

# Zusammenfassung der Dissertation

Guandi Wu

Dr. Med

## **Exploration of E3 Ubiquitin Ligase Regulators and the Translational Control in the RIG-I Signaling**

Fach/Einrichtung: Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)

Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Volker Lohmann

Diese Doktorarbeit zielte darauf ab, das Verständnis der Regulation des Retinsäure-induzierbaren Gens I (RIG-I)-Signalwegs zu verbessern, der für die angeborene Immunantwort gegen RNA-Viren entscheidend ist. Die Forschung konzentrierte sich auf die Identifizierung neuer E3-Ubiquitin-Ligasen, die den RIG-I-Signalweg regulieren, und auf das Verständnis der Translationskontrolle nach Stimulation mit doppelsträngiger RNA (dsRNA) sowie deren Auswirkungen auf den RIG-I-Signalweg.

Zunächst wurde eine Neubewertung der vorherigen zwei komplementären Runden von siRNA-Screens an 616 potenziellen E3-Ubiquitin-Ligasen durchgeführt, um neue Regulatoren im RIG-I-Signalweg zu erforschen, wobei 14 Kandidatengene identifiziert wurden. Validierungsexperimente, einschließlich Messungen der Interferon-beta (IFN- $\beta$ )-mRNA-Spiegel nach dsRNA-Transfektion, der Replikation des Rift-Valley-Fieber-Virus (RVFV) und der IFN- $\beta$ -Luciferase-Reporter-Aktivität, wurden durchgeführt, um die Auswirkungen der Überexpression dieser Gene auf den RIG-I-Signalweg zu bewerten. Wir konzentrierten uns dann auf TRIM48, das konsequent signifikante negative Effekte auf den RIG-I-Signalweg zeigte. Die Überexpression von TRIM48 in A549-Zellen reduzierte signifikant die Interferon- und interferonstimulierenden Gen-mRNA-Expressionsniveaus nach dsRNA-Stimulation und Sendai-Virus-Infektion. Diese Unterdrückung wurde durch verringerte Phosphorylierung des Interferon-Regulatorfaktors 3 (IRF3), der TANK-bindenden Kinase 1 (TBK1) und von p65 sowie durch reduzierte Aktivierung der IRF3- und des nuklearen Faktors Kappa-Leichtketten-Enhancer aktivierter B-Zellen (NF- $\kappa$ B)-Signalwege in Dual-Luciferase-Assays belegt. Gleichzeitig erhöhte sich die Replikation des vesikulären Stomatitis-Virus, das das grün fluoreszierende Protein (VSV-GFP) exprimiert, nach Überexpression von TRIM48. Umgekehrt hatte der Mangel an TRIM48 den gegenteiligen Effekt. Wichtig ist, dass nur wildtypisches TRIM48, nicht aber ein katalytisch inaktives Mutant, die Interferonantworten effektiv unterdrückte und die Signalwegaktivierung hemmte, was die essenzielle Rolle der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität von TRIM48 bei der Regulation von Schlüsselkomponenten des RIG-I-Signalwegs betont.

Es ist plausibel, dass TRIM48 spezifische Signalmoleküle stromaufwärts von IRF3 und NF- $\kappa$ B ubiquitiniert und sie für den Abbau oder die Inaktivierung markiert. Potenzielle Ziele umfassen

RIG-I selbst, MAVS oder nachgeschaltete Kinasen wie TBK1 und IKK $\epsilon$ . Zukünftige Studien, die Co-Immunpräzipitation, Ubiquitinierungsassays, Proteasom-Inhibitionstests und massenspektrometriebasierte Ubiquitinom-Analysen beinhalten, werden vorgeschlagen, um die Substrate der TRIM48-vermittelten Ubiquitinierung zu identifizieren und ihren Wirkungsmechanismus zu klären.

Neben der Ubiquitinierung ist die Translationskontrolle ein entscheidender Regulationsmechanismus im RIG-I-Signalweg. Die genauen Dynamiken der zellulären Translation und deren Einfluss auf den RIG-I-Signalweg nach dsRNA-Stimulation sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. In dieser Studie wurde die Elektroporation verwendet, um den RIG-I-Signalweg in A549-IFN-Rezeptor-Triple-Knockout-Zellen mittels dsRNA zu aktivieren. Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Reduktion der Proteinneusynthese nach 2 und 4 Stunden, was einen globalen Translationsstopp anzeigt, jedoch eine Erholung der Levels nach 16 Stunden. Die Gesamtproteomanalyse nach 16 Stunden offenbarte eine geringfügige Abnahme der Proteinlevel insgesamt, mit einer Anreicherung von Proteinen, die auf Interferonantwort und Virusinfektionen reagieren. Trotz der globalen Unterdrückung wurden bestimmte Proteine wie mitochondriale Proteine und MDA5 selektiv übersetzt. GADD34, welches die Wiederaufnahme der Proteinsynthese fördert, wurde direkt nach der dsRNA-Stimulation induziert, was auf alternative Translationsmechanismen hinweist. Um den Einfluss des Translationsstatus auf die transkriptionelle Reaktion auf dsRNA zu bewerten, wurde Cycloheximid (CHX) zur Nachahmung der Proteinsynthesehemmung eingesetzt. Obwohl die qRT-PCR eine erhöhte IFN- $\beta$ -mRNA nach dsRNA-Stimulation mit CHX zeigte, ergab die RNA-Sequenzierung, dass die Hemmung der Translation minimalen Einfluss auf die globale transkriptionelle Reaktion auf dsRNA hatte, was nahelegt, dass die transkriptionellen Antworten auf dsRNA größtenteils unabhängig von der laufenden Proteinsynthese sind.

Zusammenfassend stellt die Studie TRIM48 als negativen Regulator des RIG-I-vermittelten antiviralen Signalwegs heraus, wobei seine Aktivität als E3-Ubiquitin-Ligase entscheidend für diese Funktion ist. Die Analyse des neu synthetisierten Proteoms ermöglichte es uns, detaillierte Profile von neu synthetisierten Proteinen in den frühen und späten Phasen der dsRNA-Stimulation zu liefern, was eine erhebliche frühe Translationshemmung neben der selektiven Synthese kritischer Proteine zeigt. Diese Erkenntnisse bieten wertvolle Einblicke, wie Zellen sich gegen Virusinfektionen verteidigen und könnten Ziele für antivirale Therapien aufzeigen.