG-I KA, RIG-IC, RIG-I Δ C, siehe unten) jeweils in HEK293-Zellen überexprimiert und das Zelllysate mit einer biotinylierten 5'-Triphosphat-RNA (IVT) versetzt. Anschließend wurde der Anteil gebundener Rezeptoren an biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA (IVT) über Streptavidin-Agarose-*beads* aus dem Zelllysate angereichert und der Erfolg der Präzipitation im Immunoblot analysiert. Die verwendete RNA hatte die Sequenz von *green fluorescent protein* (GFP), eine Länge von 200 Basen und ca. ein Drittel der Uridinbasen war biotinyliert (siehe Material und Methoden 2.3.2).

In einem ersten Versuch wurde ein Volllängen-RIG-I-Proteinkonstrukt mit einem Flag-Tag verwendet. Wie aus Abbildung 3.6 A zu entnehmen ist, lässt sich das Protein in HEK293-Zellen überexprimieren und über den Flag-Rest im Immunoblot detektieren (siehe Bande 1). Volllängen-RIG-I bindet biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) und kann nach dem *pull-down* nachgewiesen werden (siehe Bande 2). Da im Vergleich zur Ladungskontrolle die RIG-I-Bande des Überstands nur minimal verschmälert ist, ist RIG-I im Überschuss vorhanden (siehe Bande 1 und 3). Die beiden Kontrollbedingungen enthielten keine 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP. Eine unspezifische bzw. nicht über den Liganden-vermittelte Bindung von überexprimiertem Protein direkt an die Streptavidin-Agarose-*beads* wurde somit ausgeschlossen.

Ein weiterführendes Experiment untersuchte die Bindung der Mutante RIG-I KA an 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT). In diesem Konstrukt wurde die ATPase-Funktion von RIG-I durch die Substitution einer Aminosäure an Position 270 zerstört. Die polare

Aminosäure Lysin (Buchstabenkode K) wurde durch die unpolare Aminosäure Alanin (Buchstabenkode A) ersetzt. Die Mutante RIG-I KA reagiert nicht auf Stimulation mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) (siehe Abschnitt 3.3.1). Wie in Abbildung 3.6 B zu sehen ist, bindet die RIG-I KA-Mutante jedoch den Liganden 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (siehe Bande 2). Die Intensität der Präzipitationsbanden von RIG-I und RIG-I KA mit 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP waren vergleichbar (siehe Abb. 3.6 A und B). Die Unfähigkeit des mutierten Rezeptors RIG-I KA einen Virusbefall zu erkennen, liegt folglich nicht an der mangelnden Bindung der viralen RNA.

Um die Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) an die verschiedenen Domänen von RIG-I genauer zu charakterisieren wurden zwei weitere Präzipitationsexperimente durchgeführt. Hierzu wurde im ersten Schritt das aus Abschnitt 3.1.4 bekannte Konstrukt RIG-IC benutzt (siehe Abb. 3.6 C). Es hat am N-Terminus keine der beiden CARD-Domänen. RIG-IC wird effektiv über biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) aus dem Zelllysate angereichert (siehe Bande 2). Beim Vergleich von Bande 3 mit Bande 1 aus Abbildung 3.6 C fällt auf, dass das RIG-IC-Protein aus dem Zelllysate nahezu vollständig depletiert wurde. Die hocheffektive Bindung von RIG-IC an 5'-Triphosphat-RNA (IVT) wurde bereits aus Abbildung 3.5 ersichtlich. Dieses Ergebnis stützte die Annahme, dass die N-terminalen CARD-Domänen in Vollängen-RIG-I die Bindungsstelle verdecken und deren Abwesenheit in der Mutante RIG-IC die Bindung des Liganden erleichtert.

Aufbauend auf diese Befunde wurde die Bedeutung des C-Terminus von RIG-I für die Bindung des Liganden in einem weiteren Experiment bestätigt. Das Konstrukt RIG-I Δ C bestand aus den N-terminalen Aminosäuren der Position 1 bis 604 und bricht in der Helikase-Domäne ab. Durch das Fehlen der 321 C-terminalen Aminosäuren verlor RIG-I Δ C drei konservierte Motive (IV, V und VI) der DExD/H Box Helikase-Domäne. Das Konstrukt RIG-I Δ C stammt aus der Veröffentlichung von Yoneyama et al, die RIG-I in einem *Two-hybrid*-Verfahren identifizierten [16]. Aus Abbildung 3.6 D ist zu entnehmen, dass RIG-I Δ C nicht an biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) bindet (siehe Bande 2). Entsprechend ist die Intensität der RIG-I Δ C-Bande des eingesetzten Zelllysates ebenso stark wie die Bande aus dem Überstand nach der versuchten Präzipitation (siehe Bande 1 und 3). Dieses Ergebnis betonte die Bedeutung des C-Terminus für die Bindung des Liganden 5'-Triphosphat-RNA (IVT).

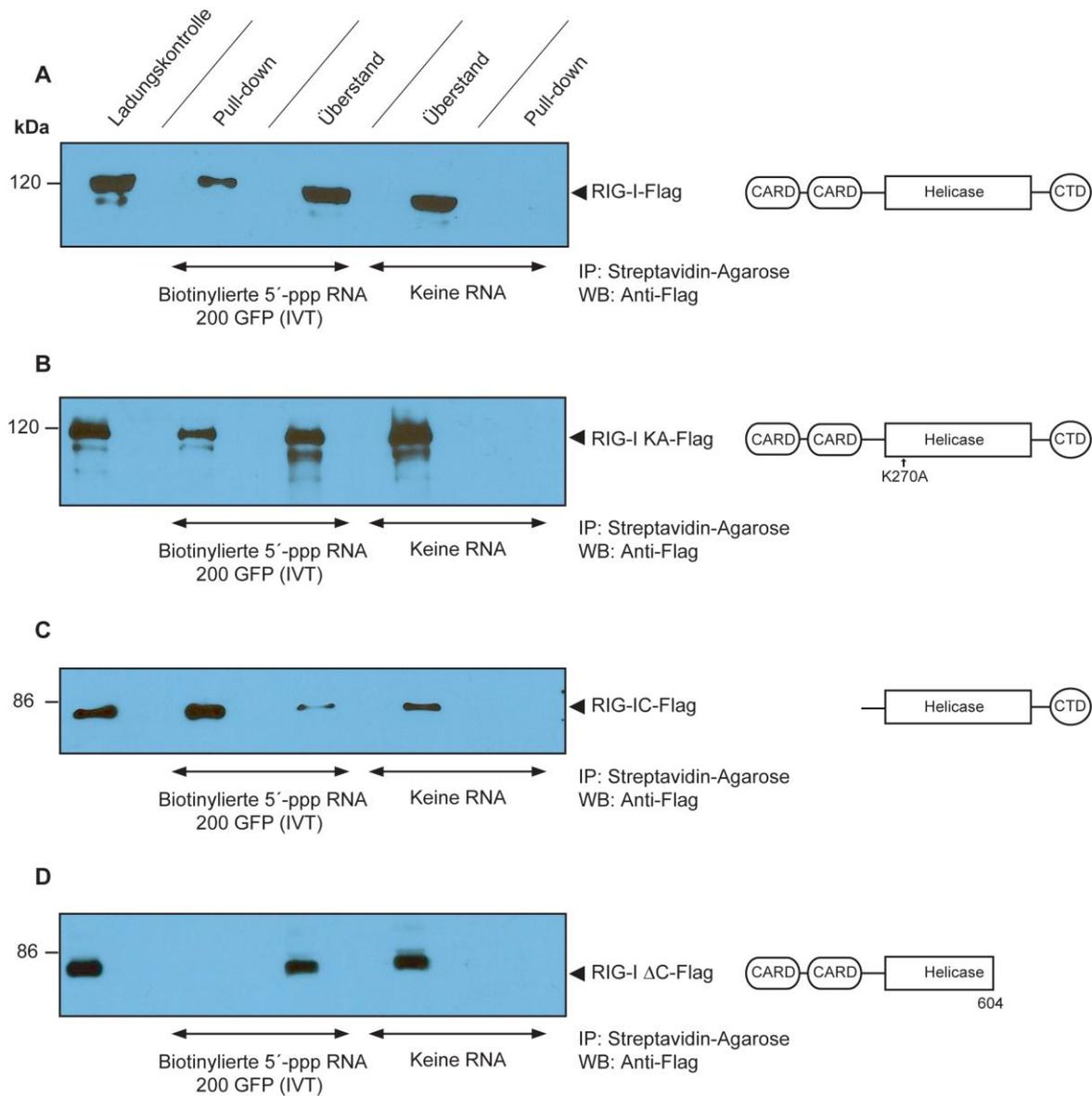


Abb. 3.6 Präzipitationsexperimente mit RIG-I, RIG-I KA, RIG-I C und RIG-I ΔC und 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT). HEK293-Zellen wurden jeweils mit Plasmid-DNA kodierend für RIG-I-Flag, RIG-I KA-Flag, RIG-I C-Flag und RIG-I ΔC-Flag transfiziert, für 24 Stunden kultiviert und anschließend lysiert. Alle Plasmide kodierten für einen Flag-Rest am N-Terminus des Proteins. Zelllysate wurden für eine Stunde mit 20 µg biotinierter 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) versetzt und der gebundene Proteinanteil über den markierten Liganden mit Streptavidin-Agarose-beads angereichert. Die Kontrollen enthielten keine RNA. Die RIG-I-Proteine wurden in der Ladungskontrolle, den gewaschenen beads (*pull-down*) und dem Überstand mit Anti-Flag-Antikörpern im Western Blot nachgewiesen. Präzipitationsexperimente mit **(A)** RIG-I-Flag **(B)** RIG-I KA-Flag, **(C)** RIG-I C-Flag **(D)** RIG-I ΔC-Flag.

3.2.2 5'-Triphosphat-RNA bindet an die C-terminale Domäne

Aus den Vorbefunden war ersichtlich, dass an der Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) die Helikase-Domäne und die C-terminale Domäne beteiligt sind (siehe Abb. 3.5 und 3.6). Verkürztes RIG-I ΔC mit einem Abbruch in der Helikase-Domäne an Position 604 bindet 5'-Triphosphat-RNA (IVT) nicht. Die Helikase-Domäne ist definiert von Aminosäureposition 203 bis 793. Ob die mangelnde Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) isoliert auf die verkürzte Helikase-Domäne von RIG-I zurückzuführen ist oder auf das Fehlen des C-Terminus des Rezeptors (Aminosäuren 793-925), konnte noch nicht beantwortet werden. Diese Frage wurde in einem Bindungs-Assay untersucht.

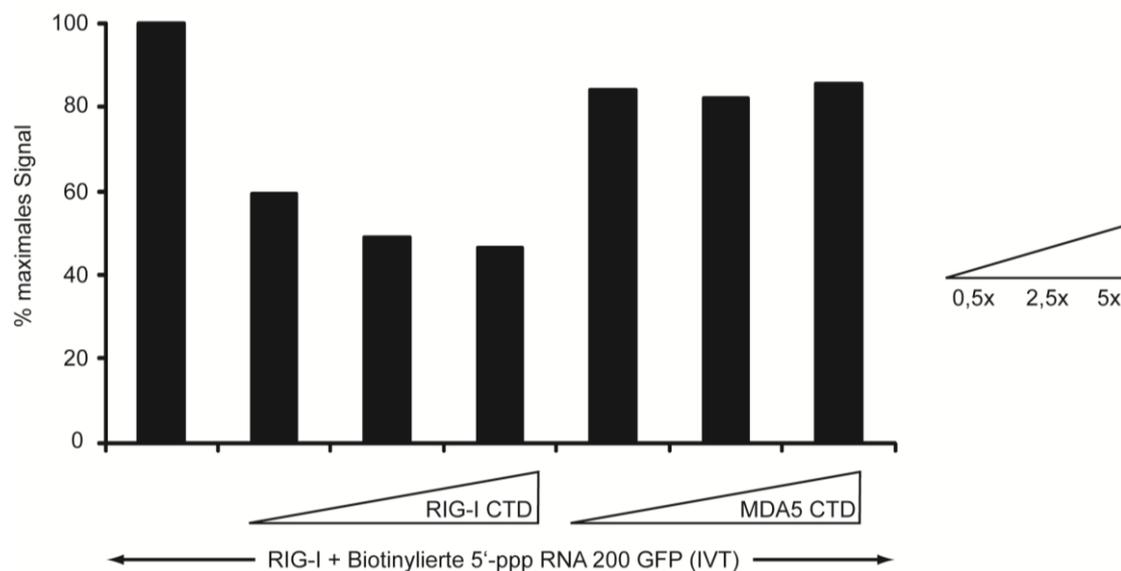


Abb. 3.7 RIG-I C-terminale Domäne (RIG-I CTD) ist an der Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) beteiligt. Rekombinantes Volllängen-RIG-I-Protein wurde über Nacht an eine ELISA-Platte gebunden. Biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) diente als markierter Bindungsligand. Dieser wurde isoliert oder mit aufsteigenden Mengen von rekombinanter RIG-I CTD oder MDA-5 CTD auf der vorbereiteten Platte für zwei Stunden inkubiert (0,5-, 2,5- und 5-fache molare Mengen von RIG-I CTD bzw. MDA-5 CTD zu gebundenem RIG-I). Die auf der Platte gebundene Menge biotinylierter RNA wurde mit einem Anti-Biotin-HRP-Antikörper nachgewiesen. Normiert wurde auf das Bindungssignal von 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) ohne Kompetitor.

Dazu wurde rekombinantes Volllängen-RIG-I-Protein am Boden einer ELISA-Platte immobilisiert und anschließend mit der bereits verwendeten biotinylierten 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) inkubiert. Eine Bindung des Liganden an den immobilisierten Rezeptor konnte mit einem Anti-Biotin-HRP-Antikörper visualisiert werden (siehe Material und Methoden 2.3.3). Wie erwartet, bindet auch immobilisiertes RIG-I-Protein biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (siehe Abb. 3.7). Gibt man nun zusammen mit der

biotinylierten 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP eine aufsteigende Menge von rekombinant hergestellter C-terminaler RIG-I-Domäne (RIG-I CTD), die die Aminosäuren 802 – 925 umfasst, so reduziert sich das Bindungssignal konzentrationsabhängig. RIG-I CTD kompetiert mit immobilisiertem Vollängen-RIG-I um biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT). Trotz der Verwendung der 5-fachen molaren Menge von RIG-I CTD im Vergleich zu immobilisiertem RIG-I konnte die Bindung des Liganden um maximal 54 % reduziert werden. Dies führte zu der Aussage, dass die RIG-I CTD neben der Helikase-Domäne an der Bindung des Liganden beteiligt ist. Als Kontrolle diente der rekombinant hergestellte C-Terminus der verwandten RNA-Helikase MDA-5 (MDA-5 CDT). Im Gegensatz zu RIG-I CTD, kann MDA-5 CDT das Bindungssignal nicht reduzieren (siehe Abb. 3.7).

3.2.3 Doppelstrang-RNA verdrängt 5'-Triphosphat-RNA aus der Bindung an RIG-I

In den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 wurden die Domänen des Rezeptors identifiziert, die an der Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) beteiligt sind. Welche molekularen Strukturen auf der Seite des RNA-Liganden an den Rezeptor binden können, wurde mit den bisher gezeigten Daten noch nicht geklärt. Die hier vorliegenden Daten ergeben, dass RIG-I von 5'-Triphosphat-Einzel- und Doppelstrang-RNA (IVT) aktiviert wird. Der Rezeptor RIG-I gehört zur Familie der DExD/H Box RNA-Helikasen, einer Gruppe von Proteinen, die für das Entwinden von doppelsträngigen Nukleinsäuren bekannt sind. Die Bedeutung der Doppelstrang-Struktur für die Bindung des Liganden an RIG-I wurde im Vergleich zur Wertigkeit der 5'-Triphosphatgruppe eines RIG-I-Liganden untersucht.

Um diese Frage zu bearbeiten, wurde mit dem in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Wettbewerbsansatz gearbeitet (siehe Material und Methoden 2.3.3). Rekombinantes Vollängen-RIG-I-Protein wurde auf einer ELISA-Platte immobilisiert. Die bereits verwendete biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) diente als markierter Ligand, dessen Bindung an das immobilisierte RIG-I-Protein über einen Anti-Biotin-HRP-Antikörper detektiert wurde. Die biotinylierte RNA wurde zusammen mit verschiedenen Kompetitor-RNAs der Sequenz 2.2 auf die Platte gegeben und die verbliebene, markierte RNA am fixierten Rezeptor RIG-I als Maß für eine erfolgreiche Konkurrenz quantifiziert.

Die chemisch synthetisierte Einzelstrang-RNA 2.2 mit einer 5'-Hydroxy- oder 5'-Monophosphatgruppe konnte die biotinylierte 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP nicht aus der Bindung an RIG-I verdrängen (siehe Abb. 3.8 A und 3.8 B). Diese Tatsache stimmte für alle Konzentrationsstufen synthetischer Einzelstrang-RNA 2.2. Im Gegensatz dazu verdrängte die synthetische Doppelstrang-RNA 2.2 mit einer 5'-Hydroxy- oder 5'-Monophosphatgruppe den markierten Liganden konzentrationsabhängig aus der Bindung. Verwendete man *in vitro*

transkribierte 5'-Triphosphat-RNA 2.2, so agierte diese RNA als potenter Kompetitor, unabhängig von der Einzel- oder Doppelstrang-Konformation der Liganden 2.2. Alle drei Konzentrationsstufen waren in dieser Eigenschaft vergleichbar effektiv.

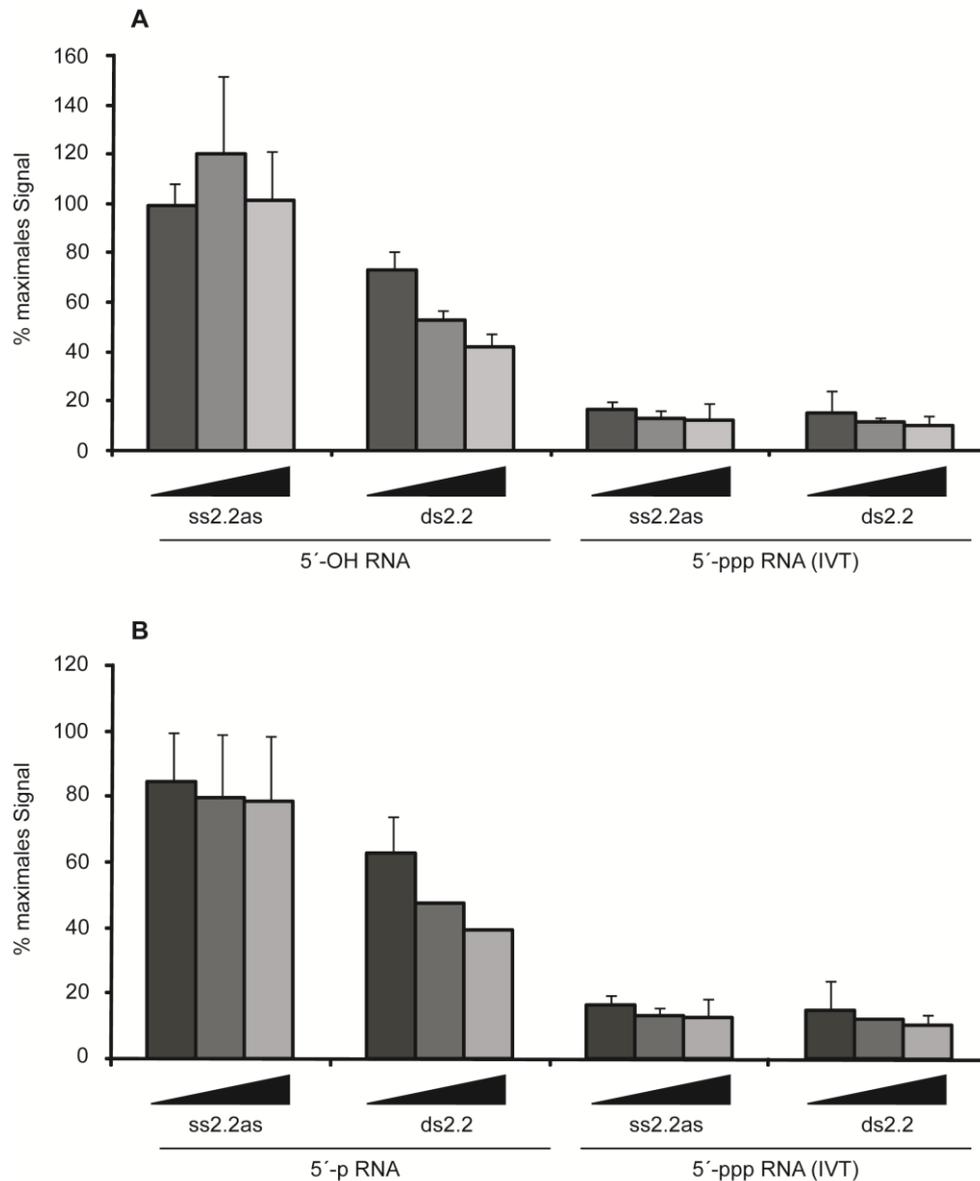


Abb. 3.8 Synthetische Doppelstrang-RNA und 5'-Triphosphat-RNA (IVT) kompetieren um die Bindungsstelle von RIG-I. Rekombinantes Volllängen-RIG-I wurde über Nacht an eine ELISA-Platte gebunden. Anschließend wurde mit biotinylierter 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) als markierter Ligand (Konzentration 10 ng/μl) und verschiedenen Versionen von Kompetitor-RNA 2.2 in aufsteigenden Konzentrationen (10, 50 und 100 ng/μl) inkubiert. Nach Waschschritten wurde die an der Platte verbliebene biotinylierte RNA mit einem Anti-Biotin-HRP-Antikörper nachgewiesen. Normiert wurde auf das Bindungssignal von 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) an RIG-I ohne Kompetitor-RNA. In **(A)** wurde als Kompetitor chemisch hergestellte 5'-OH- und *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat- (5'-ppp) RNA 2.2, jeweils als Einzel- (ss2.2as) bzw. Doppelstrang (ds2.2) verwendet. Im Unterschied zu (A) wurde in **(B)** chemisch hergestellte 5'-Monophosphat- (5'-p) RNA 2.2 als Einzel- (ss2.2as) und Doppelstrang (ds2.2) verwendet.

3.2.4 RIG-I bindet kurze Doppelstrang-RNA unabhängig vom 5'-Ende

Wie in Abbildung 3.8 gezeigt, verdrängt kurze chemisch synthetisierte Doppelstrang-RNA 2.2 die lange 5'-Triphosphat-RNA 200 GFP (IVT) aus ihrer Bindung an RIG-I. Ergänzend wurde in *Pull-down*-Versuchen mit kurzen RNA-Oligonukleotiden 2.2 die Abhängigkeit der RIG-I-Ligandenbindung hinsichtlich des 5'-Endes untersucht. Zur optimalen Vergleichbarkeit der Bedingungen wurden die Doppelstränge nach folgendem Konzept generiert: Der *Antisense*-Strang war chemisch synthetisiert und am 5'-Ende mit einem einzelnen Biotin-Rest versehen. Als *Sense*-Strang wurde entweder eine *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA 2.2 oder eine synthetisch hergestellte RNA 2.2 mit einer 5'-Hydroxygruppe angefügt. Dabei wurde von dem Konzept ausgegangen, dass sich der Rezeptor vom 5'-Ende an den Liganden nähert. Je nach *Sense*-Strang traf das Protein dabei auf eine 5'-Hydroxy- oder 5'-Triphosphatgruppe. Das andere 5'-Ende vermittelte über den Biotin-Rest die Bindung an die Streptavidin-Agarose-*beads* und ermöglichte damit die Anreicherung von RIG-I.

Aus dem Western Blot in Abbildung 3.9 A konnte entnommen werden, dass das überexprimierte RIG-I im Zelllysat von HEK293-Zellen in ausreichender Menge vorhanden war (siehe Bande 1). RIG-I konnte beide Doppelstrang-RNAs 2.2 unabhängig vom 5'-Ende der *Sense*-RNA binden (siehe Bande 2 und 4). Da im Lysat RIG-I im Überschuss vorhanden war, sah man nur eine minimale Abnahme der RIG-I-Proteinbande aus dem Überstand im Vergleich zu RIG-I in der Ladungskontrolle (siehe Bande 1, 3 und 5).

Die vorangegangenen Experimente wiesen bereits darauf hin, dass Einzelstrang-RNA 2.2 ohne 5'-Triphosphat nicht an RIG-I bindet (siehe Abb. 3.8). Diese Beobachtung wurde mit einem weiteren *Pull-down*-Experiment bestätigt. Der Versuch, überexprimiertes RIG-I-Protein aus Zelllysat mit der isolierten 5'-Biotin-Einzelstrang-RNA-*antisense* 2.2 anzureichern, scheiterte (siehe Abb. 3.9 B, Bande 5). RIG-I bindet nicht an synthetische Einzelstrang-RNA 2.2.

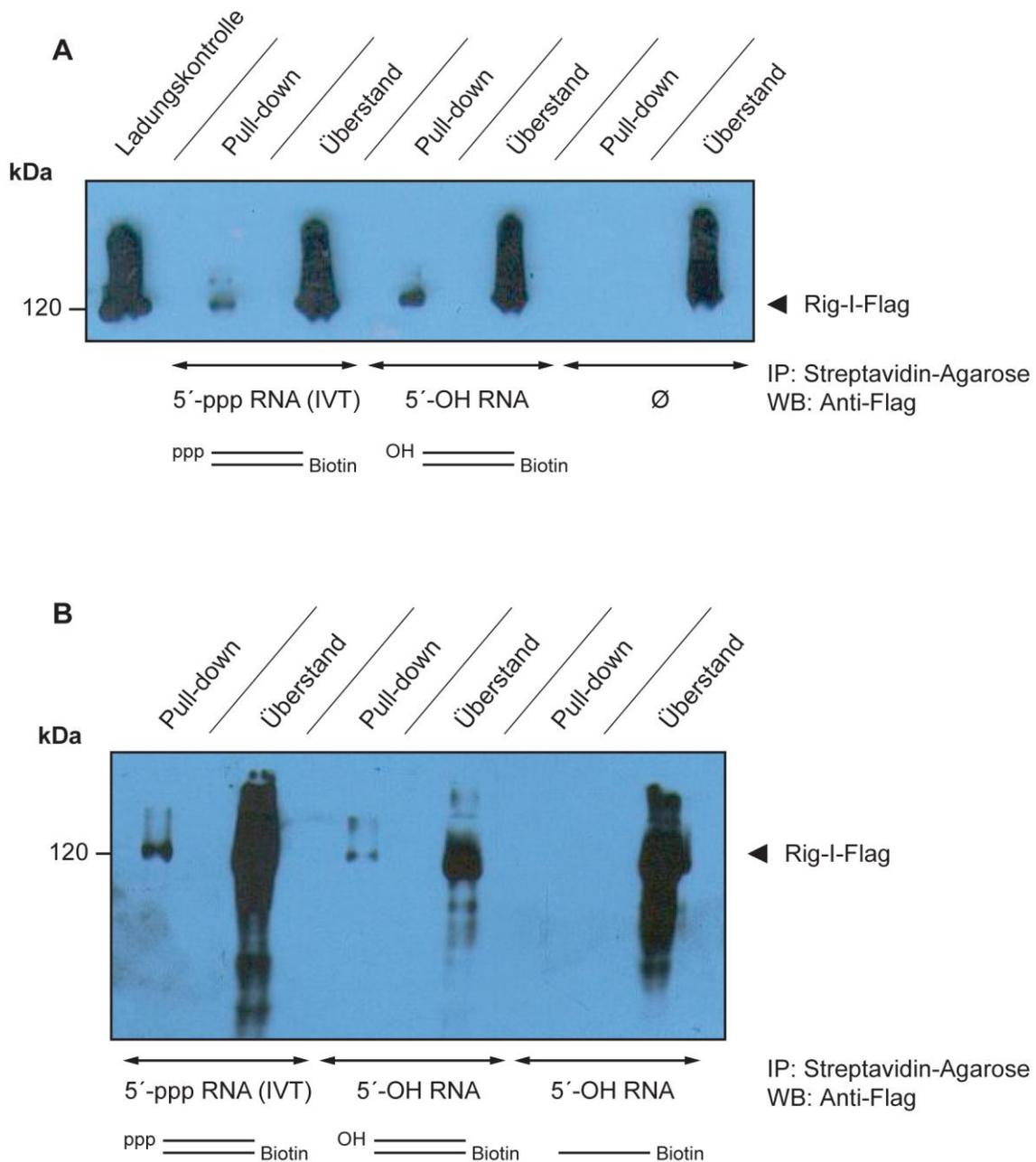


Abb. 3.9 Unabhängig vom 5'-Ende des Liganden bindet RIG-I kurze Doppelstrang-RNA, aber keinen synthetischen Einzelstrang. RIG-I-Flag wurde in HEK293-Zellen für 24 Stunden überexprimiert und anschließend aus Zelllysate mit Biotin-markierter RNA über Bindung an Streptavidin-Agarose-*beads* immunopräzipitiert. Präzipitiertes Protein wurde im Western Blot mit Anti-Flag-Antikörpern nachgewiesen. **(A)** Synthetische 5'-Biotin-RNA-*antisense* 2.2 wurde mit 5'-Triphosphat-RNA-*sense* 2.2 (IVT) oder mit synthetischer 5'-OH-RNA-*sense* 2.2 zum Doppelstrang zusammengefügt und anschließend für eine Stunde mit Zelllysate inkubiert. Die Kontrolle enthielt keine RNA. **(B)** Doppelstrang-RNA 2.2 aus (A) wurden verglichen mit der Bindung von RIG-I-Flag an synthetische 5'-Biotin-Einzelstrang-RNA-*antisense* 2.2.

3.3 Der Rezeptor RIG-I und seine ATPase-Funktion

Der Rezeptor RIG-I gehört zur Familie der DExD/H Box RNA-Helikasen, einer Gruppe von Proteinen, die in Säugetieren an zahlreichen zellulären Prozessen beteiligt sind (u. a. Transkription, RNA-Splicing, RNA-Interferenz). Dabei nehmen DExD/H Box RNA-Helikasen unterschiedliche Rollen ein: Sie arbeiten als RNA-Chaperone, verändern die Interaktion von RNA mit Proteinen oder entwinden – mit ihrer intrinsischen ATPase-Funktion – Doppelstrang-RNA [69].

3.3.1 RIG-I-Interferonsignal setzt aktive ATP-Hydrolyse durch den Rezeptor voraus

In Analogie zu anderen DExD/H Box RNA-Helikasen besitzt RIG-I ein konserviertes ATP-Bindungsmotiv, die sogenannte Walker-A-Sequenz [70]. Diese Sequenz (AXXGXGKT) ist essentiell für die Bindung und Hydrolyse von ATP [71]. Zahlreiche Studien sahen nach Mutation der Aminosäure Lysin in der Walker-A-Sequenz einen Verlust der ATPase-Funktion des jeweiligen Proteins [72, 73]. In der Erstbeschreibung von RIG-I zeigte bereits Yoneyama et al., dass es nach Substitution der Aminosäure Lysin mit Alanin an Position 270 (RIG-I K270A) zu einem Verlust der antiviralen Signalauslösung durch RIG-I kommt [16].

Um die Abhängigkeit der Liganden-induzierten Signalauslösung von der RIG-I ATPase-Funktion zu überprüfen, wurden HEK293-Zellen entweder mit dem Wild-Typ-Rezeptor RIG-I oder der Defektmutante RIG-I K270A transfiziert und mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) stimuliert. Der Effekt der Stimulation wurde mit dem IFN- β -Reporterkonstrukt gemessen. HEK293-Zellen ließen sich nativ nicht mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) stimulieren (siehe Abb. 3.10). Nach Überexpression ansteigender Mengen von Wild-Typ-RIG-I und Rezeptorstimulation sah man einen parallelen Anstieg der IFN- β -Promotoraktivität. RIG-I K270A mit dem ATPase-Defekt konnte hingegen nicht mit 5'-Triphosphat-RNA (IVT) aktiviert werden. Die Signalauslösung durch 5'-Triphosphat-RNA setzt eine funktionsfähige ATPase-Aktivität im Rezeptor RIG-I voraus.

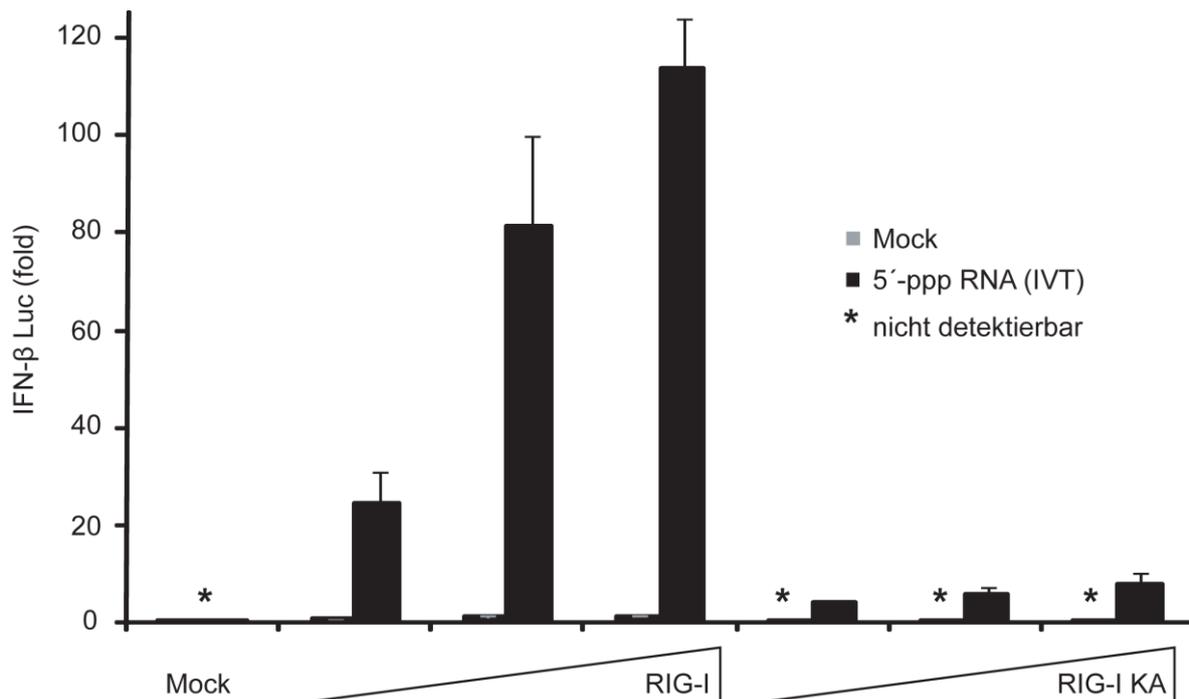


Abb. 3.10 RIG-I-vermitteltes Interferonsignal ist abhängig von der ATPase-Funktion des Rezeptors. HEK293-Zellen wurden parallel mit IFN- β -Luciferasereporter und aufsteigenden Mengen von Plasmid-DNA (5 ng, 25 ng und 50 ng) kodierend für Wild-Typ-RIG-I oder RIG-I K270A transfiziert. Nach 24 Stunden Transfektion wurden die Bedingungen mit 200 ng 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA 2.2 (IVT) für 12 Stunden stimuliert und anschließend die Reporteraktivität bestimmt.

3.3.2 Rekombinantes RIG-I-Protein hydrolysiert ATP *in vitro*

Da ATP-Hydrolyse eine Voraussetzung für die Aktivierung des Rezeptors RIG-I ist, wurde ein zellfreier *in-vitro*-Assay etabliert, der es erlaubt, die Liganden-induzierte ATP-Hydrolyse von rekombinantem RIG-I zu messen (siehe Material und Methoden 2.3.6).

In einem ersten Schritt wurden orientierend Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren getestet. Wie in Abbildung 3.11 zu sehen war, kam es nach Inkubation von rekombinantem RIG-I mit ATP und der synthetischen 5'-OH Doppelstrang-RNA 2.2 oder dem RNA-Analogen Poly I:C zu einer Aktivierung der ATPase-Funktion von RIG-I. Poly I:C ist ein Gemisch von synthetisch hergestellten Doppelstrang-RNAs im Bereich von 4 bis 8 Kilobasen Länge. Der Doppelstrang 2.2 war mit 19 Nukleotiden im Vergleich zu Poly I:C sehr kurz. Ferner konnte gezeigt werden, dass RIG-I nach Inkubation mit DNA-Liganden kein ADP generierte. Diese Beobachtung galt für eine kurze Einzelstrang-DNA, die als *template* für die *in-vitro*-Transkription der RNA 2.2 diente, und für die Plasmid-DNA kodierend für GFP.

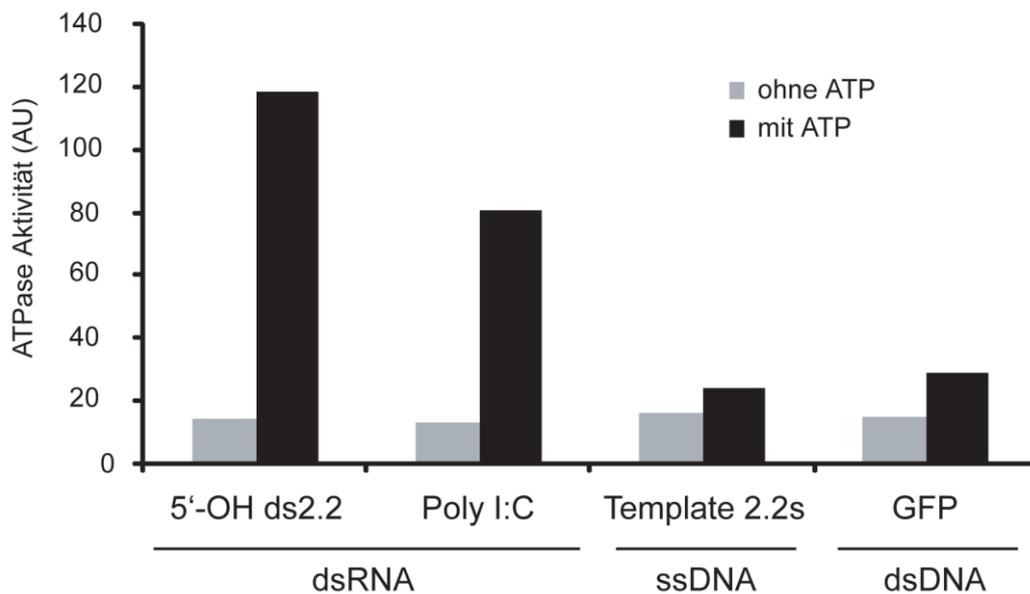


Abb. 3.11 ATP-Hydrolyse von rekombinantem RIG-I-Protein kann *in vitro* gemessen werden. Rekombinantem RIG-I wurde mit synthetischen Doppelstrang-RNA- (dsRNA) bzw. Einzel- (ssDNA) oder Doppelstrang-DNA- (dsDNA) Liganden inkubiert (für Sequenzen siehe Tabelle 1). Die Reaktion wurde mit ATP gestartet und die gebildete Menge von ADP nach zwei Stunden mit dem *ADP Quest* Assay gemessen. Der Kontrollbalken jeder Bedingung repräsentiert RIG-I mit Ligand ohne Zugabe von ATP. Die ATPase-Aktivität ist in willkürlichen Einheiten (*arbitrary units*, AU) dargestellt.

3.3.3 *In vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA und synthetische Doppelstrang-RNA induzieren ATP-Verbrauch von RIG-I

Aus dem Vorversuch war bereits bekannt, dass lange und kurze synthetische Doppelstrang-RNA die ATPase-Funktion von RIG-I aktivierte (siehe Abb. 3.11). Gleichzeitig wusste man aus den hier vorliegenden Daten, dass nur 5'-Triphosphat-RNA (IVT) RIG-I stimulierte und das RIG-I-vermittelte Signal nur unter ATP-Verbrauch ablaufen konnte (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.3.1).

Untersucht man nun isoliert die Aktivierung der ATPase-Funktion von RIG-I in Bezug auf Einzel- versus Doppelstrang-RNA mit ihren jeweiligen 5'-Gruppen, so macht man folgende Beobachtung: Chemisch hergestellte Einzelstrang-RNA mit einer 5'-Hydroxygruppe oder einem 5'-Monophosphat kann die ATPase-Funktion nicht induzieren. Interagiert rekombinantem RIG-I jedoch mit *in vitro* transkribierter 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA 2.2 so wird ADP generiert (Daten für den *Antisense*-Strang nicht gezeigt). Interessanterweise konnte in allen Bedingungen mit Doppelstrang-RNA ADP-Bildung nachgewiesen werden und das unabhängig vom 5'-Ende der RNA 2.2: 5'-OH, 5'-Monophosphat oder 5'-Triphosphat (siehe Abb. 3.12).

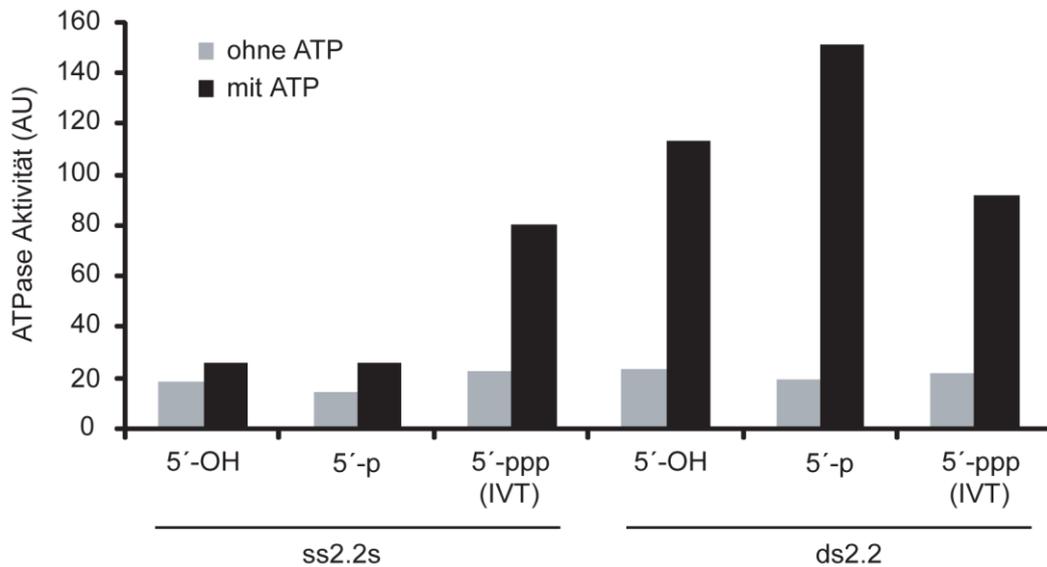


Abb. 3.12 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA (IVT) aktiviert die ATP-Hydrolyse in RIG-I. Rekombinantes RIG-I-Vollängen-Protein wurde jeweils mit Einzel- (ss2.2s) bzw. Doppelstrang (ds2.2) RNA 2.2 aus chemischer Synthese (5'-OH oder 5'-p) oder *in-vitro*-Transkription (5'-ppp) inkubiert und mit ATP im Überschuss gestartet. ADP-Bildung wurde nach zwei Stunden mit dem *ADP Quest Assay* als Fluoreszenzsignal gemessen. Die jeweiligen Kontrollen enthielten kein ATP. Das Fluoreszenzsignal des ATPase-Assays ist in willkürlichen Einheiten, sogenannten *arbitrary units* (AU), dargestellt.

Obwohl alle diese Doppelstrang-Liganden die ATPase-Funktion von RIG-I induzierten, stimulierte nur 5'-Triphosphat-RNA 2.2 (IVT) die zelluläre Interferonausschüttung (siehe Abb. 3.1 A). Die ATPase-Aktivität ist also eine notwendige, aber keine hinreichende Voraussetzung für die RIG-I-Aktivierung.

3.3.4 *In vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA aktiviert RIG-I ATP-Hydrolyse unabhängig vom 5'-Triphosphat

Um die Abhängigkeit der ATPase-Funktion von der 5'-Triphosphatgruppe zu untersuchen, wurde *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA 2.2 mit dem Enzym CIAP dephosphoryliert und auf die immunstimulatorische Kapazität in primären humanen Monozyten und die Induktion der ATPase-Funktion in rekombinantem RIG-I untersucht.

Wie in Abbildung 3.13 A gezeigt, verlor CIAP-behandelte Einzelstrang-RNA-*sense* 2.2 (IVT) ihre immunstimulatorische Aktivität in Monozyten. Daher war von einer effizienten Dephosphorylierung der IVT-RNA auszugehen. Interessanterweise konnte diese IVT-RNA nach Verlust der 5'-Triphosphatgruppe jedoch weiterhin die RIG-I ATPase-Aktivität

induzieren (siehe Abb. 3.13 B). Diese Beobachtung steht im absoluten Gegensatz zu den Ergebnissen aus Abbildung 3.12. Diese zeigen, dass eine Einzelstrang-RNA mit 5'-Hydroxy- oder 5'-Monophosphatgruppe keine RIG-I ATP-Hydrolyse bewirkt. Als Kontrolle diente 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 (IVT), welche mit hitzeinaktivierter CIAP behandelt wurde und sich in den Versuchen wie unbehandelte IVT-RNA verhielt (siehe Abb. 3.13 A und B).

Diese Ergebnisse bestätigten die Bedeutung der 5'-Triphosphatgruppe für die Aktivierung des Rezeptors RIG-I. Gleichzeitig wies das Ergebnis darauf hin, dass enzymatisch generierte 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 (IVT) ein weiteres molekulares Charakteristikum besaß, das RIG-I ATP-Hydrolyse aktivierte und in den synthetischen Einzelstrang-Versionen von RNA-Oligonukleotiden 2.2 fehlte.

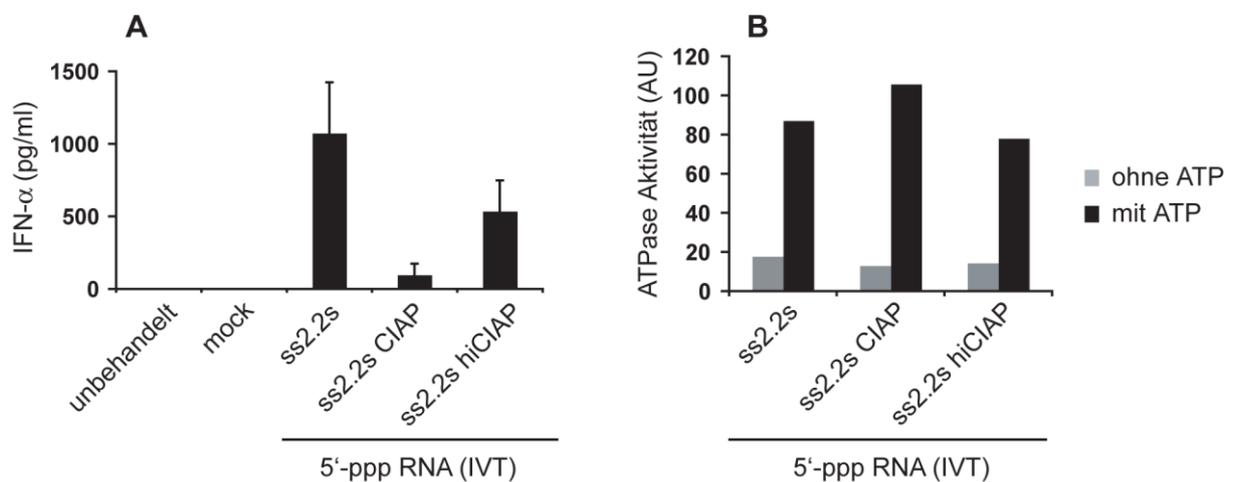


Abb. 3.13 *In vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA induziert RIG-I ATPase-Aktivität unabhängig vom 5'-Ende. (A) Primäre humane Monozyten wurden mit unbehandelter und CIAP-behandelter 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 (IVT, ss2.2s) stimuliert und nach 36 Stunden mit ELISA IFN- α im Überstand gemessen. IVT-RNA (ss2.2s) behandelt mit hitzeinaktiviertem CIAP-Enzym (hiCIAP) wurde als Kontrolle verwendet. RNA wurde jeweils mit CIAP bzw. hiCIAP für drei Stunden bei 37° C dephosphoryliert. Hitzeinaktivierung des Enzyms geschah bei 65° C für 15 Minuten. (B) Das Fluoreszenzsignal des ATPase-Assays wurde zwei Stunden nach Inkubation von Vollängen-RIG-I mit den RNA-Oligonukleotiden aus (A) bestimmt.

3.4. Die virale T7-Polymerase erzeugt *Copy-back*-RNAs als verlängerte Nebenprodukte

3.4.1 *In vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNAs enthalten unerwartete Nebenprodukte

Ausgehend von den in Abschnitt 3.3 beschriebenen Befunden wurde nun der Frage nachgegangen, warum sich *in vitro* transkribierte RNA-Liganden anders als erwartet verhalten. Um eine Antwort darauf zu finden, wurden die Produkte der chemischen RNA-Synthese und der *in-vitro*-Transkription in einem Polyacrylamid-Gel analysiert. Bei der Auftrennung der Nukleinsäuren im PAA-Gel wurden denaturierende Bedingungen gewählt, um die Bildung von Sekundärstrukturen zu verhindern (siehe Material und Methoden 2.3.7).

Trennt man chemisch synthetisierte 5'-OH-Einzel- und Doppelstrang-RNA 2.2 in einem PAA-Gel unter denaturierenden Bedingungen auf, so erhält man RNA-Banden auf der erwarteten Höhe von 19 Basen (siehe Bande 3, 5 und 7 in Abb. 3.14). Die *in vitro* transkribierten Versionen der RNA 2.2 enthielten jedoch, neben den jeweils erwarteten IVT-RNA Banden, große Mengen von Nebenprodukten, die wesentlich länger waren, als die erwartete RNA von 19 Nukleotiden (siehe Bande 2, 4 und 6 in Abb. 3.14). Die Intensitäten der erwarteten Banden von *in vitro* transkribierter *Sense*-, *Antisense*- und Doppelstrang-RNA 2.2 unterschieden sich.

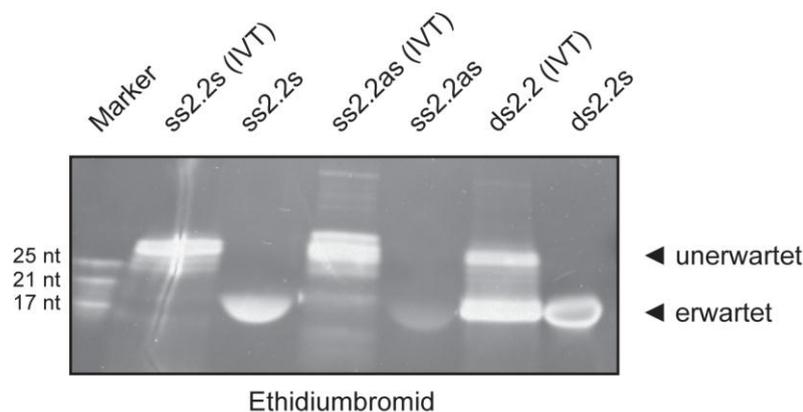


Abb. 3.14 *In vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA 2.2 enthält längere RNA-Oligonukleotide als Nebenprodukte. Chemisch synthetisierte 5'-OH- und *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-Einzel- (ss2.2s und ss2.2as) bzw. Doppelstrang- (ds2.2) RNA 2.2 wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem Harnstoff-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. RNA-Proben wurden vor dem Auftragen für 5 Minuten auf 95° C erhitzt und die Temperatur des Laufpuffers konstant über 65° C gehalten. RNA-Banden wurden im Gel nach Ethidiumbromid-Färbung mit UV-Licht sichtbar gemacht.

3.4.2 Lange Nebenprodukte der *in-vitro*-Transkription aktivieren RIG-I

Die virale T7-Phagenpolymerase wird häufig für die *in-vitro*-Transkription von RNA verwendet. Sie arbeitet als DNA-abhängige RNA-Polymerase. Zusätzlich zu dieser Funktion kann sie jedoch auch als RNA-abhängige RNA-Polymerase funktionieren, wenn die erzeugte RNA eine gewisse Selbst-Komplementarität am 3'-Ende aufweist [74, 75]. Durch das Umbiegen des 3'-Endes im Sinne einer Haarnadelkurve kann die T7-Polymerase hier ansetzen und in einem zweiten Schritt den RNA-Strang als Matrize benutzen, um ihn am 3'-Ende zu verlängern. Dies führt zu einer *Template*-unabhängigen Bildung von Basen-gepaarten Abschnitten in der IVT-RNA (siehe Abb. 3.15 C). Genau dieser *Copy-back*-Mechanismus wurde für virale Polymerasen während der Virusreplikation beschrieben [76]. Da das benötigte Maß von Selbst-Komplementarität äußerst gering sein kann, findet dieses Phänomen bei der *in-vitro*-Transkription häufig statt [75].

Im folgenden Versuch wurde ein von Nacheva et al. beschriebener Satz von *templates* für die *in-vitro*-Transkription von 5'-Triphosphat-RNAs verwendet [75]. Die Autoren charakterisierten die *templates* hinsichtlich der Eigenschaft verlängerte Nebenprodukte zu bilden. Laut dieser Veröffentlichung erzeugten Typ-A-*templates* ausschließlich das erwartete RNA-Produkt, Typ-B1.1-*templates* bis zu 2 % verlängerte Nebenprodukte und Typ-B2.1-*templates* erzeugten bis zu 90 % verlängerte Nebenprodukte. Es war zu sehen, dass nur IVT-RNAs, die eine große Menge unerwarteter verlängerter Nebenprodukte enthielten, potente Stimulatoren einer antiviralen Interferonantwort in primären humanen Monozyten waren (siehe Abb. 3.15 A). RNAs von *templates*, welche auf die Erzeugung des erwarteten Produkts optimiert waren, vermochten kein Interferon zu induzieren. Die Produkte der *in-vitro*-Transkription wurden hinsichtlich des Vorhandenseins der RNA sowie ihrer verlängerten Nebenprodukte in einem denaturierenden PAA-Gel überprüft (siehe Abb. 3.15 B).

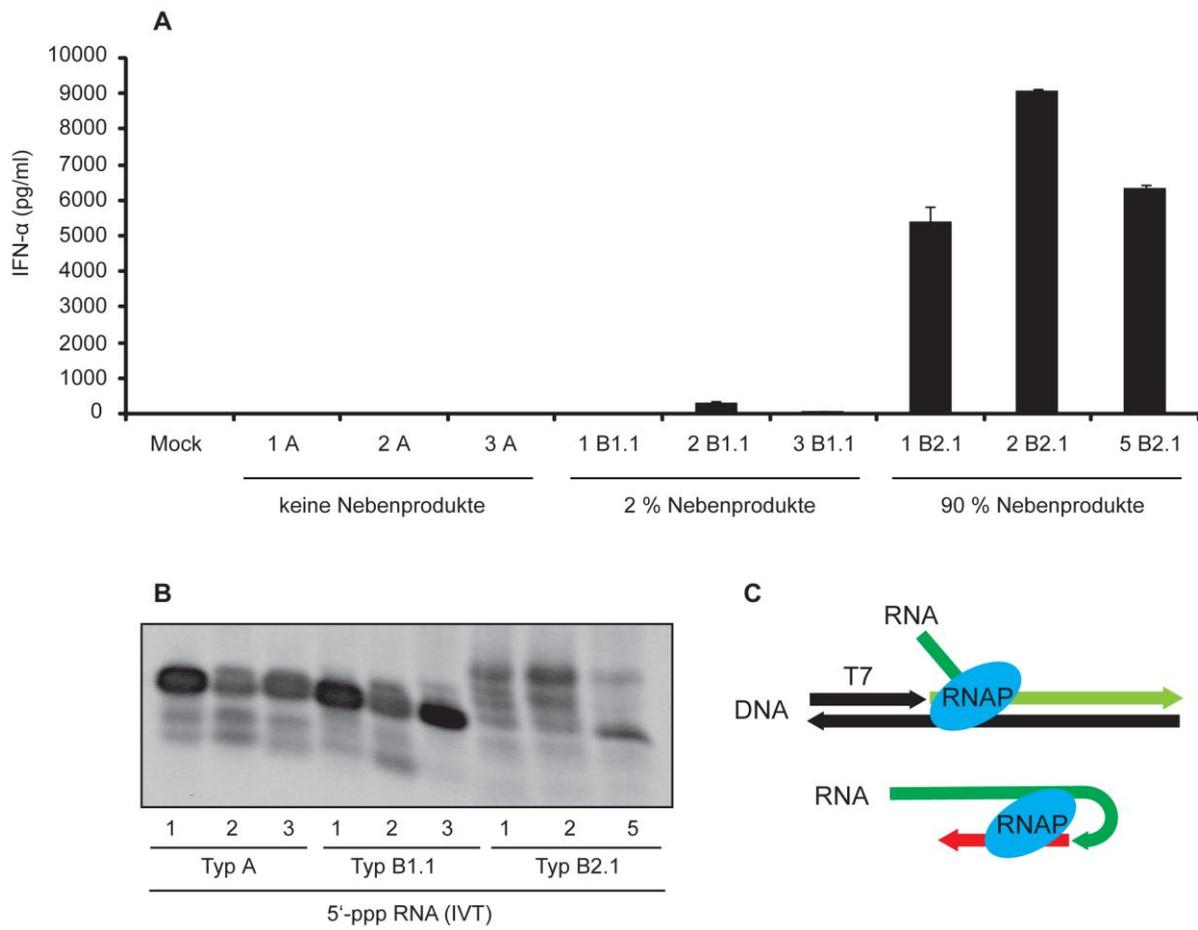


Abb. 3.15 *In vitro* transkribierte RNAs mit selbst-komplementären Strukturen sind potente Interferoninduktoren. (A) Humane Monozyten wurden mit verschiedenen 5'-Triphosphat-RNAs (IVT) transfiziert und 36 Stunden nach Stimulation IFN- α im Überstand mit ELISA bestimmt. Nach der Veröffentlichung von Nacheva et al. werden diese 17 Nukleotide langen RNAs aufgrund ihrer *templates* in drei Gruppen eingeteilt: Typ-A-*templates* (RNA 1-3) erzeugen nur das erwartete Produkt; Typ-B1.1-*templates* (RNA 1-3) erzeugen 2 % verlängerte Nebenprodukte; Typ-B2.1-*templates* (1, 2 und 5) erzeugen bis zu 90 % verlängerte Nebenprodukte (für Sequenzen und *templates* siehe Tabelle 1 und 3). (B) Analyse der RNAs aus A in einem denaturierenden PAA-Gel. (C) Modell des *Copy-back*-Mechanismus von viraler T7-Phagenpolymerase bzw. RNA-Polymerase, RNAP.

3.5 Synthetische 5'-Triphosphat RNA als definierter RIG-I-Ligand

Aus den Daten der vorangegangenen Experimente wurde zu diesem Zeitpunkt gefolgert, dass die RIG-I-vermittelte immunstimulatorische Aktivität von 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA (IVT) auf verlängerten RNA-Nebenprodukten beruhte, die Doppelstrang-Strukturen ausbildeten und somit die ATP-Hydrolyse des Rezeptors induzieren konnten.

3.5.1 5'-Triphosphat RNA benötigt Basen-gepaarte Abschnitte zur Aktivierung einer RIG-I-vermittelten Interferonantwort

Um den Beitrag der 5'-Triphosphatgruppe und der Doppelsträngigkeit von Liganden bei der RIG-I-Aktivierung klar voneinander abzugrenzen, bediente man sich nun chemisch synthetisierter 5'-Triphosphat-RNA 2.2 (Syn). Die nicht-enzymatische und damit chemische Synthese von RNA mit einer Triphosphatgruppe am 5'-Ende war bis zu diesem Zeitpunkt, aufgrund der schwierigen chemischen Synthese, eine nicht-überwundene Herausforderung und eine solche RNA war nicht verfügbar gewesen.

In Übereinstimmung mit den Vordaten führte die Stimulation von primären humanen Monozyten mit synthetisch hergestellter 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 nicht zur Ausschüttung von IFN- α (siehe Abb. 3.16 A). Bildete man aus dieser RNA und dem komplementären 5'-OH-*antisense*-Strang einen Doppelstrang, so war eine Interferonantwort messbar. Die Transfektion des Doppelstrangs führte zur Bildung einer vergleichbaren Menge von IFN- α wie die Transfektion der *in vitro* transkribierten Version von 5'-Triphosphat-RNA 2.2. Dieses Ergebnis impliziert, dass der Doppelstrang notwendig, aber erst zusammen mit einer 5'-Triphosphatgruppe für die Aktivierung des Rezeptors RIG-I ausreichend ist. Die vorhandene Haarnadelkurve von IVT-RNA, wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, ist für eine RIG-I-Aktivierung entbehrlich. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich, dass ausschließlich RIG-I-Liganden mit Basen-gepaarten Abschnitten die ATPase-Aktivität im Rezeptor induzierten. Nach Inkubation von rekombinantem RIG-I mit chemisch synthetisierter 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 konnte keine ATP-Hydrolyse nachgewiesen werden. Die unterschiedliche Aktivität von 5'-Triphosphat Einzel- und Doppelstrang RNA 2.2 (Syn) war nicht bedingt durch RNA-Abbau oder eine höhere Stabilität von Basenpaarungen in Doppelstrang-Molekülen. Die verwendeten RNAs waren im PAA-Gel stets in gleicher Intensität nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Diese Daten beweisen, dass die 5'-Triphosphatgruppe nicht ausreichend ist für eine RNA-induzierte RIG-I-Aktivierung und alleine keine ATPase-Aktivität auslöst.

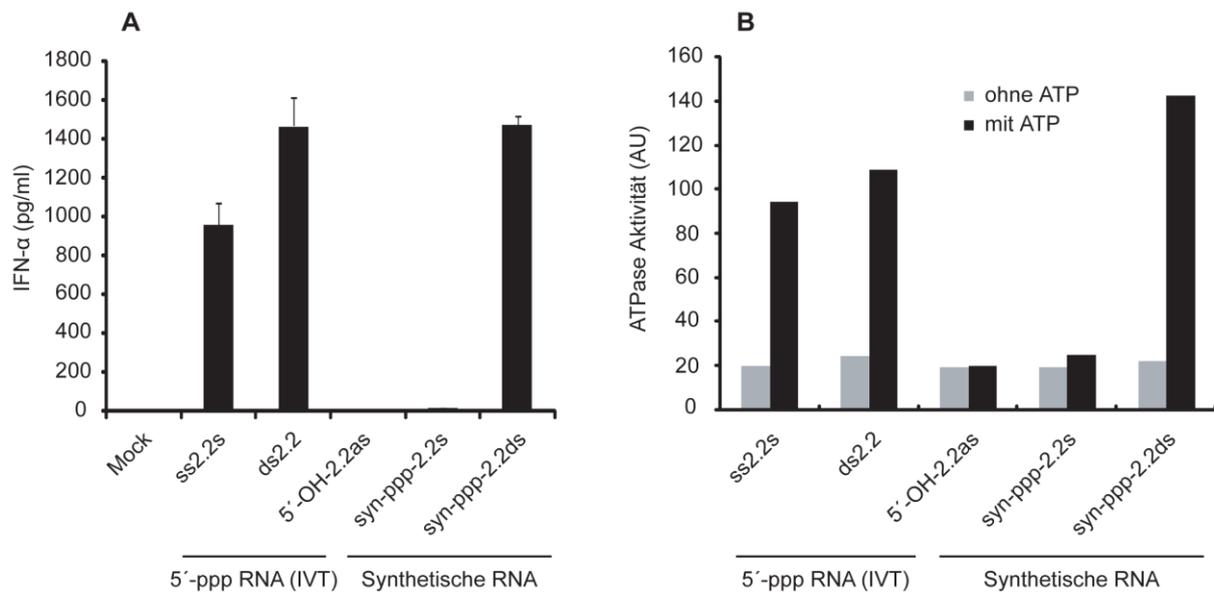


Abb. 3.16 Aktive RIG-I-Liganden benötigen Doppelstrang-Motive und eine 5'-Triphosphatgruppe. (A) Chemisch synthetisierte 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 (syn-ppp-2.2s) und der komplementäre 5'-OH-*antisense*-Strang (5'-OH-2.2as) wurden entweder allein oder nach Hybridisierung (syn-ppp-2.2ds) in humane Monozyten transfiziert. IFN- α Ausschüttung wurde 36 Stunden nach Stimulation mittels ELISA bewertet. Als Positivkontrolle diente *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-Einzel- und Doppelstrang-RNA (ss2.2s und ds2.2). (B) Der ATPase-Assay wurde mit den RNA-Oligonukleotiden aus (A) und rekombinatem Vollängen-RIG-I durchgeführt. Das Fluoreszenz-signal des ATPase-Assays wurde nach zwei Stunden bestimmt.

3.5.2 RIG-I-Liganden benötigen eine freie 5'-Triphosphatgruppe

Um die Strukturmerkmale des Liganden für eine RIG-I-Aktivierung genauer zu definieren, wurde die räumliche Beziehung des 5'-Triphosphatendes zum RNA-Doppelstrang bestimmt. Synthetische 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA 2.2 mit einem Überhang von einer oder drei Basen in direkter Nachbarschaft zur Triphosphatgruppe am 5'-Ende verlor die immunstimulatorische Kapazität in primären humanen Monozyten (siehe Abb. 3.17 A). Ein Mischhybrid aus 5'-Triphosphat-RNA-sense 2.2 (Syn) und DNA-Gegenstrang besaß in humanen Monozyten ebenso keine immunstimulatorische Aktivität. Unabhängig von dem Verlust der immunologischen Aktivität konnten alle erzeugten Doppelstränge die isolierte ATPase-Funktion von RIG-I stimulieren (siehe Abb. 3.17 B).

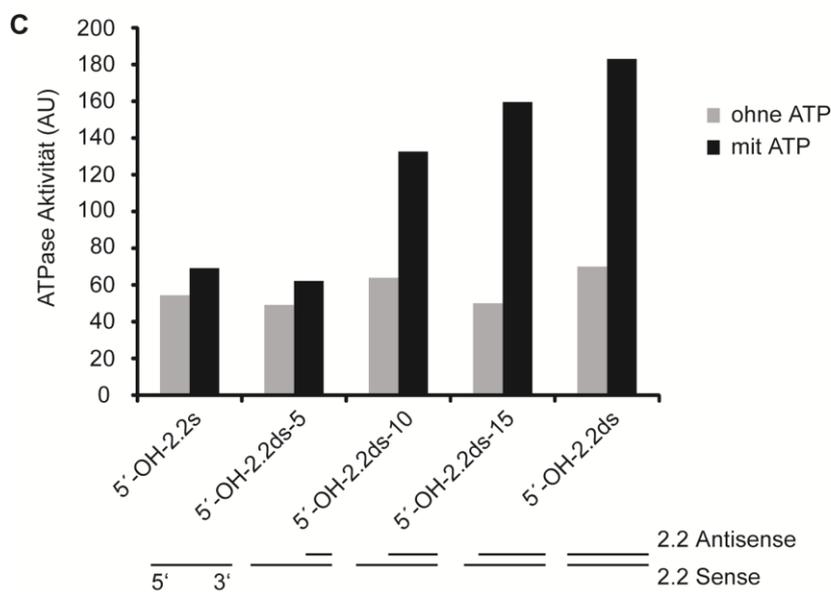
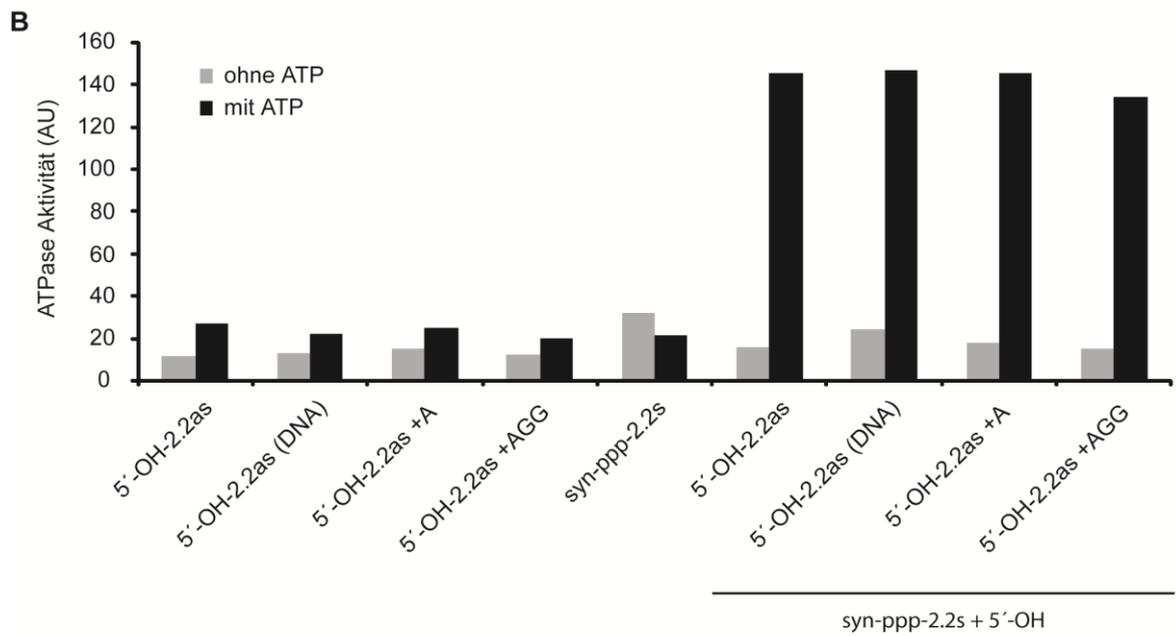
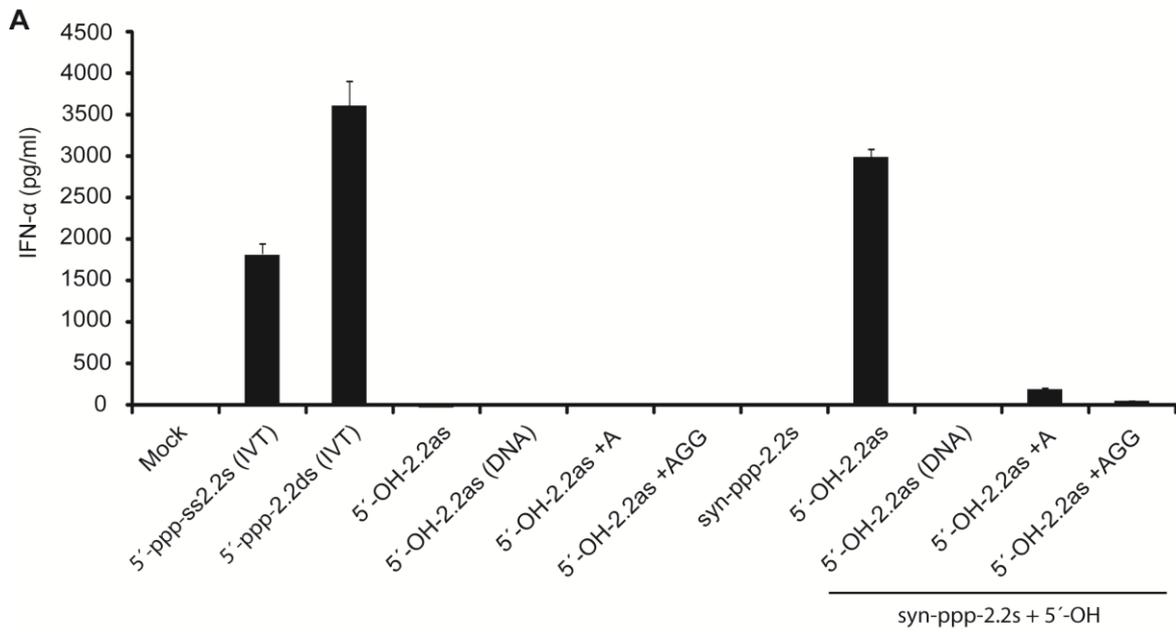


Abb. 3.17 RIG-I-Liganden benötigen ein freies 5'-Triphosphat und einen Doppelstrang-Bereich mit mehr als fünf Basenpaaren. (A) Humane Monozyten wurden mit Doppelstrang-Konstrukten aus synthetischer 5'-Triphosphat-RNA-sense 2.2 und jeweils unterschiedlichen Gegensträngen transfiziert. Als *Antisense*-RNA wurde der ideale Gegenstrang (5'-OH-2.2as), der Gegenstrang mit Desoxyriboserrückgrat (5'-OH-2.2as, DNA) und Gegenstränge mit einer oder drei Basen Überhang in direkter Nachbarschaft zum 5'-Triphosphatende des *Sense*-Strangs (5'-OH-2.2as +A bzw. +AGG) gewählt. IFN- α wurde nach 36 Stunden im Überstand mit einem ELISA gemessen. (B) RNA-Oligonukleotide aus (A) wurden im ATPase-Assay mit rekombinantem Vollängen-RIG-I untersucht. Gebildetes ADP wurde als Fluoreszenzsignal nach zwei Stunden im *ADP Quest* Assay nachgewiesen. (C) Synthetische 5'-OH-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 (5'-OH-2.2s) wurde mit unterschiedlich langer *Antisense*-RNA (5'-OH-2.2as-5, -10, -15) zu Doppelsträngen hybridisiert (siehe Piktogramme) und im ADP-Assay untersucht.

Die bisher untersuchten synthetischen Doppelstränge hatten 19 gepaarte Basen. Welche minimale Doppelsträngigkeit für die Aktivierung der RIG-I ATP-Hydrolyse notwendig ist, wurde mit folgendem Versuch geklärt: 5'-OH-Einzelstrang-RNA-sense 2.2 wurde mit *Antisense*-Strang RNA der Länge 5, 10, 15 und 19 Basen zu einem partiellen bzw. vollständigen Doppelstrang zusammengefügt. Die Sequenzen des *Antisense*-Strangs wurden so gewählt, dass die RNA vom 3'-Ende des *Sense*-Strangs her ihre Doppelsträngigkeit erhielt. Aus Abbildung 3.17 C war zu entnehmen, dass eine Basenpaarung von mehr als fünf Nukleotiden die RIG-I ATPase-Funktion aktiviert und es parallel mit steigender Zahl gepaarter Basen zu einem Anstieg der gemessenen ADP-Menge kommt.

4. Diskussion

4.1 Übersicht über die experimentellen Befunde

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit definieren die molekularen Strukturen des PAMP von RIG-I, das eine antivirale Immunantwort in Zellen auslöst. Durch Untersuchung verschiedener RIG-I-Liganden hinsichtlich ihrer differenziellen Eigenschaften Interferon zu induzieren, den Rezeptor zu binden und die RIG-I ATPase-Funktion zu aktivieren, konnte, zusammen mit dem bis dahin nicht verfügbaren Liganden, chemisch synthetisierte 5'-Triphosphat RNA, das PAMP von RIG-I exakt beschrieben werden. Es ist definiert als die Kombination von zwei essentiellen Strukturmerkmalen, eine 5'-Triphosphatgruppe in relativer Nähe zu Basen-gepaarten RNA-Abschnitten.

Im ersten Teil der Ergebnisse wurde gezeigt, dass *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA eine antivirale Interferonantwort in humanen Monozyten, HEK293- und 1205LU-Zellen induziert. Die Immunstimulation mit IVT-RNA wird über den zytoplasmatischen Rezeptor RIG-I vermittelt und ist abhängig von der 5'-Triphosphatgruppe der RNA, die bei der enzymatischen Herstellung mit der viralen T7-Polymerase entsteht. Eine Abhängigkeit der Immunantwort von der RNA-Sequenz wurde nicht gesehen. Chemisch synthetisierte RNA mit einer 5'-OH- oder 5'-Monophosphatgruppe fördert keine Interferonausschüttung.

Obwohl nur 5'-Triphosphat-RNA (IVT) die Auslösung eines Interferonsignals bewirkt, bindet auch chemisch synthetisierte 5'-OH- und 5'-Monophosphat-Doppelstrang-RNA an RIG-I. Die korrespondierenden Einzelstränge besitzen diese Eigenschaft jedoch nicht. Die Bindung von 5'-Triphosphat-RNA (IVT) wurde auf die Helikase-Domäne und die C-terminale Domäne von RIG-I spezifiziert.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurde gesehen, dass die RIG-I-vermittelte Interferoninduktion von der aktiven ATP-Hydrolyse des Rezeptors abhängt. Betrachtet man isoliert die ATPase-Funktion von RIG-I in zellfreien *in-vitro*-Versuchen, so beobachtet man, dass alle Liganden, die RIG-I binden (synthetische Doppelstrang-RNA und *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA) auch die ATPase-Funktion des Rezeptors aktivieren. Einen Widerspruch ergab der Befund, dass chemisch synthetisierte 5'-OH- oder 5'-Monophosphat-Einzelstrang-RNA die ATPase-Funktion von RIG-I nicht aktivierten, wohingegen durch *in-vitro*-Transkription generierte 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA dies weiterhin tat, auch wenn sie durch Dephosphorylierung ihre 5'-Triphosphatgruppe verloren hatte.

Die Diskrepanz der Ergebnisse führte zur Untersuchung der RNA-Produkte aus *in-vitro*-Transkriptionen. Mittels denaturierender RNA-Gele wurden längere RNA-Nebenprodukte in IVT-Präparationen entdeckt, die letztlich für die RIG-I-Aktivierung verantwortlich sind. Diese

Nebenprodukte entstehen durch einen *Copy-back*-Mechanismus der T7-Polymerase, der unabhängig vom *template* der RNA, das 3'-Ende um selbst-komplementäre Basen verlängert.

Im abschließenden Teil der Arbeit fand eine bis dahin nicht verfügbare, synthetisch hergestellte und folglich definierte 5'-Triphosphat RNA Verwendung. Mit ihrer Hilfe konnte gezeigt werden, dass die 5'-Triphosphatgruppe in synthetischer Einzelstrang-RNA den RIG-I PAMP nicht vollständig darstellt. Erst die Einführung von Basen-gepaarten Abschnitten mit fünf bis zehn Nukleotiden in direkter Nähe zu einer freien 5'-Triphosphatgruppe vervollständigt den PAMP von RIG-I.

Parallel zu dieser Arbeit wurden in unserer Arbeitsgruppe thematisch verwandte Ergebnisse von Herrn Wolfgang Hamm erworben. Die Daten wurden in einer gemeinsamen Arbeit veröffentlicht (Schmidt et al, 2009, *5'-Triphosphate RNA requires base-paired structures to activate signaling via RIG-I*) [77]. Die hier vorliegenden Ergebnisse zu dem zweiteiligen RIG-I PAMP wurden in den Experimenten von Herrn Hamm um folgende Erkenntnisse erweitert:

In vitro transkribierte RNA wurde in denaturierenden Gelen aufgetrennt und die einzelnen Banden isoliert. Stimulierte man mit diesen RNAs humanen Monozyten, so waren ausschließlich die längeren RNA-Nebenprodukte aus den nicht-erwarteten RNA-Banden immunstimulatorisch aktiv. Um zu beweisen, dass diese längeren RNA-Oligonukleotide selbst-komplementäre Strukturen enthalten, die die geforderte Doppelsträngigkeit in RIG-I-Liganden einführen, wurden die Klone einer cDNA Bibliothek von re-isolierter RNA aus den erwarteten bzw. nicht-erwarteten Banden sequenziert. Das Ergebnis der erwarteten RNA-Bande lieferte die exakte Sequenz, die durch das DNA-*template* kodiert war. Die Sequenzen von RNA aus den nicht-erwarteten Banden wiesen jedoch Verlängerungen ihres 3'-Endes auf, welche komplementär zur *Template*-kodierten RNA-Sequenz waren. Damit konnten die RNAs Sekundärstrukturen im Sinne einer Haarnadel ausbilden. Versuche mit synthetischer 5'-Triphosphat RNA ergaben, dass die reine Kurve der Haarnadelstruktur für eine RIG-I-Aktivierung entbehrlich ist, wenn der RIG-I-Ligand fünf bis zehn Basenpaare enthält. Experimente mit langer Doppelstrang-RNA mit 70 Basen zeigten, dass das zweiteilige RIG-I PAMP nicht nur für kurze RNA-Liganden mit weniger als 20 Nukleotiden galt. Dem zweiteiligen Erkennungsmotiv von RIG-I entsprechend wurde in detaillierten Bindungsstudien gezeigt, dass die C-terminale Domäne von RIG-I hauptsächlich mit dem 5'-Triphosphat interagiert, während die Helikase-Domäne stark mit den Doppelstrang-Bereichen von RIG-I-Liganden wechselwirkt.

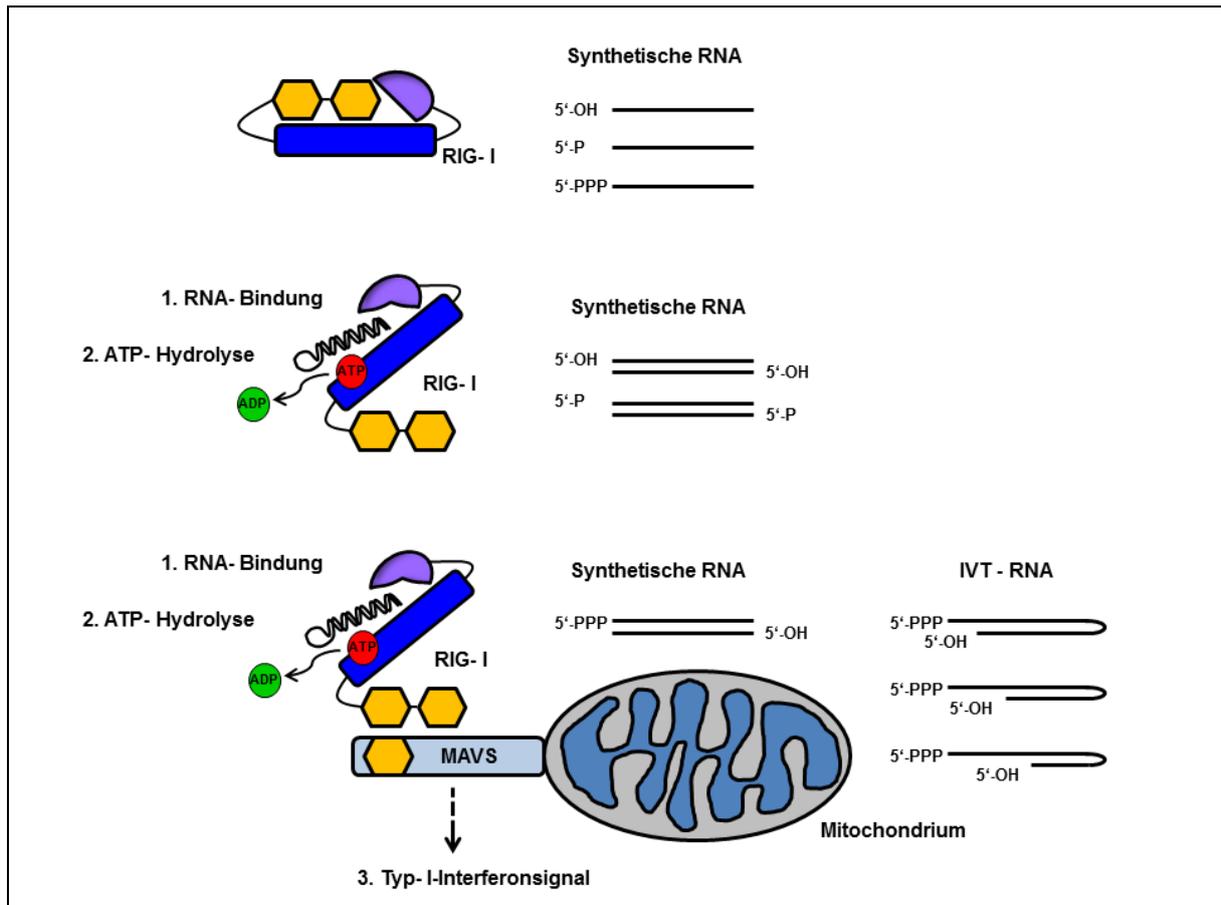


Abb. 4.1 Schematische Darstellung der experimentellen Befunde.

Tabelle 4.1 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse						
Typ	Modifikation	Name	Bindung	ATP-Hydrolyse	Interferonsignal	
Syn	5'-OH	ss2.2s / ss2.2as	-	-	-	
		ds2.2	+	+	-	
	5'-p	ss2.2s / ss2.2as	-	-	-	
		ds2.2	+	+	-	
IVT	5'-ppp	ss2.2s / ss2.2as	+	+	+	
		ds2.2	+	+	+	
Syn	5'-ppp	2.2s	- (nicht gezeigt)	-	-	
		ds2.2 (mit 5'-OH 2.2as)	+ (nicht gezeigt)	+	+	

4.2 Ergebnisinterpretation im Vergleich mit der Literatur

4.2.1 Der Ligand von RIG-I

Die Abwehr von Viren beruht auf der Fähigkeit des Organismus ein Pathogen als fremd zu erkennen. Während TLRs fremde RNA in Zellkompartimenten erkennen, in denen zelleigene RNA physiologisch nicht vorhanden ist (z. B. Endosom oder Zelloberfläche), müssen bei Vorhandensein reichlich zellulärer RNA im Zytosol andere Mechanismen für die Erkennung von Fremd-RNA durch den zytosolischen Rezeptor RIG-I existieren.

Erste Studien zu RIG-I-Liganden identifizierten die freie Triphosphatgruppe am 5'-Ende viraler RNA als essentielles Strukturmerkmal von RIG-I-Liganden, um den Rezeptor zu binden und eine zelluläre Interferonantwort auszulösen [34, 35]. Dieses Ergebnis ließ sich perfekt in das PAMP-Konzept integrieren, da – von wenigen Ausnahmen abgesehen – zelluläre Mechanismen im Nukleus verhindern, dass RNA mit einem 5'-Triphosphatrest im Zytoplasma einer eukaryotischen Zelle erscheint. In den beiden Publikationen wurde mit *in vitro* transkribierter RNA gearbeitet und Aussagen über Strukturmerkmale von RIG-I-Liganden und den Mechanismus der RIG-I-Aktivierung getroffen. Die Struktur der IVT-Produkte wurde jedoch in diesem Zusammenhang nicht exakt untersucht.

Die hier vorliegenden Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine 5'-Triphosphatgruppe viraler RNA allein nicht für eine RIG-I-Aktivierung ausreicht. Nur die Kombination von Basengepaarten RNA-Abschnitten in relativer Nähe zu einer freien 5'-Triphosphatgruppe bildet den vollständigen PAMP von RIG-I. Die Ergebnisse wurden in der Arbeit Schmidt et al. veröffentlicht und unabhängig von einer zweiten Arbeitsgruppe um Schlee et al. bestätigt [77, 78]. Beide Arbeiten bedienten sich der Hilfe von chemisch synthetisierter und damit definierter 5'-Triphosphat-RNA. Mit diesem definierten Liganden lassen sich die Effekte des Doppelstrangs von denen der 5'-Triphosphatgruppe eindeutig abgrenzen. Beide Arbeiten konnten zeigen, dass synthetische 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA RIG-I nicht stimuliert. Erst nach Hybridisierung mit dem komplementären Gegenstrang ist der Ligand aktiv. In Einklang mit dieser Erkenntnis wurde in beiden Studien herausgearbeitet, dass die T7-Polymerase bei der enzymatischen Herstellung der 5'-Triphosphat-RNA verlängerte Nebenprodukte bildet, die letztlich für die RIG-I-Aktivierung verantwortlich sind. Die Nebenprodukte entstehen durch den *Copy-back*-Mechanismus viraler Polymerasen. Durch diesen Mechanismus werden selbst-komplementäre Verlängerungen am 3'-Ende der RNA gebildet, die sich intramolekular im Sinne einer Haarnadelkurve zurückfalten können und die geforderten Bereiche von Doppelstrang-RNA in den RIG-I-Liganden erzeugen.

Obwohl beide Arbeiten in ihrer Kernaussage bezüglich des RIG-I PAMP übereinstimmen, gibt es im Hinblick auf die Länge und die Charakteristika der Doppelstrang-Region Unterschiede. Schlee et al. beobachteten mit ihrer synthetischen Modell-RNA mit einem

5'-Triphosphat und 24 Nukleotiden, dass für eine RIG-I-Stimulation mindestens 21 Basen gepaart sein müssen [78]. Bei unserem synthetischen Modellliganden ist zur RIG-I-Aktivierung ein Doppelstrang-Bereich von nur zehn Basenpaaren ausreichend [77]. Da bei der *in-vitro*-Transkription auch kurze Verlängerungen am 3'-Ende mit wenigen selbstkomplementären Basen entstehen, ist davon auszugehen, dass selbst Liganden mit weniger Basenpaaren aktiv sind (siehe Abb. 4.1). Nachdem in beiden Arbeiten die stimulatorische Aktivität der Liganden auf gleiche Weise mit der IFN- α Ausschüttung in primären humanen Monozyten beurteilt wurde, kann man diesen Unterschied eventuell auf die verschiedene Sequenz oder Länge der Modell-RNAs zurückführen. Die dargestellte Längendifferenz im Doppelstrang-Bereich wird besonders vor dem Hintergrund einer Arbeit von Myong et al. interessant [79]. Die Autoren zeigen in einer technisch aufwendigen Studie, dass rekombinantes RIG-I unter ATP-Verbrauch entlang einer immobilisierten Doppelstrang-RNA mit 25 Basen wandert. An einem Liganden mit 21 Basenpaaren ist diese Translokation sicherlich vorstellbar. Zehn oder weniger Basenpaare machen die Vorstellung, dass eine ausgedehnte Bewegung von RIG-I für die Auslösung des Interferonsignals notwendig ist zunehmend schwieriger.

Der zweite wesentliche Unterschied in beiden Arbeiten ist die Bedeutung von Überhangstrukturen am 5'- und 3'-Ende der RNA und die relative Position der Basen gepaarten Abschnitte zum 5'-Triphosphat. Beide Studien stimmen in dem Punkt überein, dass eine Verlängerung des komplementären 3'-Endes über das 5'-Triphosphat hinaus, zu einer Inhibierung des RIG-I-Signals führt. Wahrscheinlich interferieren die nicht gepaarten Basen mit der Erkennung der direkt benachbarten 5'-Triphosphatgruppe. Die Aussagen differieren jedoch bezüglich des Effektes einer sukzessiven Verkürzung des komplementären 3'-Endes. Während Schlee et al. einen Verlust der Interferonausschüttung beobachten, wenn das 3'-Ende um eine Base verkürzt wird und damit das 5'-Ende nicht gepaart ist, tolerieren die nur unvollständig gepaarten *Hairpin*-Liganden aus Schmidt et al. am 5'-Ende eine Strecke von mehreren ungepaarten Basen. Dieser Unterschied gewinnt deshalb an Bedeutung, da Schlee et al. mit ihrem RNA-Liganden, der dem 5'- und 3'-Ende des Genoms von Rabiesviren nachempfunden ist, die physiologische Relevanz von glatten Enden für den RIG-I PAMP betonen. Die Tatsache, dass Schlee et al. diese Aussage mit einem Liganden kontrollieren, der neben den ungepaarten bzw. *Mismatch*-Basen am 3'-Ende, eine zusätzliche Verlängerung des 3'-Endes enthält, das an sich eine RIG-I-Stimulation verhindert, verwundert. Die Frage, inwiefern ein glattes 5'-Ende für die Aktivierung von RIG-I bei physiologischen Liganden relevant ist, bleibt unbeantwortet.

In unserer Veröffentlichung zeigen wir, dass per se eine Doppelstrang-Konfiguration in physiologischen RIG-I-Liganden nötig ist, da ein Verdau von RNA aus VSV-infizierten Zellen

mit RNase III, welche spezifisch für Doppelstrang-RNA ist, zu einem Verlust des antiviralen Interferonsignals führt.

Wenn man auf die anfängliche Fragestellung der Arbeit zurückblickt, ob ein 5'-Triphosphat für die RIG-I-Stimulation notwendig, ausreichend oder sogar entbehrlich ist, so kann man zu diesem Punkt Folgendes sagen: Eine 5'-Triphosphatgruppe ist nicht ausreichend für die Aktivierung von RIG-I. Basen-gepaarte RNA-Bereiche leisten einen ebenso wichtigen Teil zum PAMP von RIG-I. Obwohl unser und andere Labore der Meinung sind, dass eine 5'-Triphosphatgruppe notwendig ist, kamen andere Forschergruppen zu differierenden Ergebnissen.

Nicht lange nach der Veröffentlichung des 5'-Triphosphates als relevante Struktur viraler RNA für die RIG-I-Erkennung, sorgte die Veröffentlichung von Malathi et al. für Aufsehen [37]. Die Autoren beobachteten, dass endogene RNA der Wirtszelle, welche durch aktivierte RNase L verdaut wurde, zu einer Interferonausschüttung führte. RNase L wird in Zellen nach viralem Befall über ein Zwischenprodukt der Oligoadenylat-Synthetase aktiviert und erzeugt aus zellulärer RNA 5'-OH- und 3'-Monophosphat-RNA mit einer Länge von weniger als 200 Basen [80]. Die Autoren postulierten, dass RIG-I direkt mit den Produkten der RNase L interagiert und dadurch aktiviert wird. In ihren *in-vitro*-Daten war zelluläre RNA nach Verdau mit RNase L effektiver in der Interferoninduktion als unbehandelte RNA. Die Stimulation war abhängig von Phosphatresten am 5'-Ende. Außerdem wurde eine Teilabhängigkeit von RIG-I und MDA-5 gezeigt. Jedoch muss einschränkend erwähnt werden, dass chemisch synthetisierte RNA mit einer 3'-Phosphatgruppe nicht untersucht wurde.

In Bezug auf synthetische 3'- und 5'-Monophosphat-RNA als aktive RIG-I-Liganden gab es eine Studie von Takahasi et al. [19]. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zeigten die Autoren um Takahasi, dass synthetische Doppelstrang-RNA unabhängig von 5'-Modifikationen an RIG-I bindet. Eine RIG-I-vermittelte Interferonantwort wurde aber nur mit Doppelstrang-Liganden beobachtet, die entweder ein 5'-Monophosphat an glatten RNA-Enden trugen oder aber ein 3'-Monophosphat in Kombination mit einem Überhang am 3'-Ende. Weder in den Versuchen unserer Arbeitsgruppe noch in den Daten von Schlee et al. war synthetische RNA mit einer 5'-Monophosphatgruppe und verschiedenen Doppelstrang-Konfigurationen ein aktiver Ligand von RIG-I [77, 78].

Im Kontrast zu diesen Daten veröffentlichten Kato et al., dass Modifikationen der RNA zur Aktivierung von RIG-I entbehrlich sind, solange der Ligand doppelsträngig und mit mehreren hundert Basenpaaren auch lang genug ist [38]. In ihrem Modell nutzten die Autoren das synthetische Doppelstrang-RNA-Analogon Poly I:C. Sie beobachteten, dass in Abhängigkeit der Länge von Poly I:C der Ligand entweder über den Rezeptor RIG-I oder MDA-5 erkannt wird. Überraschenderweise ist der Bereich, der von RIG-I und MDA-5 unterschieden wird,

relativ klein. MDA-5 erkennt Poly I:C mit einer relativen Größe von vier Kilobasen (Kb), während RIG-I von Poly I:C im Bereich von einer Kilobase stimuliert wird. Der molekulare Mechanismus, der es den zwei Rezeptoren erlaubt, den 4-kb Liganden von einem 1-kb Liganden zu unterscheiden, muss noch untersucht werden. Eine andere Arbeitsgruppe um Ranith-Kumar et al. sah eine differenzielle Erkennung von Poly I:C in einem wesentlich kürzeren Bereich [81]. Kato et al. zeigten weiterhin, dass chemisch synthetisierte Doppelstrang-RNA mit 70 Basen Länge, aber ohne 5'-Triphosphatmodifikation stimulatorisch aktiv ist. Verglichen mit den RIG-I-Liganden aus dieser und anderen Studien sind die IFN- β -Spiegel jedoch auffallend gering und das Ergebnis konnte in unserem Labor nicht reproduziert werden.

Ein Hinweis, wie RIG-I die Größe seines Liganden abtasten könnte, obwohl die Bindungsspalte von Helikasen der DExD/H Box Familie nur sechs bis sieben Basen umfasst, kommt aus einer technisch aufwendigen Studie von Myong et al. [79]. Sie beobachteten, dass rekombinantes RIG-I unter ATP-Verbrauch entlang einer immobilisierten Doppelstrang-RNA mit 25 Basen wandert. Interessanterweise war die Geschwindigkeit der Helikasen-Bewegung entlang der RNA bei Anwesenheit einer 5'-Triphosphatgruppe am RNA-Ende schneller. Es ist denkbar, dass der Translokationsmechanismus eine Längen-abhängige Erkennung durch RIG-I oder auch MDA-5 ermöglicht. Obwohl die Bewegung durch die Anwesenheit eines 5'-Triphosphats gefördert wird, sind die Konsequenzen der Bewegung des Rezeptors für den weiteren Ablauf des RIG-I-Signals völlig unklar. Da die Translokation und das RIG-I-Signal nur unter ATP-Verbrauch ablaufen, müssen in weiteren Versuchen RIG-I-Mutanten untersucht werden, die die ATP-Hydrolyse von der Translokationsbewegung abkoppeln. Bemerkenswerterweise sind RIG-I-Mutationen in verschiedenen Helikase-Domänen bereits ausgetestet worden und überraschenderweise waren einige dieser Mutanten konstitutiv aktive Proteine [82]. Leider wurde keines der Proteine in Bezug auf eine Translokationsbewegung untersucht.

Die Tatsache, dass die Aktivierung eines PRR durch die Sequenz der erkannten Nukleinsäure beeinflusst wird, ist von den TLR bekannt (z. B. TLR7) [68]. Eine Studie von Saito et al. weist darauf hin, dass die Basenzusammensetzung auch für die Aktivierung von RIG-I entscheidend ist. Die Autoren zeigen, dass im Falle einer Infektion mit Hepatitis-C-Viren die Uridin-reiche 3'-untranslatierte Region des HCV-Genoms als Ligand für RIG-I dient [39]. Nach ihren Daten stimulieren auch Homopolymere wie Poly(A), jedoch nicht Poly(G), ein Interferonsignal in Leberzelllinien. Inwiefern auch dieses durch RIG-I vermittelt ist, wurde nicht gezeigt. Abgesehen von dieser Publikation findet sich in der Literatur kein weiterer Hinweis auf eine echte Sequenzabhängigkeit der RIG-I-Aktivierung. Nur Schlee et al. konnte einen Einfluss der ersten Base, welche das 5'-Triphosphat trägt (C ist weniger aktiv als A, G oder U), zeigen [78]. Auch in den eigenen Ergebnissen wurde kein

Zusammenhang zwischen der Sequenz von RIG-I-Liganden und RIG-I-Aktivierung gesehen. Die Basen Adenosin und Uridin machten zusammen in dem verwendeten Ligand 2.2 weniger als 50 % aus und dennoch war die RNA ein guter Induktor der Interferonantwort. Daher kann man davon ausgehen, dass die von Saito et al. vorgestellten Sequenzmerkmale möglicherweise relevant für die Erkennung von Hepatitis-C-Viren und eventuell anderen Viren sind, jedoch kein allgemein gültiges PAMP von RIG-I.

4.2.2 Die strukturellen Mechanismen einer RIG-I-Aktivierung

Das Protein RIG-I besitzt drei funktionelle Domänen: die CARD-, die Helikase- und die C-terminale Domäne (CTD). Zahlreiche Veröffentlichungen der letzten Jahre beschäftigten sich mit der Struktur und Funktion der einzelnen Domänen. Interessanterweise wirken alle drei Domänen am Erkennungsprozess des RIG-I-Liganden, 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA, mit.

Die N-terminalen CARD-Domänen wurden primär in der Funktion von Signaldomänen beschrieben. Cui et al. zeigen jedoch, dass ein RIG-I-Konstrukt ohne CARD-Domänen (Δ CARD-RIG-I) die Spezifität für 5'-Triphosphat-RNA verliert [18]. Δ CARD-RIG-I wird im Vergleich zu Vollängen-RIG-I effektiver von nicht-phosphorylierter Doppelstrang-RNA stimuliert. Dieses Ergebnis impliziert, dass die CARD-Domänen die Bindungsstelle für Doppelstrang-RNA verlegen und damit blockieren. Die eigentliche Bindung des Liganden findet an der Helikase-Domäne und der CTD statt [18]. Letztere wird auch als Regulatorische Domäne (RD) bezeichnet. Obwohl alle RDs der RLR strukturhomolog sind und Doppelstrang-RNA binden können, erkennt ausschließlich die RIG-I RD das 5'-Triphosphat. Strukturanalysen von RIG-I RD mit den gebundenen Liganden 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA oder 5'-OH-Doppelstrang-RNA mit glatten Enden sind nun verfügbar [83, 84, 85]. Sie zeigen, dass die Interaktion von RIG-I RD lediglich mit den letzten zwei Basen des 5'-Endes und kaum mit dem 3'-Ende stattfindet. Eine zentrale Bindungsstelle der RD fasst dabei das 5'-Ende der RNA und eine zusätzliche Proteinschleife ist verantwortlich für die Spezifität in der Erkennung der 5'-Triphosphatgruppe. Um mit den negativen Ladungen der Triphosphatgruppe zu interagieren, enthält die Schleife zahlreiche positiv geladene Aminosäuren [83].

Saito et al. machten die interessante Beobachtung, dass RIG-I in ruhenden Zellen als Monomer vorliegt. Nach einer Virusinfektion bildet RIG-I multimere Proteinkomplexe aus. Dabei ist unklar, ob dieser Komplex das Ergebnis zufälliger Ko-Lokalisierung von zellulären Proteinen an viraler RNA ist oder aber ein geordneter antiviraler Zellmechanismus [20]. Aus *in-vitro*-Versuchen ist bekannt, dass RIG-I in Gegenwart von Doppelstrang-RNA, mit oder ohne 5'-Triphosphat, stabile Dimere ausbildet [18, 81]. Die Ausbildung der Dimere findet

unabhängig von den CARD-Domänen statt [18]. Von besonderem Interesse in diesem Zusammenhang ist, dass auch andere RLR während der Ligandenbindung und Signalauslösung dimerisieren [42, 86, 87]. Die Liganden-induzierte Bildung von Rezeptoren-Clustern, gefolgt von der Aktivierung weiterer Effektoren bzw. Signalmolekülen, könnte einen allgemeinen Mechanismus im Signalstoffwechsel von RLR darstellen.

Obwohl die Dimerisierung von RIG-I ein entscheidender Schritt in der Aktivierung der Signalkaskade ist, benötigt dieser Prozess kein ATP [18]. Die Frage, warum die RIG-I-Stimulation aber die Hydrolyse von ATP voraussetzt, bleibt unklar. Ganz allgemein gesprochen besitzen DExD/H Box RNA-Helikasen konservierte Motive, um Nukleinsäuren und ATP zu binden. Bindung und Hydrolyse von ATP induziert dann eine Änderung der Stellung zweier Nukleinsäuren-bindenden Motive zueinander und führt somit zu einer dynamischen Bewegung in der Interaktion zwischen Helikase und Liganden. Je nach biochemischem Kontext kann dies zu einem gerichteten Transport, dem Entwinden oder dem Greifen des Nukleinsäuren-Liganden führen. In Bezug auf RIG-I ist es einerseits vorstellbar, dass die ATPase-Aktivität des Rezeptors zur hohen Spezifität der PAMP-Erkennung beiträgt, die RIG-I im äußerst RNA-reichen Zytoplasma benötigt. Die isolierte Helikase-Domäne von RIG-I wird entsprechend nur durch Doppelstrang-RNA stimuliert, die bei der Replikation von Viren im Zytoplasma entsteht [18]. Andererseits ist auch das Entwinden von doppelsträngiger RNA durch RIG-I denkbar. Obwohl Takahasi et al. das Entwinden der RNA *in vitro* beobachteten, zeigten Myong et al. in ihren Versuchen mit einzelnen RIG-I-Molekülen, dass RIG-I eher als Translokase entlang der RNA wandert, als diese zu entwinden. Interessanterweise bewegt sich Vollängen-RIG-I wesentlich langsamer als ein Konstrukt ohne die CARD-Domänen. Diese Tatsache bestätigt die inhibierende Funktion der CARDS (siehe oben). Erst nach Kontakt mit der „fremden“ 5'-Triphosphatgruppe wird diese Blockade aufgehoben.

Durch das Zusammenspiel von RIG-I RD- und Helikase-Domäne werden die zwei strukturellen Merkmale des RIG-I PAMP erfasst. Beide PAMP-Motive finden sich in der RNA replizierender Viren. Initial wird die Erkennung des Virus durch die 5'-Triphosphatgruppe eingeleitet. RIG-I bildet daraufhin Dimere aus, die an dem benachbarten Doppelstrang-RNA Abschnitt entlang wandern. Diese Bewegung führt zur Exposition der CARD-Domänen, die nun die weitere Signalkaskade auslöst. Die Stärke des Signals könnte dabei von der Zeit der Rezeptortranslokation und damit direkt von der Länge des Liganden beeinflusst werden. Mit diesem Modell kann man erklären, wie RIG-I und MDA-5 zwischen Liganden verschiedener Länge differenzieren. Andererseits hat man in dieser Arbeit gezeigt, dass auch kürzere Liganden RIG-I sehr effektiv stimulieren. Aufgrund der wenigen Basenpaare wäre hier nur eine lokal begrenzte RIG-I-Bewegung denkbar. Wir gehen aktuell von einem Modell aus, indem bereits die Translokation um wenige Basen die CARD-Domänen in eine aktive

Konformation bringt. Bei diesem mechanistischen Modell wäre auch vorstellbar, dass die lokale Translokation eine *Proofreading*-Funktion des Rezeptors darstellt. Durch lokale Bewegungen wird das 5'-Triphosphat repetitiv gebunden und eine verfrühte Signalaktivierung verhindert. Neben einem Beitrag zur spezifischen Erkennung der Liganden kann die Translokation von RIG-I aber auch einen unmittelbaren antiviralen Mechanismus darstellen. Durch die Bewegung von RIG-I entlang ihres Liganden werden virale Proteine aus ihrer Bindung an die genomische RNA verdrängt und damit interferiert RIG-I aktiv mit der viralen Replikation.

4.3 Vergleich mit natürlichen Liganden

Obwohl in der Zwischenzeit viele Erkenntnisse aus *in-vitro*-Studien zu dem PAMP von RIG-I gewonnen wurden, besteht wenig Einigkeit darüber, welche Form der RNA in Virus-infizierten Zellen tatsächlich von RIG-I erkannt wird. In den zahlreichen zu diesem Thema veröffentlichten Studien reichen die Hypothesen von viraler genomischer RNA, Intermediärprodukten der Virusreplikation, RNA-Transkripten, viralen *Defective-interfering*- (DI)-Genomen bis hin zu durch RNase L verdauter endogener RNA.

In zwei kürzlich veröffentlichten Studien wurde dieser Frage nachgegangen. Die Autoren isolierten und analysierten die an RIG-I gebundene RNA aus Virus-infizierten Zellen. Rehwinkel et al. nutzte ein Expressionssystem mit dem segmentierten Genom von Influenzaviren und ein Modell mit Sendaivirus-infizierten Zellen. Mit technisch ausgefeilten Methoden (z. B. RNA Gel-Fraktionierung, Primer Extension, Northern Blot), konnten die Autoren belegen, dass die über RIG-I präzipitierte RNA den Genomsegmenten von Influenzaviren entsprach [88]. In Bezug auf Sendaivirus-Infektionen beobachteten die Autoren, dass ausschließlich RNA aus Sendaivirus-infizierten Zellen mit mehr als 300 Basen als RIG-I-Liganden aktiv war. Untersuchten sie mit PCR-Methoden die an RIG-I gebundene RNA, so entdeckten sie genomische RNA von Sendaiviren als RIG-I-Ligand. Aus diesen Daten schlossen die Autoren, dass der natürliche RIG-I-Ligand nicht transkribierte RNA oder Leader-RNA ist, sondern 5'-Triphosphat virale genomische RNA, die durch Virusreplikation entsteht. Obwohl Influenza- und Sendaiviren zur Familie der Negativ-Einzelstrang-RNA-Viren zählen, ist das nicht gleichbedeutend mit der Abwesenheit von Basen-gepaarten Abschnitten im viralen Genom. Influenzaviren besitzen komplementäre Sequenzen am 5'- und 3'-Ende ihrer Gensegmente und nehmen durch das Zusammenführen dieser Enden eine Sekundärstruktur im Sinne eines „Pfannenstiels“ ein. Dies führt zu Doppelstrang-Abschnitten in direkter Nähe zum 5'-Triphosphat und stimmt mit dem beschriebenen PAMP dieser Arbeit überein.

Ein ebenso ausgefeilter methodischer Ansatz wurde von Baum et al. verfolgt. Sie isolierten RNA gebunden an RIG-I aus Sendaivirus- oder Influenzavirus-infizierten Zellen und analysierten die Sequenz mit der *Deep-sequencing*-Methode. Die Autoren konnten zeigen, dass bei der Infektion mit Sendaiviren die relativ kurzen Genome von *Defective-interfering*-Partikeln (Typ *copy-back*) mit RIG-I assoziieren [89]. DI-Partikel sind defekte Nebenprodukte der viralen Replikation, die Deletionen in ihrem Genom enthalten. Das Ergebnis der Sequenzierung lässt sich gut mit der Veröffentlichung von Strahle et al. vereinbaren, dass der Gehalt an DI-Partikeln das immunstimulatorische Potential von kommerziell-erwerblichen Sendaivirus-Präparationen bestimmt [90]. Aufgrund des *Copy-back*-Mechanismus haben die DI-Genome komplementäre 3'- und 5'-Enden und bilden einen Doppelstrang in direkter Nähe zum 5'-Triphosphat aus. Damit stimmen die Ergebnisse von Baum et al. mit dem hier vorgestellten RIG-I PAMP überein. In Zellen nach Infektionen mit Influenzavirus fanden die Autoren sowohl komplette Gensegmente, als auch kürzere Influenzavirus DI-Genome (Typ *internal deletion*) an RIG-I gebunden. Damit stimmen diese Daten nur teilweise mit denen von Rehwinkel et al. überein. Inwiefern sich die RIG-I-Liganden aus Sendaivirus- und Influenzavirus-infizierten Zellen auf andere virale Infektionen übertragen lassen, wird Gegenstand zukünftiger Forschung sein.

4.4 Immuntherapie mit RIG-I-Liganden

Die Immuntherapie nutzt die Schlagkraft des körpereigenen Immunsystems im Kampf gegen Krankheiten. Vergleicht man den Kampf des Immunsystems gegen Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen, so entdeckt man die Parallele, dass das Abwehrsystem beide krankhaft veränderte Zellen zerstört. Dies führte zur Entwicklung von viralen PAMP-Molekülen, die eine Virusinfektion imitieren, um sowohl eine endogene Reaktion der Tumorzellen (z. B. Interferonausschüttung), wie auch eine zytotoxische T-Zell Reaktion gegen die neoplastisch veränderten Zellen zu initiieren.

Bezüglich der Verwendung von RIG-I-Liganden als viraler PAMP in der Immuntherapie von Tumoren wurden bereits erste Schritte getan. Besch et al. beschrieben in Melanomzellen einen pro-apoptischen Signalweg nach Stimulation mit 5'-Triphosphat-Doppelstrang-RNA (IVT). Der Zelltod wird dabei über den Rezeptor RIG-I initiiert und läuft über die Induktion des pro-apoptischen Proteins NOXA ab. Es ist zu betonen, dass dieser Vorgang unabhängig von dem Typ-I-Interferonsystem oder p53 induziert wird. Obwohl auch primäre Zellen RIG-I-vermittelt apoptotisch werden können, ist die systemische Anwendung von RIG-I-Liganden möglich, da neoplastisch veränderte Zellen sensitiver für RIG-I-Liganden sind. Die grundsätzliche Möglichkeit einer Melanomtherapie mit RIG-I-Liganden wurde bereits in einem Mausmodell bestätigt [91]. Die Tatsache, dass in mehr als 50 % der Tumoren das

Protein p53 inaktiviert ist und dies zu Resistenzen gegen Strahlen- und Chemotherapie beiträgt, macht diesen Ansatz besonders attraktiv, da er ohne Beteiligung von p53 abläuft.

Erst kürzlich veröffentlichte Kübler et al. ihre Entdeckung, dass Ovarialkarzinomzellen weiterhin immunologisch aktiv sind, wenn sie nach 5'-Triphosphat-RNA (IVT) -induzierter Apoptose in Phagozyten aufgenommen wurden. Die antigenpräsentierenden Zellen aktivieren ihre Oberflächenmoleküle und schütten proinflammatorische Zytokine (z. B. IFN- α , CXCL10) aus [92]. Sollte sich diese Beobachtung als allgemein gültig erweisen, wäre sie ein weiterer wichtiger Beitrag zur Immuntherapie mit RIG-I-Liganden.

Ein gänzlich neuer Ansatz in der Krebstherapie stellt die Entwicklung von RNA-Molekülen dar, die die Fähigkeit der RNA als Immunstimulans zu wirken, mit ihrem Potential als siRNA kombinieren. Diese Strategie nutzt einerseits das 5'-Triphosphat zur Induktion einer Immunantwort und andererseits die kurze Doppelstrang-RNA, um gleichzeitig die Expression eines Onkogens herunterzuregulieren. Dieser Ansatz wurde in unserem Labor entwickelt. In der Arbeit von Poeck et al. wurde auf elegante Weise gezeigt, dass dieser Therapieansatz mit einer siRNA gegen *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) in einem Tumormausmodell mit Melanom- und Kolonkarzinomzellen funktioniert. Es konnte überzeugend dargelegt werden, dass sowohl die Immunstimulation wie auch der *knock-down* der Bcl-2 Genexpression für den Erfolg dieser Krebstherapie verantwortlich sind [65].

Das Wissen um den exakten RIG-I PAMP und die darauffolgende RIG-I-Signalkaskade findet gerade Einzug in die Immuntherapie von Krebserkrankungen. In den kommenden Jahren ist zu erwarten, dass dieses Wissen auf weitere translationale Bereiche der Medizin, wie z. B. die Entwicklung von Impfstoffen, ausgeweitet wird.

5. Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem erkennt die Anwesenheit invasiver Mikroorganismen anhand konservierter molekularer Strukturen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), die in Pathogenen vorhanden sind, jedoch nicht in gesunden Zellen des Wirtes vorkommen. Während Bakterien, Pilze oder Parasiten solche Strukturen aufgrund des unterschiedlichen Zellstoffwechsels erzeugen, ist das Immunsystem bei der Erkennung von Viren vor die Schwierigkeit gestellt, dass Viren den körpereigenen Zellmetabolismus benutzen, um sich zu vermehren. Charakteristische Protein-, Zucker- oder Lipid-Modifikationen, die als Erkennungsmuster für andere Pathogene dienen, existieren daher bei Viren nicht. Das Immunsystem setzt deshalb für die Detektion viraler Infektionen vor allem die Erkennung spezifischer Eigenschaften viraler Nukleinsäuren ein. Der Rezeptor *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) aus der Familie der DExH/D Box RNA-Helikasen nimmt als Mustererkennungsrezeptor für virale RNA eine zentrale Stellung bei der Erkennung bedeutender humanpathogener Viren, wie dem Hepatitis-C-Virus und Influenza-A-Virus, ein. Dieser Rezeptor ist im Zytosol der Zelle lokalisiert und ist in der Lage, die fremde RNA anhand ihrer strukturellen Eigenschaften von der gleichzeitig übermäßig vorhandenen zellulären RNA (z. B. mRNA) zu unterscheiden.

Die strukturellen Charakteristika viraler RNA, die RIG-I aktivieren, waren zu Beginn dieser Arbeit von verschiedenen Autoren sehr unterschiedlich dargestellt worden und widersprachen damit der Vorstellung einer definierten Rezeptor-Ligand Interaktion. In der vorliegenden Arbeit wurde das PAMP des Rezeptors RIG-I, das eine antivirale Interferonantwort auslöst, neu definiert. Es handelt sich um eine durch zwei molekulare Strukturen charakterisierte RNA, die eine freie 5'-Triphosphatgruppe in direkter Nachbarschaft zu Basen-gepaarten Abschnitten trägt.

Enzymatisch durch *in-vitro*-Transkription hergestellte RNA besitzt eine 5'-Triphosphatgruppe und wurde allgemein für RIG-I-Ligandenstudien verwendet. Obwohl *in vitro* transkribierte Einzelstrang-RNA RIG-I stimulieren kann, zeigten Versuche mit einer bis dahin nicht verfügbaren chemisch synthetisierten 5'-Triphosphat-RNA, dass diese ohne Doppelstrang-Bereiche weder die zelluläre Interferonausschüttung über RIG-I stimulieren, noch die ATPase-Funktion von RIG-I aktivieren kann. Das Modell eines zweiteiligen RIG-I PAMPs wird gestützt durch die Tatsache, dass die stimulatorische Aktivität vermeintlicher 5'-Triphosphat-Einzelstrang-RNA aus *in-vitro*-Transkriptionen tatsächlich auf verlängerten Nebenprodukten beruht, die während der enzymatischen Synthese entstehen und Basen-gepaarte Bereiche enthalten. *In vitro* bindet entsprechend der zwei Motive des PAMP synthetische Doppelstrang-RNA und *in vitro* transkribierte 5'-Triphosphat-RNA an die Helikase- und C-terminale Domäne von RIG-I.

Das detaillierte Verständnis des PAMPs von RIG-I erlaubt nun, sein Potential im Einsatz gegen Viren, Autoimmunkrankheiten und Tumoren zu nutzen.

6. Literaturverzeichnis

1. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1989;54 Pt 1:1-13.
2. Sen GC. Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:255-281.
3. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* Sep 12 1957;147(927):258-267.
4. van den Broek MF, Muller U, Huang S, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune defence in mice lacking type I and/or type II interferon receptors. *Immunol Rev.* Dec 1995;148:5-18.
5. Dupuis S, Jouanguy E, Al-Hajjar S, et al. Impaired response to interferon-alpha/beta and lethal viral disease in human STAT1 deficiency. *Nat Genet.* Mar 2003;33(3):388-391.
6. Chaggier A, Kong XF, Boisson-Dupuis S, et al. A partial form of recessive STAT1 deficiency in humans. *J Clin Invest.* Jun 2009;119(6):1502-1514.
7. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity.* Sep 2006;25(3):349-360.
8. Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity.* Sep 2006;25(3):373-381.
9. Kawai T, Akira S. Antiviral signaling through pattern recognition receptors. *J Biochem.* Feb 2007;141(2):137-145.
10. Isaacs A, Cox RA, Rotem Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet.* Jul 20 1963;2(7299):113-116.
11. Rotem Z, Cox RA, Isaacs A. Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid. *Nature.* Feb 9 1963;197:564-566.
12. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* Feb 24 2006;124(4):783-801.
13. Meylan E, Tschopp J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell.* Jun 9 2006;22(5):561-569.
14. Hornung V, Latz E. Intracellular DNA recognition. *Nat Rev Immunol.* Feb;10(2):123-130.
15. Andrejeva J, Childs KS, Young DF, et al. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Dec 7 2004;101(49):17264-17269.
16. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* Jul 2004;5(7):730-737.
17. Yoneyama M, Fujita T. Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem.* May 25 2007;282(21):15315-15318.
18. Cui S, Eisenacher K, Kirchhofer A, et al. The C-terminal regulatory domain is the RNA 5'-triphosphate sensor of RIG-I. *Mol Cell.* Feb 1 2008;29(2):169-179.
19. Takahashi K, Yoneyama M, Nishihori T, et al. Nonself RNA-sensing mechanism of RIG-I helicase and activation of antiviral immune responses. *Mol Cell.* Feb 29 2008;29(4):428-440.
20. Saito T, Hirai R, Loo YM, et al. Regulation of innate antiviral defenses through a shared repressor domain in RIG-I and LGP2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 9 2007;104(2):582-587.
21. Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, et al. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *J Immunol.* Sep 1 2005;175(5):2851-2858.
22. Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, et al. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol.* Oct 15 2005;175(8):5260-5268.

23. Komuro A, Horvath CM. RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2. *J Virol.* Dec 2006;80(24):12332-12342.
24. Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, et al. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol.* May 15 2007;178(10):6444-6455.
25. Stetson DB, Medzhitov R. Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response. *Immunity.* Jan 2006;24(1):93-103.
26. Ishii KJ, Coban C, Kato H, et al. A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA. *Nat Immunol.* Jan 2006;7(1):40-48.
27. Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature.* Jul 26 2007;448(7152):501-505.
28. Ablasser A, Bauernfeind F, Hartmann G, Latz E, Fitzgerald KA, Hornung V. RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol.* Oct 2009;10(10):1065-1072.
29. Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell.* Aug 7 2009;138(3):576-591.
30. Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature.* Mar 26 2009;458(7237):514-518.
31. Kato H, Takeuchi O, Sato S, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* May 4 2006;441(7089):101-105.
32. Kim DH, Longo M, Han Y, Lundberg P, Cantin E, Rossi JJ. Interferon induction by siRNAs and ssRNAs synthesized by phage polymerase. *Nat Biotechnol.* Mar 2004;22(3):321-325.
33. Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, et al. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* May 30 2006;103(22):8459-8464.
34. Hornung V, Ellegast J, Kim S, et al. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science.* Nov 10 2006;314(5801):994-997.
35. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science.* Nov 10 2006;314(5801):997-1001.
36. Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E. Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature.* May 21 1998;393(6682):280-284.
37. Malathi K, Dong B, Gale M, Jr., Silverman RH. Small self-RNA generated by RNase L amplifies antiviral innate immunity. *Nature.* Aug 16 2007;448(7155):816-819.
38. Kato H, Takeuchi O, Mikamo-Sato E, et al. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med.* Jul 7 2008;205(7):1601-1610.
39. Saito T, Owen DM, Jiang F, Marcotrigiano J, Gale M, Jr. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature.* Jul 24 2008;454(7203):523-527.
40. Weber F, Wagner V, Rasmussen SB, Hartmann R, Paludan SR. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. *J Virol.* May 2006;80(10):5059-5064.
41. Pippig DA, Hellmuth JC, Cui S, et al. The regulatory domain of the RIG-I family ATPase LGP2 senses double-stranded RNA. *Nucleic Acids Res.* Apr 2009;37(6):2014-2025.
42. Murali A, Li X, Ranjith-Kumar CT, et al. Structure and function of LGP2, a DEX(D/H) helicase that regulates the innate immunity response. *J Biol Chem.* Jun 6 2008;283(23):15825-15833.
43. Kawai T, Takahashi K, Sato S, et al. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol.* Oct 2005;6(10):981-988.
44. Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature.* Oct 20 2005;437(7062):1167-1172.

45. Seth RB, Sun L, Ea CK, Chen ZJ. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3. *Cell*. Sep 9 2005;122(5):669-682.
46. Xu LG, Wang YY, Han KJ, Li LY, Zhai Z, Shu HB. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling. *Mol Cell*. Sep 16 2005;19(6):727-740.
47. Paz S, Sun Q, Nakhaei P, et al. Induction of IRF-3 and IRF-7 phosphorylation following activation of the RIG-I pathway. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2006;52(1):17-28.
48. Hiscott J, Lin R, Nakhaei P, Paz S. MasterCARD: a priceless link to innate immunity. *Trends Mol Med*. Feb 2006;12(2):53-56.
49. Yoneyama M, Fujita T. Recognition of viral nucleic acids in innate immunity. *Rev Med Virol*. Jan;20(1):4-22.
50. Taniguchi T, Takaoka A. The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol*. Feb 2002;14(1):111-116.
51. Haller O, Kochs G, Weber F. The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology*. Jan 5 2006;344(1):119-130.
52. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol*. Jan 2008;89(Pt 1):1-47.
53. Bowie AG, Unterholzner L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. Dec 2008;8(12):911-922.
54. Mibayashi M, Martinez-Sobrido L, Loo YM, Cardenas WB, Gale M, Jr., Garcia-Sastre A. Inhibition of retinoic acid-inducible gene I-mediated induction of beta interferon by the NS1 protein of influenza A virus. *J Virol*. Jan 2007;81(2):514-524.
55. Habjan M, Andersson I, Klingstrom J, et al. Processing of genome 5' termini as a strategy of negative-strand RNA viruses to avoid RIG-I-dependent interferon induction. *PLoS ONE*. 2008;3(4):e2032.
56. Childs K, Stock N, Ross C, et al. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. *Virology*. Mar 1 2007;359(1):190-200.
57. Barral PM, Morrison JM, Drahos J, et al. MDA-5 is cleaved in poliovirus-infected cells. *J Virol*. Apr 2007;81(8):3677-3684.
58. Alff PJ, Gavrilovskaya IN, Gorbunova E, et al. The pathogenic NY-1 hantavirus G1 cytoplasmic tail inhibits RIG-I- and TBK-1-directed interferon responses. *J Virol*. Oct 2006;80(19):9676-9686.
59. Brzozka K, Finke S, Conzelmann KK. Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol*. Jun 2005;79(12):7673-7681.
60. Zimring JC, Goodbourn S, Offermann MK. Human herpesvirus 8 encodes an interferon regulatory factor (IRF) homolog that represses IRF-1-mediated transcription. *J Virol*. Jan 1998;72(1):701-707.
61. Joo CH, Shin YC, Gack M, Wu L, Levy D, Jung JU. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J Virol*. Aug 2007;81(15):8282-8292.
62. Xiang Y, Condit RC, Vijaysri S, Jacobs B, Williams BR, Silverman RH. Blockade of interferon induction and action by the E3L double-stranded RNA binding proteins of vaccinia virus. *J Virol*. May 2002;76(10):5251-5259.
63. Hatada E, Fukuda R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. *J Gen Virol*. Dec 1992;73 (Pt 12):3325-3329.
64. Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, et al. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol*. Mar 2005;79(5):2689-2699.
65. Poeck H, Besch R, Maihoefer C, et al. 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med*. Nov 2008;14(11):1256-1263.

66. Marques JT, Devosse T, Wang D, et al. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* May 2006;24(5):559-565.
67. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* Mar 5 2004;303(5663):1529-1531.
68. Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, et al. Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med.* Mar 2005;11(3):263-270.
69. Schutz P, Karlberg T, van den Berg S, et al. Comparative structural analysis of human DEAD-box RNA helicases. *PLoS ONE.*5(9).
70. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1982;1(8):945-951.
71. Hilbert M, Karow AR, Klostermeier D. The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biol Chem.* Dec 2009;390(12):1237-1250.
72. Rozen F, Pelletier J, Trachsel H, Sonenberg N. A lysine substitution in the ATP-binding site of eucaryotic initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Mol Cell Biol.* Sep 1989;9(9):4061-4063.
73. Fischer H, Glockshuber R. A point mutation within the ATP-binding site inactivates both catalytic functions of the ATP-dependent protease La (Lon) from Escherichia coli. *FEBS Lett.* Dec 12 1994;356(1):101-103.
74. Cazenave C, Uhlenbeck OC. RNA template-directed RNA synthesis by T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 19 1994;91(15):6972-6976.
75. Nacheva GA, Berzal-Herranz A. Preventing undesired RNA-primed RNA extension catalyzed by T7 RNA polymerase. *Eur J Biochem.* Apr 2003;270(7):1458-1465.
76. Behrens SE, Tomei L, De Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.* Jan 2 1996;15(1):12-22.
77. Schmidt A, Schwerdt T, Hamm W, et al. 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jul 21 2009;106(29):12067-12072.
78. Schlee M, Roth A, Hornung V, et al. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity.* Jul 17 2009;31(1):25-34.
79. Myong S, Cui S, Cornish PV, et al. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'-triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. *Science.* Feb 20 2009;323(5917):1070-1074.
80. Wreschner DH, McCauley JW, Skehel JJ, Kerr IM. Interferon action--sequence specificity of the ppp(A2'p)nA-dependent ribonuclease. *Nature.* Jan 29 1981;289(5796):414-417.
81. Ranjith-Kumar CT, Murali A, Dong W, et al. Agonist and antagonist recognition by RIG-I, a cytoplasmic innate immunity receptor. *J Biol Chem.* Jan 9 2009;284(2):1155-1165.
82. Bamming D, Horvath CM. Regulation of signal transduction by enzymatically inactive antiviral RNA helicase proteins MDA5, RIG-I, and LGP2. *J Biol Chem.* Apr 10 2009;284(15):9700-9712.
83. Wang Y, Ludwig J, Schuberth C, et al. Structural and functional insights into 5'-ppp RNA pattern recognition by the innate immune receptor RIG-I. *Nat Struct Mol Biol.* Jul;17(7):781-787.
84. Lu C, Ranjith-Kumar CT, Hao L, Kao CC, Li P. Crystal structure of RIG-I C-terminal domain bound to blunt-ended double-strand RNA without 5' triphosphate. *Nucleic Acids Res.* Oct 20.
85. Lu C, Xu H, Ranjith-Kumar CT, et al. The structural basis of 5' triphosphate double-stranded RNA recognition by RIG-I C-terminal domain. *Structure.* Aug 11;18(8):1032-1043.

-
86. Tang ED, Wang CY. MAVS self-association mediates antiviral innate immune signaling. *J Virol.* Apr 2009;83(8):3420-3428.
 87. Baril M, Racine ME, Penin F, Lamarre D. MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease. *J Virol.* Feb 2009;83(3):1299-1311.
 88. Rehwinkel J, Tan CP, Goubau D, et al. RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection. *Cell.* Feb 5;140(3):397-408.
 89. Baum A, Sachidanandam R, Garcia-Sastre A. Preference of RIG-I for short viral RNA molecules in infected cells revealed by next-generation sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 14;107(37):16303-16308.
 90. Strahle L, Garcin D, Kolakofsky D. Sendai virus defective-interfering genomes and the activation of interferon-beta. *Virology.* Jul 20 2006;351(1):101-111.
 91. Besch R, Poeck H, Hohenauer T, et al. Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells. *J Clin Invest.* Aug 2009;119(8):2399-2411.
 92. Kubler K, Gehrke N, Riemann S, et al. Targeted activation of RNA helicase retinoic acid-inducible gene-I induces proimmunogenic apoptosis of human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* Jul 1;70(13):5293-5304.

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

AIM2	<i>Absent in melanoma 2</i>
APC	Antigen-präsentierende Zelle
As	<i>Antisense-Strang</i>
AU	<i>Arbitrary units</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CARD	<i>Caspase activating and recruitment domain</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CIAP	<i>Calf intestine alkaline phosphatase</i>
CpG	Cytosin-(Phosphat)-Guanin-Dinukleotid
CTD	C-terminale Domäne
DAI	<i>DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors</i>
DC	Dendritische Zelle
DI	<i>Defective interfering</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
Ds	Doppelstrang (engl. <i>double-strand</i>)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent Assay</i>
EMCV	<i>Encephalomyocarditis virus</i>
FCS	Fötale Kälberserum
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEK	Human embryonic kidney cells
HiCIAP	Hitzeinaktiviertes CIAP-Enzym
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α - und Interferon- β -Rezeptor
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
I κ B	<i>Inhibitor of NFκB</i>
IKK	<i>Inhibitor of NFκB kinase</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	<i>Interferon-stimulated genes</i>
IVT	<i>In-vitro</i> -Transkription
IVT-RNA	<i>In vitro</i> transkribierte RNA
JAK	<i>Janus kinase</i>
Kb	Kilobasen
LGP-2	<i>Laboratory of genetics and physiology 2</i>
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>

NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NS1	<i>Non-structural protein 1</i>
Nt	Nukleotid
OH	Hydroxylgruppe
OAS	Oligoadenylat-Synthetase
PAA	Polyacrylsäure (<i>polyacrylic acid</i>)
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PEI	Polyethylenimin
PKR	Proteinkinase R
Poly I:C	Polyinosin-Polycytidin-Säure
P	Monophosphat
PPP	Triphosphat
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
RD	Regulatorische Domäne
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLH	<i>RIG-I-like-Helikasen</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAP	RNA-Polymerase
RT	Raumtemperatur
S	<i>Sense-Strang</i>
SeV	Sendaivirus
siRNA	<i>Small-interfering-RNA</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
Ss	Einzelstrang (engl. <i>single-strand</i>)
Syn	Synthetisch
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBK1	<i>TRAF-family-member-associated NFκB activator-binding kinase 1</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>

8. Danksagung

Prof. Stefan Endres möchte ich danken für die Möglichkeit, in seiner lebendigen Abteilung promovieren zu dürfen. Seiner persönlichen Unterstützung und seinem Interesse an seinen Mitarbeitern gilt mein besonderer Dank.

Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Simon Rothenfuß, der mich kontinuierlich wissenschaftlich begleitet hat und mir in vielen weiteren Fragen des Lebens und der Ausbildung mit seinem Rat zur Seite stand. Seine wissenschaftliche Begeisterung war stets eine Motivation für meine Arbeit. Ein besonderer Höhepunkt meiner Doktorandenzeit wird immer der Aufenthalt an der University of Massachusetts bleiben.

Außerdem bedanke ich mich für die Aufnahme in das *Graduiertenkolleg 1202 – „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“*.

Ich bedanke mich bei meinen betreuenden Post-Docs, Dr. Andreas Schmidt und Dr. Hendrik Poeck, für die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und das Lehren der experimentellen Methoden. Bei allen Mitdoktoranden bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung.

9. Publikationen

Originalarbeiten

- 2008 | 5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma.
Poeck H, Besch R, Maihoefer C, Renn M, Tormo D, Morskaya SS, Kirschnek S, Gaffal E, Landsberg J, Hellmuth J, Schmidt A, Anz D, Bscheider M, **Schwerd T**, Berking C, Bourquin C, Kalinke U, Kremmer E, Kato H, Akira S, Meyers R, Häcker G, Neuenhahn M, Busch D, Ruland J, Rothenfusser S, Prinz M, Hornung V, Endres S, Tüting T, Hartmann G.
Nature Medicine 2008 Nov;14(11):1256-63.
- 2009 | 5'-triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I.
Schmidt A*, **Schwerd T***, Hamm W*, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. (* authors contributed equally to this work)
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jul 21;106(29):12067-72.
- Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells.
Anz D, Koelzer VH, Moder S, Thaler R, **Schwerd T**, Lahl K, Sparwasser T, Besch R, Poeck H, Hornung V, Hartmann G, Rothenfusser S, Bourquin C, Endres S.
J Immunol. 2009 Dec 7.

Abstracts und Poster

- 2007 | „Molecular mechanism of virus recognition by Rig-I-like helicases“
Schwerd T, Hellmuth J, Hamm W, Schmidt A, Wenzel M, Hoffmann F, Poeck H, Endres S, Rothenfusser S.
Oligonucleotide Therapeutics Society, 3rd Annual Meeting, Oktober 2007, Berlin
- 2008 | „Single-stranded 5'-triphosphate RNA is not sufficient to trigger RIG-I and requires base-paired secondary structures to activate anti-viral signalling“
Hamm W, **Schwerd T**, Hellmuth J, Schmidt A, Poeck H, Cui S, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S.
Toll2008 Meeting - Recent Advances in Pattern Recognition, September 2008, Lissabon

Vorträge

- 2007 | „RNA recognition by RIG-I-like RNA helicases“
Annual Retreat des Graduiertenkollegs 1202 der DFG, April 2007, Herrsching am Ammersee
- „Molecular mechanisms of virus recognition by RIG-I-like RNA helicases“
37. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, September 2007, Heidelberg

10. Lebenslauf

Persönliches	
Geburtsdatum/ -ort	22. Februar 1983 in München
Schulbildung	
1993 – 2000	Gymnasium München/Moosach
2000 – 2002	Ludwigsgymnasium München
2002	Allgemeine Hochschulreife mit den Leistungskursen Musik und Mathematik
Zivildienst	
2002 – 2003	Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund München
Hochschulbildung	
2003 – 2010	Studium der Humanmedizin an der LMU München
2005	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2010	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Arzt
Praktisches Jahr	
2009 – 2010	Teil I – <i>Pädiatrie</i> Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München Teil II - <i>Innere Medizin</i> Lehrkrankenhäuser der Harvard Medical School, Boston, USA Teil III - <i>Chirurgie</i> Universitätskinderspital und Universitätsspital Zürich, Schweiz
Stipendien	
2006 – 2010	Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes
2006 – 2007	Promotionsstipendiat des Graduiertenkollegs 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft
2009	Stipendiat der Harvard-Munich-Alliance for Medical Education
Beruf	
Seit 2010	Assistenzarzt in der Abteilung für Pädiatrische Gastroenterologie und Hepatologie am Dr. von Haunerschen Kinderspital, LMU München (Leiterin Prof. Dr. med. S. Koletzko)