

# Zusammenfassung der Dissertation

David Yves Zander  
Dr. med.

## **Characterization of Cell-Intrinsic Antiviral Response Pathways in the Context of DNA Damage-Induced Cell Death**

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Ralf Bartenschlager

Die zellintrinsische antivirale Immunantwort ist von zentraler Bedeutung für die Bekämpfung von Virusinfektionen. Typischerweise erkennen Mustererkennungsrezeptoren wie Retinoic acid inducible gene I (RIG-I) Pathogen-assoziierte molekulare Muster und führen zu Zytokinproduktion und Ausbildung eines antiviralen Zustands. Dieser umfasst nicht nur antivirale Effektoren, sondern auch zytostatische und antitumorogene Eigenschaften, einschließlich der Induktion von Zelltod. In den letzten Jahren wurde deutlich, dass der durch Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden induzierte Zelltod zumindest teilweise auf denselben antiviralen Signalwegen beruht. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass neben den kanonischen Signalwegen der DNA-Schädigung, beispielsweise p53, auch RIG-I-like Rezeptor (RLR)-Signalwege und entsprechende Transkriptionsfaktoren, wie Interferon regulatory factor (IRF)3 und Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells (NF- $\kappa$ B), beteiligt sind. Typischerweise ist RIG-I an der Erkennung doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNA) bei viralen Infektionen involviert. Kürzlich wurde jedoch auch über eine bisher unzureichend charakterisierte RIG-I-Aktivierung durch DNA-Schäden-induzierte, endogene RNA berichtet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, relevante Signalwege für den durch DNA-Schäden ausgelösten Zelltod umfassend zu untersuchen und Einblicke in die kooperative Beteiligung von antiviralen Signalwegen und gängigen Proteinen der DNA-Schadigungsantwort zu erhalten. Dazu wurden A549 humane Lungenkarzinom-Zelllinien, die funktionelle Knockouts verschiedener Komponenten der angeborenen Immunität und der DNA-Schadensantwort tragen, mit Zytostatika (Doxorubicin und Etoposid) oder  $\gamma$ -Bestrahlung behandelt. Das Zellsterben wurde auf Einzelzellebene durch Echtzeit-Bildgebung quantifiziert. Zentrale Komponenten wurden hinsichtlich ihrer Aktivierung, Regulation und nachgeschaltete Mechanismen charakterisiert.

Die Ausbildung von Doxorubicin-induziertem Zelltod erforderte eine funktionelle RIG-I-Signalkaskade mit Beteiligung des Mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS) und IRF3. Ähnlich wie bei der in der Literatur beschriebenen RIG-I-spezifischen Stimulation könnte die DNA-Schadensantwort vom RIG-I-like receptor-induced IRF3 mediated pathway of apoptosis (RIPA) abhängen, der eine MAVS-vermittelte Interaktion von polyubiquityliertem IRF3 mit pro-apoptotischen Proteinen beinhaltet. Zelltod-Ergebnisse zeigten einen zusätzlichen Einfluss des NF- $\kappa$ B-Signalwegs. Überraschenderweise waren im Gegensatz zu kürzlich veröffentlichten Daten andere Komponenten der zell-intrinsischen

antiviralen Antwort, wie Stimulator of interferon genes (STING) oder Toll-like Rezeptoren, vollständig entbehrlich.

Weiterhin war auffällig, dass der Doxorubicin-bedingte Zelltod durch eine Depletion von *TP53* und *IRF1* deutlich reduziert wurde. *IRF1* wird mit antiviraler Signalübertragung, DNA-Schadensantwort und Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht. Allerdings ist bislang wenig über die genauen Mechanismen der nachgeschalteten Zelltodinduktion bekannt. Eine zuvor beschriebene Beteiligung der Z-DNA binding protein 1 (ZBP1)-abhängigen Aktivierung von Inflammasom und Pyroptose wurde nicht bestätigt. Stattdessen deuten Transkriptomdaten in A549-Zellen, die mit Doxorubicin behandelt wurden, auf eine Beteiligung des DNA damage-inducible transcript 3 (DDIT3) hin, das im Falle von Stress des endoplasmatischen Retikulums als pro-apoptotisch beschrieben ist. Obwohl *IRF1* sowohl durch die RIG-I-spezifische Stimulation mittels dsRNA-Transfektion als auch durch die Behandlung mit Doxorubicin induziert wurde, unterschieden sich die zugrunde liegenden Mechanismen deutlich. Die Expression von *IRF1* als Reaktion auf dsRNA hing strikt von der RIG-I-MAVS-IRF3-Signalkaskade ab und war teilweise Interferon (IFN)-abhängig. Während in der Literatur die *IRF1*-Expression primär auf IFNs, insbesondere Typ II IFN, zurückgeführt wird, weisen diese Ergebnisse auf einen bisher unbekanntem, direkt IRF3-vermittelten Mechanismus der *IRF1*-Induktion hin. Im Gegensatz dazu erhöhte Doxorubicin die *IRF1*-Expression über die Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Ataxia telangiectasia mutated (ATM), unabhängig von jeglichem Immunsignalweg, wie RIG-I, MAVS, IRF3, NF- $\kappa$ B und IFNs.

Interessanterweise hatte die Depletion von NF- $\kappa$ B p65 und p50 durch funktionellen Knockout keinen Effekt auf die Expression von *IRF1*, während der gängige NF- $\kappa$ B-Inhibitor TPCA-1 die Expression von *IRF1* unter zahlreichen Bedingungen, einschließlich dsRNA, Doxorubicin,  $\gamma$ -Bestrahlung und in mehreren menschlichen und murinen Zelllinien vollständig aufhob und sie sogar unter den Ausgangswert reduzierte. Die Verabreichung von TPCA-1 wurde auch von einem reduzierten Zelltod begleitet. Dieser Effekt könnte mit einer kombinierten Hemmung von NF- $\kappa$ B, Januskinase 1 (JAK1) und Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), aber möglicherweise auch weiteren bisher unbekanntem Zielproteinen verbunden sein. Im Gegensatz führte eine IFN-Stimulation zu einem deutlichen Anstieg des Zelltods. Auffallend ist, dass dieser Effekt sowohl von *IRF1* als auch vom RLR-Signalweg abhing. IFN-Stimulation scheint zwar die *IRF1* Level zu erhöhen, dies alleine reicht aber nicht zur Induktion des Zelltods aus. Daher ist eine zusätzliche Stimulation der RLR-Kaskade notwendig. Die *IRF1* Expression durch IFNs könnte auch deren Doxorubicin-sensibilisierenden, antitumorigenen Effekte erklären.

RIG-I, p53 und *IRF1* scheinen kooperative Effekte zu haben, die für die Induktion des Zelltods als Reaktion auf DNA-Schäden unerlässlich sind. Interessanterweise ist eine zusätzliche Aktivierung von *IRF1* für eine schwache Aktivierung der RLR-Signalgebung obligatorisch, beispielsweise bei DNA-Schädigung, während der Zelltod nach intensiver RLR-Stimulation *IRF1*-unabhängig ist. Zwei Hypothesen erklären diese synergistischen Effekte: (1) *IRF1* könnte durch post-translationale Modifikation durch die RLR-Signalkaskade aktiviert werden. Ein bereits in der Literatur beschriebener Aktivierungsprozess würde auch erklären, warum die Überexpression von *IRF1* alleine keinen Zelltod induziert. Bislang wurden jedoch keine Hinweise auf Modifikationen gefunden. Eine zweite Hypothese (2) ist, dass ein generelles Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Faktoren die Apoptose aktivieren

könnte. Demnach sind eher kooperative Effekte mehrerer Signalwege erforderlich als eine Induktion einzelner pro-apoptotischer Faktoren. Dies würde auch die RIG-I- und IRF1-unabhängige Beteiligung von p53 erklären.

Damit liefern die neuen Erkenntnisse dieser Studie fundamentales Wissen über chemosensibilisierende Effekte zellintrinsischer antiviraler Reaktionswege und können die Entwicklung neuartiger Adjuvantien in der Tumorthherapie leiten.