Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie
Abteilung der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Stefan Endres

TRIM9 in der Regulation der angeborenen antiviralen Immunität

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

vorgelegt von
Johannes Tossounidis
aus Luxemburg
2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Simon Rothenfußer
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dr. Albrecht von Brunn
Mitberichterstatter:	PD Dr. Christof Geldmacher

Mitbetreuung durch:	Dr. Dharmendra Pandey
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	29.09.2022

Eidesstattliche Versicherung

Tossounidis, Johannes

geboren am 28.09.1993 in Luxemburg

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

“TRIM9 in der Regulation der angeborenen antiviralen Immunität ”

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche vermerkt. Des Weiteren erkläre ich, dass alle nicht näher gekennzeichneten Daten Ergebnisse der eigenen Datenerhebung im Zeitraum von April 2015 bis Juli 2016 sind. Unpubliziere Daten, die durch Kooperationsgruppen oder andere Mitglieder der Arbeitsgruppe erhoben wurden, sind durch entsprechende Fußnoten eindeutig gekennzeichnet.

Ich versichere außerdem, dass ich die vorgelegte Dissertation nur in diesem und in keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Verfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Basel, den 05.10.2022

Unterschrift

Johannes Tossounidis

Meinen Eltern Corinna und Lazaros

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Genetische Varianz beeinflusst den interindividuellen Verlauf infektiöser Erkrankungen 1

1.1.1. Genetische Varianz im menschlichen Genom 1

1.1.2. Ko-Evolution konkurrierender Organismen 1

1.1.3. Der Einfluss genetischer Faktoren des Menschen auf den Verlauf von Infektionserkrankungen 3

1.1.3.1. Genetische Polymorphismen beeinflussen die spontane Ausheilungsrate von Hepatitis-C-Infektionen 3

1.2. Viren treten in Wechselwirkung mit dem angeborenen Immunsystem ihres Wirtes 5

1.2.1. Viren: Definition und Klassifikation 5

1.2.2. RNA-Viren weisen eine hohe Mutations- und Evolutionsrate auf 5

1.2.3. Erkennung pathogen-assoziierter molekularer Muster (PAMP) durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems 7

1.2.3.1. Mustererkennungsrezeptoren - Überblick 7

1.2.3.2. Toll-like-Rezeptoren: Liganden und Signalwege 7

1.2.3.3. RIG-I-like-Rezeptor-Aktivierung und MAVS-vermittelte Signaltransduktion 8

1.2.3.4. Erkennung körperfremder DNA über cGAS/STING und TLR-9 10

1.2.4. Die über Mustererkennungsrezeptoren vermittelte Bildung von Interferon versetzt die Zelle und ihre Umgebung in einen antiviralen Zustand. 11

1.3. Die Rolle von TRIM-Proteinen in der antiviralen Immunität 13

1.3.1. TRIM Proteinfamilie 13

1.3.1.1. Definition und Strukturmerkmale 13

1.3.1.2. Allgemeine funktionelle Merkmale 13

1.3.2. Antivirale Funktionen von TRIM-Proteinen 15

1.3.2.1. TRIM-Proteine als Modulatoren angeborener Immunsignalwege 15

1.3.2.2. TRIM9 als Modulator PRR-abhängiger Signalwege 16

1.3.1. Die genetische Varianz in der TRIM-Protein-Familie verändert die Empfänglichkeit des Wirtes gegenüber viralen Erregern 17

1.4. Vorarbeiten 18

1.4.1. Initiation des Projekts: TRIM9 als potenzieller Akteur in der antiviralen Immunität und die Assoziation eines SNP im Gen von TRIM9 mit dem Verlauf einer Hepatitis-C-Infektion 18

1.4.2.Zusammenfassung der bis April 2015 durchgeführten und für diese Arbeit relevanten Vorarbeiten (Rückel 2018) 18

1.5. Fragestellung 20

2. Material und Methoden 21

2.1. Geräte 21

2.2. Allgemeine Materialien 22

2.2.1.Reagenziensätze 22

2.2.2.Chemikalien und Verbrauchsmittel 23

2.2.3.Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien 27

2.3. Projektspezifische Materialien 30

2.3.1.Zelllinien 30

2.3.2.Zuchttiere 30

2.3.3.Antikörper 31

2.3.4.PCR-Primer 32

2.3.5.Plasmide 33

2.3.6.qRT-PCR Primer und Sonden 34

2.3.7.siRNA 35

2.3.8.CRISPR-sgRNA 35

2.3.9.Viren 36

2.3.10.Synthetische Rezeptorliganden 37

2.3.11.Software 38

2.4. Zellulär-immunologische Methoden 39

2.4.1 Zellkultur 39

2.4.4.1.Allgemeine Zellkulturbedingungen 39

2.4.4.2.Kultivierung und Verwendung von Tumorzelllinien 39

2.4.4.3.Präparationsmethoden und ex-vivo-Kultivierung primärer muriner Zellen 40

2.4.4.4.Herstellung von murinen Gewebelysaten 41

2.4.2.Stimulation & Infektion von Zellen 41

2.4.3.CRISPR/Cas9-Geneditierung: Etablierung stabiler TRIM9-Knock-Out-Zelllinien 42

2.4.3.1.CRISPR/Cas9: Theoretischer Hintergrund 42

2.4.3.2.Lentivirale Transduktion: Methodisches Prinzip 43

2.4.4.Western Blot 45

2.4.5.Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) 45

2.4.6.Virustiterbestimmung mittels TCID50-Endpunktverdünnungsassay.....46
2.4.7.Durchflusszytometrie 46
2.4.8.Dualer Luciferase-Assay 47

2.5. Molekularbiologische Methoden 48
2.5.1.Polymerase Kettenreaktion (PCR) 48
2.5.2.Q5-Mutagenese 48
2.5.3.T7-Endonukleaseverdau 49
2.5.4.Quantitative mRNA-Analyse 49

2.6. Statistische Analyse 51

3. Ergebnisse 52

3.1. TRIM9 lässt sich in primären Geweben außerhalb des ZNS auf RNA-Ebene aber nicht auf Proteinebene nachweisen. 52

3.2. Einzelnukleotidpolymorphismen in der 3'UTR von TRIM9 beeinflussen das Expressionsniveau des stromaufwärts gelegenen Gens.....55

3.3. Etablierung von TRIM9-defizienten Hepatomzellklonen mittels CRISPR-Cas9 59

3.4. Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Stimulation zytoplasmatischer und endosomaler Mustererkennungsrezeptoren.....63
3.4.1.Zwischen primären Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen zeigt sich kein Unterschied in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach intrazellulärer Stimulation von RLR-, STING und TLR-9. 63
3.4.2.Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach endosomaler Stimulation von TLR-3, -7, -8 und -9 auf. 66

3.5. Die TRIM9-Defizienz fördert in humanen Melanomzellen, jedoch nicht in primären murinen Zellen, die Virus-induzierte Zytokinsekretion und Replikation von RNA-Viren. 69
3.5.1.Infektionen mit Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität 69
3.5.1.1.Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität auf.....69
3.5.1.2.VSV repliziert in TRIM9-defizienten humanen 1205Lu- und Huh-7.5.-Zellen schlechter und induziert geringere Mengen an IP-10 als in WT-Zellen. 71
3.5.2.Infektionen mit Einzelstrang-RNA-Viren positiver Polarität.....73
3.5.2.1.Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit Einzel-

strang-RNA-Viren positiver Polarität auf. 74
3.5.2.2. SFV induziert in TRIM9-defizienten humanen 1205Lu-Zellen eine höhere Menge an IP-10 im Vergleich zu WT-Zellen. 76
3.6. Der Einsatz von siRNA zur gezielten Ausschaltung der Expression einzelner TRIM9-Isoformen hat eine unspezifische und vom Expressionsniveau unabhängige Wirkung auf die Replikation von VSV. 77
4. Diskussion 81
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse 81
4.2. Diskussion der Ergebnisse mit Bezug auf die Literatur 83
4.2.1. Gibt es speziestypische Unterschiede im Expressionsmuster von TRIM9? 83
4.2.2. TRIM9 und Hepatitis C 85
4.2.2.1. SNP “rs12879906” als potenzieller Modulator des Expressionsniveaus von TRIM9.....85
4.2.2.2. Der Phänotyp von TRIM9-KO-Zellen im Zuge einer Hepatitis C Infektion 87
4.2.3. TRIM9 Isoformen und molekularer Mechanismus der antiviralen Funktion.....88
4.2.3.1. Infragestellung der Ergebnisse der siRNA-vermittelten Ausschaltung der Expression einzelner TRIM9-Isoformen von Qin et al., Cell Research 2016: 88
4.2.3.2. Diskussion des von Qin et al., Cell Research 2016 vorgestellten Erklärungsmodells vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.....89
4.2.4. Limitationen der Methodik 91
4.2.4.1. TRIM9 Expressionsanalyse humaner Gewebeproben 91
4.2.4.2. siRNA-Knockdown und durchflusszytometrische Messung der Virusreplikation.....92
4.3. Beurteilung der klinischen Relevanz.....93
5. Zusammenfassung und Ausblick 94
6. Literaturverzeichnis 96
7. Abkürzungsverzeichnis 106
8. Danksagung 110
9. Veröffentlichungen 111

1. Einleitung

1.1. Genetische Varianz beeinflusst den interindividuellen Verlauf infektiöser Erkrankungen

1.1.1. Genetische Varianz im menschlichen Genom

Zu welchem Grad unterscheiden sich zwei Individuen genetisch voneinander? Philosophen des antiken Griechenlands sahen Unterschiede zwischen materiellen Körpern als Abweichungen von idealen Formen. Diese Sichtweise wurde erst durch die Theorie der natürlichen Selektion von Charles Darwin und die Formulierung der Mendelschen Vererbungsregeln seriös in Frage gestellt (Ellegren und Galtier 2016). Seitdem hat sich dank der zunehmenden Effizienz und Präzision der modernen Sequenzierungsverfahren unser Wissen zur natürlich vorkommenden genetischen Varianz deutlich erweitert. Das menschliche Genom besteht aus etwa $3{,}2 \times 10^9$ DNA-Basenpaaren (bp). Neueren Erkenntnissen des *1000 Genomes Project* zufolge unterscheidet sich ein typisches Genom von dem humanen Referenzgenom an circa 4,1 bis 5 Millionen *loci* und in mehr als 20 Millionen Basenpaaren; dies entspricht einem Unterschied von mehr als 0.6% (Genomes Project et al. 2015). Dabei kann man zwei Arten von Varianz im Genom unterscheiden: Während sog. strukturelle Varianten (z. B. große Deletionen oder Kopienzahlvarianten) mengenmäßig den größten Anteil der variablen Basenpaare ausmachen, besteht die am häufigsten anzutreffende Form genetischer Variabilität aus Unterschieden in einzelnen Basenpaaren. Wenn eine einzelne Basenpaarvariante an einem bestimmten *locus* im Genom in mindestens 1% der Individuen innerhalb einer Population vorliegt, spricht man von einem Einzelnukleotidpolymorphismus (engl. s*ingle nucleotide polymorphism*, SNP). Innerhalb kodierender DNA-Regionen werden synonyme von nicht-synonymen SNP (nsSNP) unterschieden; nsSNP verändern die Aminosäurensequenz der Proteine, für die sie kodieren. Obwohl die genetische Varianz des Menschen größtenteils biologisch insignifikant ist, können insbesondere nsSNP zu erheblichen Unterschieden in der Struktur, Funktion oder Expression der von ihnen abhängigen Proteine führen.

1.1.2. Ko-Evolution konkurrierender Organismen

Biologisch signifikante Variation kann evolutionäre Vor- oder Nachteile mit sich bringen. Ein klassisches Beispiel ist die Variante HBB-p.E6V im Gen der β-Globin-Protein-Untereinheit. Bei homozygoten Trägern führt sie zur Bildung von HbS-Hämoglobin und zum Vollbild der Sichelzellanämie, wohingegen heterozygote Menschen resistenter gegenüber einer Malariainfektion sind. Heutzutage geht man davon aus, dass die wesentliche treibende Kraft hinter der Verbreitung der HbS-verursachenden Mutation der

Selektionsdruck durch Plasmodium falciparum war (Rees et al. 2010). Dieses Beispiel zeigt, wie biologisch signifikante genetische Varianz von den jeweiligen Umweltbedingungen, insbesondere von dem Selektionsdruck durch andere (konkurrierende) Organismen abhängt.

Im Jahr 1973 formulierte der Evolutionsbiologe Leigh Van Valen die sogenannte “Red-Queen-Hypothese”. Ihr zufolge wird das Aussterberisiko von Arten maßgeblich dadurch bestimmt, dass sie einem durch ständige Veränderung ihrer Konkurrenten ausgeübten evolutionären Druck standzuhalten vermögen (Van Valen 1973). Namensgebend für die Hypothese war die Figur der in Lewis Carroll’s Kinderbuch “Alice hinter den Spiegeln” vorkommenden Roten Königin, die Alice gegenüber äußert: “Nun, hier musst du so schnell rennen, wie du kannst, wenn du am gleichen Fleck bleiben willst” (Carroll 1917). Die Hypothese wird herangezogen, um unter anderem das konstante koevolutionäre “Wettrüsten” zwischen Parasiten und Wirten zu erklären. Menschen und Mikroorganismen haben im Laufe ihrer Speziesgeschichte koexistiert und sich gemeinsam weiterentwickelt. Heutzutage ist allgemein anerkannt, dass der im Rahmen der Spezieskoevolution ausgeübte wechselseitige Selektionsdruck die genetische Varianz in beiden Gruppen maßgeblich beeinflusst hat (Siddle und Quintana-Murci 2014).

Viren werden als Organismen “am Rande des Lebens” beschrieben; sie unterliegen dennoch den gleichen Evolutionsprozessen wie Mikroorganismen im engeren Sinne (Modrow et al. 2010). So hat die Evolution virale Erreger hervorgebracht, welche der Erkennung durch das Immunsystem geschickt ausweichen bzw. antivirale Abwehrmechanismen der Wirtszelle aktiv unterdrücken können (Chan und Gack 2016). Die Entstehung solcher neuen pathogenen Erreger stellt nach wie vor eine ernsthafte Bedrohung für die weltweite Gesundheit dar. Dieses Phänomen manifestierte sich im Jahr 2020 in beispielloser und dramatischer Weise durch den Ausbruch der durch das *severe acute respiratory disease Coronavirus type 2* (SARS-CoV2)-Virus ausgelösten *coronavirus disease 19* (COVID-19)-Pandemie, welche zum Zeitpunkt des Schreibens weltweit über vier Millionen Todesopfer gefordert hatte und folgenschwere sozioökonomischen Auswirkungen nach sich zog.

Doch auch vor der COVID-19-Pandemie manifestierten sich Infektionsausbrüche mit signifikanten Auswirkungen auf die globale Gesundheit wie zum Beispiel die durch den H1N1-Subtyp des Influenza-A-Viruses ausgelöste Schweinegrippenpandemie von 2009 oder die Ebolafieber-Epidemie 2014 in Westafrika (Baize et al. 2014,Garten et al. 2009). Aus diesen Gründen ist heutzutage ein genaueres Verständnis der molekularen Mechanismen, die Viren zur Manipulation von Abwehrleistungen des Wirtes nutzen, und der genetischen Hintergründe, auf denen solche Mechanismen beruhen, von hoher Bedeutung.

1.1.3. Der Einfluss genetischer Faktoren des Menschen auf den Verlauf von Infektionserkrankungen

Historisch waren sich Wissenschaftler über Jahrhunderte hinweg nicht einig, ob Infektionskrankheiten auf extrinsische Faktoren oder auf eine intrinsische Störung zurückzuführen sind. Erst nach den bahnbrechenden Untersuchungen von Louis Pasteur und der Formulierung der Robert-Koch'schen Postulate schien sich Ende des 19. Jahrhunderts die extrinsische Sichtweise in Gestalt der Keimtheorie durchzusetzen (Casanova 2015). Doch es dauerte nicht lange, bis erste Zweifel an der Allgemeingültigkeit der Keimtheorie aufkamen. Die von Charles Nicolle und Clemens von Pirquet vorangetriebenen Entdeckungen von inapparenten bzw. latenten Infektionen im Zeitraum zwischen 1911 und 1927 bewiesen, dass Erreger zwar notwendig aber nicht ausreichend für den klinischen Ausbruch von Infektionen sind, und ebneten den Weg für die Ergänzung der Keimtheorie durch nachfolgende Erkenntnisse aus der Immunologie, der Ökologie und der Genetik (Casanova und Abel 2013).

Die Genetik als fester Bestandteil der Infektionspathogenese gewann seit den Fünfzigerjahren an Bedeutung. Heutzutage weiß man zum Beispiel, dass bestimmte außergewöhnliche Erscheinungsbilder von Infektionserkrankungen im Kindesalter in wesentlichem Maße auf angeborene monogenetische Immundefekte zurückzuführen sind. Außerdem konnten dank genomweiter Analysen genetische Polymorphismen mit günstigen oder nachteiligen Verläufen von Infektionserkrankungen in Assoziation gebracht werden. So konnten mittels sogenannter genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) genetische Varianten immunologisch relevanter Gene des Wirtes identifiziert werden, aus denen auf den Verlauf bzw. das Therapieansprechen von Infektionserkrankungen wie Tuberkulose, Infektionen mit dem humanen Immundefizienz-Virus (HIV) und dem Hepatitis-C-Virus (HCV) geschlossen werden kann (Azad et al. 2012,Clark und Thompson 2012,McLaren und Carrington 2015).

1.1.3.1. Genetische Polymorphismen beeinflussen die spontane Ausheilungsrate von Hepatitis-C-Infektionen

Die Infektion mit HCV kann akut und chronisch verlaufen. Die häufig klinisch inapparent bzw. mit unspezifischer Symptomatik verlaufende akute Hepatitis C geht in etwa 55-85% der Fälle in eine chronische Infektion über, welche bei einer variablen Rate von etwa 20-30% der Patienten nach Jahren in eine Leberzirrhose mündet; diese prädisponiert zur Entwicklung eines hepatozellulären Karzinoms mit einer Wahrscheinlichkeit von circa 1-4% pro Jahr (Lingala und Ghany 2015). Bei den verbleibenden 15-45% der Patienten kommt es nach akuter Hepatitis zur spontanen Ausheilung. Die Heterogenität hinsichtlich der spontanen Ausheilung ist auf diverse Einflussfaktoren zurückzuführen, welche sowohl das Virus als auch den Wirt betreffen und in mehreren Studien

der letzten Jahre systematisch ermittelt wurden. Dazu gehören unter anderem das Alter zum Zeitpunkt der Infektion, das Geschlecht, die ethnische Zugehörigkeit, der virale Genotyp und die individuellen genetischen Polymorphismen des Wirtes.

Polymorphismen im Bereich des für Interferon-λ3 kodierenden Interleukin-28B-Gens (IL-28B) stellten sich als besonders einflussreich heraus; sie scheinen sowohl die Spontanausheilungsrate als auch das Therapieansprechen auf pegyliertes Interferon und Ribavirin maßgeblich mitzubestimmen (Ge et al. 2009,Thomas et al. 2009). Neben IL-28B konnten einflussreiche SNP ebenso im Bereich anderer insbesondere für die angeborene Immunantwort relevanter Gene identifiziert werden (Gauthiez et al. 2017). Dazu zählen beispielsweise Polymorphismen im Bereich des *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA-5) oder des *2'-5'-oligoadenylate-synthase-like-protein*-Gens (OASL) (Hoffmann et al. 2015,Su et al. 2008). Zwei neuere Studien stellen einen Zusammenhang zwischen Polymorphismen in zwei Genen der *tripartite-motif-containing* -(TRIM)-Familie, TRIM5 und TRIM22, und einem verbesserten Therapieansprechen her (Medrano et al. 2016,Mobasheri et al. 2018). Die zwei TRIM-Proteine werden als virale Restriktionsfaktoren und als Teil der sogenannten intrinsischen Immunität (vgl. Fußnote auf Seite 14) verstanden. Die präzisen mechanistischen Erklärungen zur Verbindung zwischen genetischen Varianten und klinischem Verlauf bleiben im Falle von Hepatitis C größtenteils noch ungeklärt.

1.2. Viren treten in Wechselwirkung mit dem angeborenen Immunsystem ihres Wirtes

1.2.1. Viren: Definition und Klassifikation

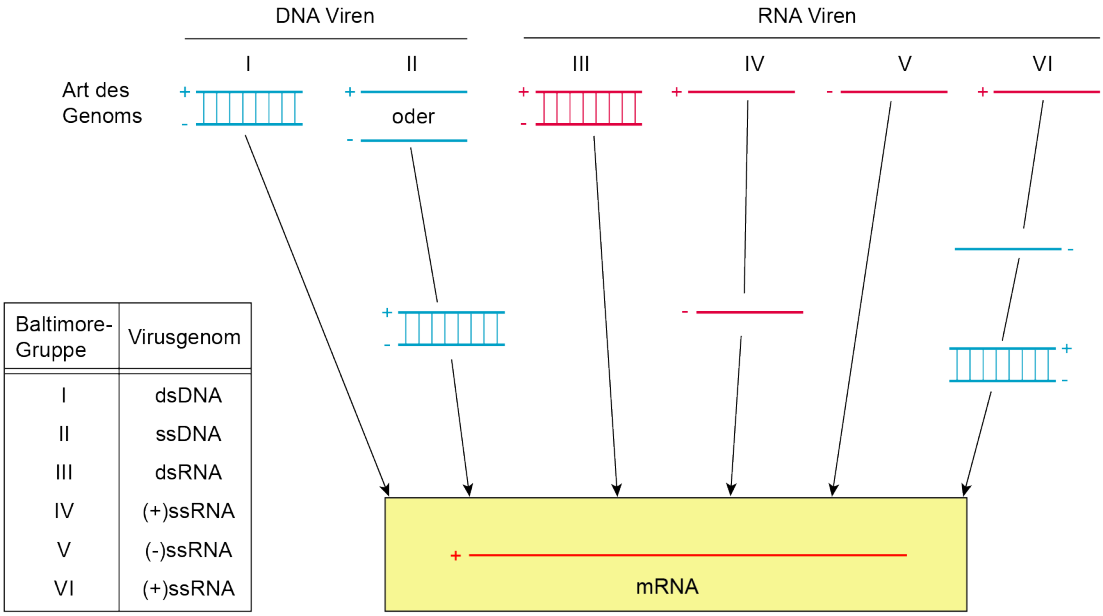
Ob es sich bei Viren um lebende Organismen handelt, ist nach wie vor umstritten (Koonin und Starokadomskyy 2016). Viren sind als obligate intrazelluläre Parasiten auf den Stoffwechsel und die biologische Maschinerie der Wirtszelle für ihre Vermehrung angewiesen und lenken deren Aktivität in eine Richtung, die von ihrem eigenen genetischen Material vorgegeben ist. Dieses kann, anders als bei allen anderen Organismen, nicht nur in Form von DNA sondern auch als RNA vorliegen.

Die mit einem Nobelpreis geehrte Entdeckung der reversen Transkription im Jahr 1970 unabhängig durch Howard Temin und David Baltimore eröffnete den Weg zu einem umfassenderen Verständnis der Prinzipien viraler Replikation (Baltimore 1970,Temin und Mizutani 1970). In der Natur vorkommende Viren verfolgen sechs unterschiedliche Strategien zur Synthese von mRNA. Anhand dieser Unterschiede lassen sich Viren entsprechend der Baltimore-Klassifikation in sechs Gruppen einteilen (Baltimore 1971) (vgl. Abbildung 1). Neben dieser replikationsstrategischen Einteilung lassen sich weitere Kriterien zur Virusklassifikation heranziehen. So können Viren anhand der molekulargeometrischen Struktur ihres Kapsids, des Vorhandenseins einer Lipiddoppelschichtumhüllung oder ihrer Größe eingeteilt werden. Der schwierigen Aufgabe der systematischen Virustaxonomie widmet sich heutzutage das Internationale Komitee für die Taxonomie von Viren (ICTV) (King et al. 2011).

1.2.2. RNA-Viren weisen eine hohe Mutations- und Evolutionsrate auf

Die Mehrzahl der heutzutage in der Natur vorkommenden Viren nutzen RNA als Baustein ihres genetischen Materials. Sie sind demnach auf RNA-abhängige RNA-Polymerasen für die Replikation ihrer genetischen Information angewiesen. Virale RNA-Polymerasen besitzen im Gegensatz zu DNA-Polymerasen zellulärer Organismen keine Korrekturlesefunktion (engl. *proofreading function*). Das Fehlen von Korrekturlesen geht mit einer erhöhten spontanen Mutationsrate im Zuge der Replikation einher (Holmes 2009). So mutiert zum Beispiel das Dengue-Virus mit einer Rate von etwa $2{,}65 \times 10^{-5}$ Mutationen je Nukleotid und Generation, wohingegen die Mutationsrate bei Wildtyp-Arten von Escherichia-coli-Bakterien etwa $2{,}2 \times 10^{-10}$ je Nukleotid und Generation beträgt (Bennett et al. 2003,Carrasco-Hernandez et al. 2017,Lee et al. 2012). Auf Basis ihrer hohen Mutationsrate lässt sich die bemerkenswerte Fähigkeit von RNA-Viren erklären, sich Umweltbedingungen evolutionär anzupassen und dem Selektionsdruck standzuhalten, der sich sowohl aus der Immunabwehr von Wirtsorganismen als

auch aus der modernen medikamentösen virustatischen Therapie ergibt (Carrasco-Hernandez et al. 2017).



Baltimore-Gruppe	Virusgenom
I	dsDNA
II	ssDNA
III	dsRNA
IV	(+)ssRNA
V	(-)ssRNA
VI	(+)ssRNA

Abbildung 1: Replikationsstrategische Klassifikation von Viren nach Baltimore. Klasse-I-Viren besitzen doppelsträngige (ds) DNA, die im klassischen Sinne geradlinig in mRNA transkribiert wird. **Klasse-II-Viren** sind einzelsträngige (ss) DNA-Viren und müssen erst doppelsträngige DNA bilden, um mRNA synthetisieren zu können. Klasse III bis VI sind RNA-Viren. **Klasse-III-Viren** besitzen doppelsträngige RNA, aus der sie einzelsträngige mRNA synthetisieren. Die einzelsträngigen **Klasse-IV-Viren** besitzen einen Positivstrang (5'→3') und können unverzüglich Proteinsynthese betreiben indem sie ihre genomische RNA als mRNA verwenden. Als Zwischenprodukte der Replikation entstehen mithilfe von RNA-abhängigen RNA-Polymerasen Negativstränge, die für die Herstellung von neuen genomischen RNA-Transkripten verwendet werden. **Klasse-V-Viren** besitzen den entsprechenden Negativstrang (3'→5'), der zuerst in einen Positivstrang transkribiert werden muss, bevor er zur Proteinsynthese verwendet werden kann. Die **Klasse VI** beinhaltet Viren, die mittels reverser Transkription ihre RNA zunächst in einzelsträngige und anschließend in doppelsträngige DNA umschreiben. Diese dient dann als Template zur Synthese von mRNA.

Graphische Illustration nachgezeichnet und modifiziert von: ibiology.org, Web-Seminar "Introduction to Viruses", Redner: David Baltimore.

1.2.3. Erkennung pathogen-assoziierter molekularer Muster (PAMP) durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems

1.2.3.1. Mustererkennungsrezeptoren - Überblick

Evolutionär konservierte Strukturen pathogener Erreger können von einer Vielzahl keimbahnkodierter Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden: Den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRR). PRR können auf Basis ihrer subzellulären Lokalisation und ihres Expressionsmusters in zwei Gruppen eingeteilt werden (Chan und Gack 2016,Wu und Chen 2014). Die erste Gruppe umfasst auf der Plasma- bzw. Endosomenmembran lokalisierte Rezeptoren, welche hauptsächlich von Immunzellen exprimiert werden. Die zweite Gruppe bilden ubiquitär exprimierte intrazelluläre Rezeptoren. Im Rahmen dieser Arbeit wurden PRR und ihre entsprechenden Signalwege aus beiden Gruppen untersucht, wobei der Fokus auf folgende - in der Abwehr gegen RNA-Viren besonders relevante - Rezeptorfamilien gerichtet war:

- Toll-*like*-Rezeptoren (TLR, insbesondere TLR-3, -7, -8,-9)
- *Retinoid-acid-inducible-gene-like*-Rezeptoren (RLR)
- *Cyclic GMP-AMP synthase (*cGAS)

Die Aktivierung jener Rezeptoren führt vermittelt über Adapterproteine wie dem *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS), dem *stimulator of interferon genes* (STING) oder dem m*yeloid differentiation primary response 88* (MyD88) zur Nukleustranslokation von Transkriptionsfaktoren wie *interferon regulatory factor* (IRF)-3, -7, *activator protein 1* (AP1) und *nuclear factor κB* (NF-κB). Daraufhin erfolgt die Induktion von Interferonen (IFN) und proinflammatorischen Zytokinen.

1.2.3.2. Toll-*like*-Rezeptoren: Liganden und Signalwege

Als Transmembranproteine ragen TLR in den Extrazellulärraum bzw. ins Endosomenlumen und erkennen molekulare Motive, die mit Bakterien, Viren oder Pilzen assoziiert sind (vgl. Tabelle 1). TLR-3, -7, -8 und -9 erkennen virale Nukleinsäuren, die über Endozytose in die Endosomen der Zelle aufgenommen werden. Die Ligandenbindung führt über zytoplasmatische Domänen der Rezeptoren zur Aktivierung von Adapterproteinen. Mit Ausnahme des TLR-3 verwenden alle anderen TLR MyD88 als Adapterprotein. TLR-3 bedient sich stattdessen des *TIR domain-containing adaptor-inducing interferon-β* (TRIF). Die zwei Moleküle *TIR containing adaptor protein* (TIRAP) und *TRIF related adaptor molecule* (TRAM) gehören ebenfalls zu den Adapterproteinen von TLR und entfalten ihre Wirkung in Kombination mit MyD88 oder mit TRIF. Über Wechselwirkungen zwischen den Adapterproteinen und ihren nachgeschalteten Proteinkinasen, Interleukin-1-assoziierte Kinase (IRAK)-1 *und* -4, werden Enzyme wie der TNF-Rezep-

Toll-*like*-Rezeptor	Ligand
TLR-1:TLR-2 Heterodimer	• Lipomannane (Mykobakterien) • Lipoteichonsäure (grampositive Bakterien) • β-Glucane (Bakterien & Pilze) • Zymosan (Pilze)
TLR-2:TLR-6 Heterodimer	
TLR-3	Doppelsträngige RNA (Viren, PolyI:C)
TLR-4	Lipopolysaccharid (LPS) (gramnegative Bakterien)
TLR-7 und -8	Einzelsträngige virale RNA
TLR-9	DNA mit nicht-methylierten CpG-Motiven (Bakterien, Viren)

Tabelle 1: Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten TLR und die spezifischen Motive (PAMP) bzw. künstlichen Liganden wie Zymosan, poly(I:C), LPS oder CpG-DNA, die zu ihrer Stimulation führen.

Tabelle modifiziert aus Murphy und Weaver 2018.

tor-assoziierter Faktor 6 (TRAF6) rekrutiert. Die TRAF-6-vermittelte Übertragung von Ubiquitinmolekülen auf Proteine hat die Bildung einer Plattform zur Folge, über die Signale weitergeleitet werden und nachgeschaltete Moleküle gebunden und aktiviert werden können. So wird die *transforming growth factor-β (TGF-β)-activated kinase 1* (TAK1) rekrutiert und auf der Signalplattform phosphoryliert. Sie setzt die Signalübertragung fort, indem sie die entscheidenden Phosphorylierungsschritte auf der Endstrecke des Signalwegs ausführt. Es folgt die Nukleustranslokation der Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1. Die Transkriptionsfaktoren IRF-3 und -7 werden stattdessen entweder direkt über die Signalplattform oder über andere zwischengeschaltete Proteine phosphoryliert (vgl. Abbildung 2).

1.2.3.3. RIG-I-*like*-Rezeptor-Aktivierung und MAVS-vermittelte Signaltransduktion

Die für die RLR-Gruppe namensgebende Helikase *retinoid acid-inducible gene I (*RIG-I) erkennt körperfremde virale RNA an einer Tri- oder Diphosphatgruppe am stumpfen 5’ Ende kurzer dsRNA-Abschnitte bzw. kurzer ssRNA-*Hairpins* (Goubau et al. 2014,Hornung et al. 2006,Schlee et al. 2009,Wu et al. 2013). Jene Triphosphat-Modifikation am 5’ Ende wird in der mRNA eurkaryotischer Zellen normalerweise durch den im Nukleus stattfindenden Vorgang des *cappings* bedeckt gehalten und signalisiert der Zelle die Anwesenheit von im Zytoplasma replizierenden Viren (Murphy und Weaver 2018). Von RIG-I werden RNA-Viren positiver sowie negativer Polarität erkannt - einschließlich der Flaviviren (z.B. des Hepatitis-C Virus), der Paramyxoviren, der Influenza-A-Viren, des Masern-Virus sowie des der Rhabdoviren-Gruppe zugehörigen *vesicular stomatitis*-Virus (VSV) (Kato et al. 2006,Melchjorsen et al. 2005,Yoneyama et al. 2015).

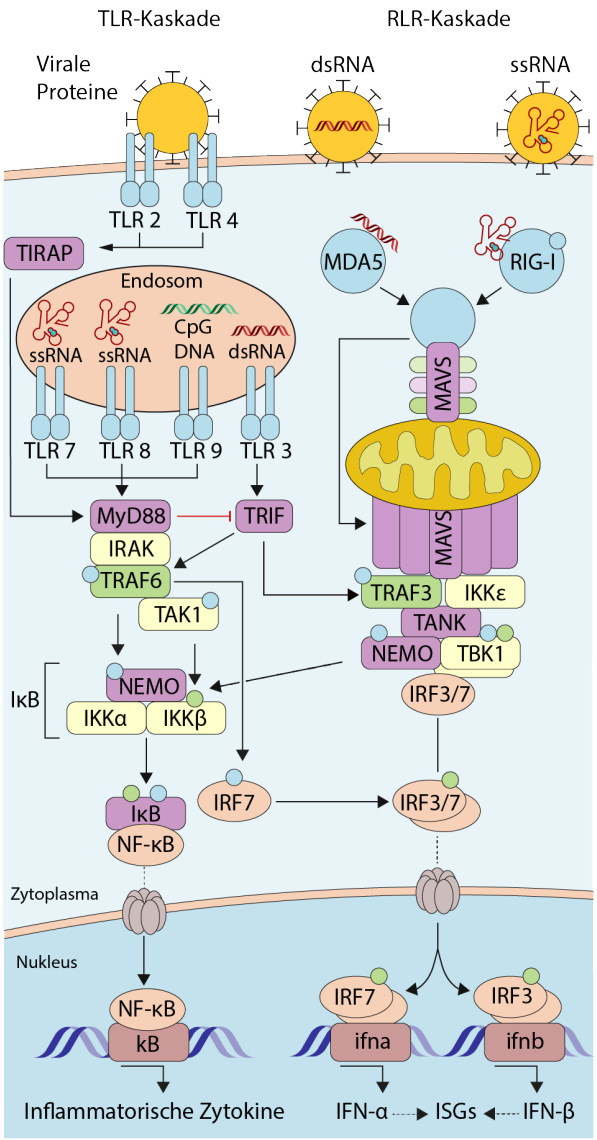


Abbildung 2. Schematische Darstellung der TLR- und RLR-Signalkaskaden. Durch PAMPs aktivierte PRRs (blau) binden an Adapterproteine (lila) und rekrutieren Proteinkinasen (gelb) und Ubiquitinligasen (grün), welche die Signalweiterleitung an Transkriptionsfaktoren (orange) regulieren. Aktivierte Transkriptionsfaktoren gelangen in den Nukleus und binden an Promotorelemente der DNA, um die Induktion von Typ-I-Interferonen und inflammatorischen Zytokinen einzuleiten. Blaue Kreise stellen Ubiquitinylierungen und grüne Kreise Phosphorylierungen dar. Schwarze Pfeile repräsentieren aktivierenden Einfluss. Rote Pfeile illustrieren Deaktivierung.

Abbildung nachgezeichnet und modifiziert nach Heaton et al. 2016.

Zu den RLR gehören zwei weitere Helikasen: *melanoma differentiation-associated 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) (Rodriguez et al. 2014). RIG-I und MDA5 weisen hohe Sequenz- und Strukturähnlichkeiten auf. Sie erkennen jedoch unterschiedliche PAMP und größtenteils unterschiedliche Gruppen von Viren. Im Gegensatz zu RIG-I scheint MDA5 lange doppelsträngige RNA-Moleküle zu erkennen, die entweder Teil viraler genomischer RNA sind oder als Zwischenprodukte der Replikation insbesondere von Picornaviren – wie beispielsweise dem Enzephalomyokarditis-Virus (EMCV) – entstehen (Kato et al. 2011,Wu et al. 2013). MDA5 bildet Filamente aus Oligomeren entlang langer RNA-Stränge (Wu et al. 2013). Künstlich hergestellte Polyinosin-Polycytosin-Säure [poly(I:C)] kann bei ausreichender Länge als Imitator langer doppelsträngiger RNA-Moleküle MDA5 aktivieren (Gitlin et al. 2006,Kato et al. 2011).

LGP2 scheint teilweise synergistisch mit MDA5 bei der Erkennung von Viren mitzuwirken (Bruns und Horvath 2015). Seine genaue Funktion ist jedoch nach wie vor unzureichend geklärt (Bruns und Horvath 2014,Yoneyama et al. 2015). Ein wesentlicher Unterschied zwischen LPG2 und den anderen RLR ist die bei LGP2 fehlenden N-terminalen Caspaserekrutierung-Domänen (CARD), welche für die Interaktion mit dem nachgeschalteten Adapterprotein MAVS (syn. *interferon-beta promoter stimulator 1,* IPS-1) und somit für die Signalweiterleitung verantwortlich sind (Rothenfusser et al. 2005,Yoneyama et al. 2015).

Das überwiegend auf der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisierte MAVS wird durch die Interaktion mit RLR aktiviert und bildet große MAVS-Proteinaggregate, welche der Ausbreitung und Verstärkung der Signalkaskade dienen (Goubau et al. 2013,Hou et al. 2011). Anschließend werden von MAVS mehrere TRAF-Proteine rekrutiert, welche sich als E3-Ubiquitinligasen an der Bildung von Lysin-63-Polyubiquitinketten beteiligen (Liu et al. 2013). Hiermit sind die Voraussetzungen für die Aktivierung der zytosolischen Kinasen IκB-Kinase-Komplex (IKK) und TANK-bindende Kinase 1 (TBK-1) und die anschließende Nukleustranslokation der Transkriptionsfaktoren NF-κB und IRF-3 erfüllt.

1.2.3.4. Erkennung körperfremder DNA über cGAS/STING und TLR-9

Dass fremde DNA, in Zellen eine Interferonantwort auslösen kann, wurde bereits 1963 von Alick Isaacs, dem Mitentdecker der Interferone, erkannt (Isaacs et al. 1963,Paludan et al. 2019). Genau fünfzig Jahre später, im Jahr 2013, beschrieben die Arbeitsgruppen von Zhijian Chen und Veit Hornung den hinsichtlich der IFN-Produktion bisher bedeutendsten DNA-Sensor cGAS und seine Verbindung zum Adapterprotein STING, dessen zentrale Rolle in der Induktion von Typ-I IFN bereits bekannt war (Ablasser et al. 2013,Burdette und Vance 2013,Sun et al. 2013,Wu et al. 2013). cGAS kann über zytosolische dsDNA aktiviert werden und leitet die Produktion von zyklischem Guanosin Monophosphat-Adenosin Monophosphat (cGAMP) ein. cGAMP leitet als *second messenger* das Signal an STING weiter, welches anschließend die Aktivierung von NF-κB und IRF-3 via TBK-1 vermittelt (Paludan et al. 2019). Neben cGAS wurden in den letzten Jahren mehrere andere DNA-Sensoren beschrieben. Zu ihnen gehört unter anderem der TLR-9-Rezeptor, welcher über nicht-methylierte CpG-Oligonukleotide aktiviert werden kann und ebenfalls zur Aktivierung von NF-κB und IRF-7 führen kann (Colonna 2007,Hemmi et al. 2000). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellen mit cGAMP zwecks direkter STING-Stimulation und mit CpG-DNA zur TLR-9-Stimulation behandelt.

1.2.4. Die über Mustererkennungsrezeptoren vermittelte Bildung von Interferon versetzt die Zelle und ihre Umgebung in einen antiviralen Zustand.

Die von PRR ausgehenden Signalkaskaden münden in die Bildung von Interferonen und einer Vielzahl anderer, an der Immunantwort beteiligten Zytokinen (unter anderem Tumornekrosefaktor-α, Interleukin-6) und Chemokinen. So scheint insbesondere die für Virusinfektionen typische Erkennung von Nukleinsäuren mit der Produktion von Typ-I-Interferonen gekoppelt zu sein (Stetson und Medzhitov 2006). Interferone werden auf Basis ihrer zugehörigen Rezeptorkomplexe in drei Klassen eingeteilt (Typ I-, II- und III-IFN). Die der Typ-I-Klasse zugehörigen Interferone-α und -β können von fast allen Zelltypen nach Aktivierung entsprechender PRR gebildet werden (Murphy und Weaver 2018,Schneider et al. 2014). Sezernierte IFN-α- und IFN-β-Moleküle können sowohl autokrin als auch parakrin an den Interferon-α-Rezeptor (IFNAR) auf der Zelloberfläche binden und dadurch den *Janus kinase signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT)-Signalweg aktivieren. Es folgt erst die Aktivierung und dann die Nukleus-

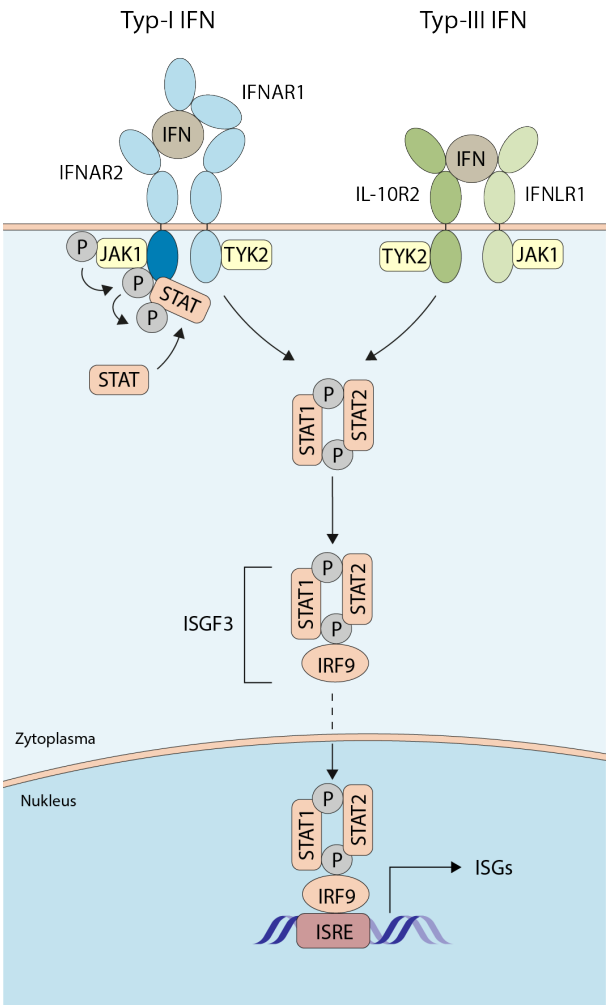


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Typ-I- und Typ-III-Interferon-Signalkaskade. Typ-I-Interferone vermitteln ihre Wirkung über IFNAR-1- und -2-Heterodimere. Typ-III-Interferone wirken auf Interleukin-10-Rezeptor-2-(IL-10R2)- und IFN-λ-Rezeptor-1-(IFNLR1)-Heterodimere. Die Bindung beider Typen von Interferonen an ihre entsprechenden Rezeptoren ruft die Phosphorylierungen der JAK1- und TYK2-Kinasen hervor, welche ihrerseits die Rezeptoren an bestimmten intrazellulären Tyrosin-Residuen phosphorylieren. Anschließend werden STAT-1 und -2 an den Rezeptor-Kinase-Komplex herangeführt und phosphoryliert. Sie assozieren miteinander und formen gemeinsam mit IRF-9 den ISGF-3-Komplex. ISGF-3 gelangt in den Nukleus, wo er an ISRE-Promotor-Elemente bindet und die Transkription einer Vielzahl von ISG einleitet.

Abbildung nachgezeichnet und modifiziert nach Schneider et al. 2014.

translokation des Transkriptionsfaktors *interferon-stimulated gene factor 3* (ISGF-3). Im Nukleus tritt der ISGF-3-Komplex in Wechselwirkung mit DNA-Sequenzen, die als *interferon-sensitive response elements* (ISRE) zusammengefasst werden und in Promotor- oder Enhancerregionen des Genoms zu finden sind (Schneider et al. 2014). Es kommt zur Induktion einer Vielzahl von sogenannter *interferon-stimulated genes* (ISG) deren Genprodukte entscheidend in den viralen Lebenszyklus sowie in die Koordination der Immunantwort des Wirtes eingreifen und somit gemeinsam zur Etablierung eines allgemeinen antiviralen Milieus beitragen (engl. *antiviral state*) (Stetson und Medzhitov 2006).

Typ-III-Interferone weisen gewisse Strukturähnlichkeiten mit Zytokinen aus der Interleukin-10-Familie auf. Die Bindung von Typ-III-Interferonen an das Rezeptor-Heterodimer aus dem Interleukin-10-Rezeptor-2 (IL-10R2) und dem Interferon-λ-Rezeptor-1 (IFNLR1) führt zur einer intrazellulären Signalkaskade und ISG-Induktion ähnlich wie bei Typ-I-Interferonen (Schneider et al. 2014). Jedoch zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Zytokinen beider Gruppen hinsichtlich der Kinetik und des Ausmaßes der ISG-Induktion (Bolen et al. 2014).

Inteferon-γ ist das einzige Mitglied der Typ-II-Interferon-Gruppe. Es wird im wesentlichen Maße durch Immunzellen gebildet und spielt eine entscheidende Rolle in der Immunregulation - insbesondere bei der Überleitung von der angeborenen zur erworbenen Immunabwehr (Schneider et al. 2014).

1.3. Die Rolle von TRIM-Proteinen in der antiviralen Immunität

1.3.1. TRIM Proteinfamilie

1.3.1.1. Definition und Strukturmerkmale

Die in allen vielzelligen Organismen vorkommende *tripartite-motif-containing*-Familie (TRIM) wird im menschlichen Organismus von mehr als 70 unterschiedlichen Proteinen gebildet. Hinsichtlich ihrer Struktur teilen die Mitglieder der Familie ein konserviertes N-terminales Grundgerüst, das durch die *RING-B Box-coiled-coil*-(RBCC)-Struktur gekennzeichnet ist. Am N-terminalen Ende befindet sich die *really-interesting-new-gene*-Domäne (RING), welche dazu fähig ist, Zink-Atome zu binden. Auf diese folgen eine bzw. zwei *B-box*-Domänen (BB), weiterhin eine *coiled-coil*-Domäne (CCD) und schließlich ein variabler C-Terminus. Dabei scheint die RING-Domäne vornehmlich für eine E3-Ubiquitinligaseaktivität verantwortlich zu sein (Joazeiro und Weissman 2000,Nisole et al. 2005). Die allermeisten TRIM-Proteine verfügen über eine oder zwei B-Box-Domänen, welche ebenfalls Zink-bindende Strukturmerkmale enthalten (Ozato et al. 2008). Die Präsenz einer CC-Domäne deutet auf Kreuzinteraktion und potenzielle Oligomerisation zwischen TRIM-Proteinen hin (Rajsbaum et al. 2014,Reymond et al. 2001).

TRIM-Proteine können anhand des strukturellen Aufbaus ihres variablen C-Terminus in Untergruppen klassifiziert werden (vgl. Abbildung 4). Die nicht TRIM-spezifische C-terminale Cos-Domäne kann die Bindung an Mikrotubuli des Zytoskeletts ermöglichen (Short und Cox 2006). Die unter den TRIM-Proteinen am häufigsten anzutreffenden C-terminalen SPRY- und PRY-SPRYDomänen können als Plattformen für Protein-Protein-Interaktionen dienen oder die Bindung an Nukleinsäuren vermitteln (van Gent et al. 2018). Im Gegensatz zur evolutionär konservierten SPRY-Domäne, welche auch in Pflanzen und Pilzarten zu finden ist, entstand die ausschließlich in Wirbeltieren anzutreffende fusionierte PRY-SPRY-Domäne später in der Evolution, wobei die Expansion der für diese Domäne kodierenden Gene Parallelen zur Expansion von Immunrezeptorgenen aufweist, die nach der Erscheinung von Mechanismen der adaptiven Immunität auftraten (Ozato et al. 2008). Die genauen Funktionen der restlichen Domänen bleiben weitgehend ungeklärt.

1.3.1.2. Allgemeine funktionelle Merkmale

Funktionell besitzen die meisten TRIM-Proteine als E3-Ubiquitinligasen die Fähigkeit, den Transfer von Ubiquitin auf Substrate zu katalysieren (Morreale und Walden 2016). Sie beteiligen sich an einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Funktionen: So sind sie unter anderem in Entwicklungsprozessen, in der Regulation des Zelltods und der Pro-

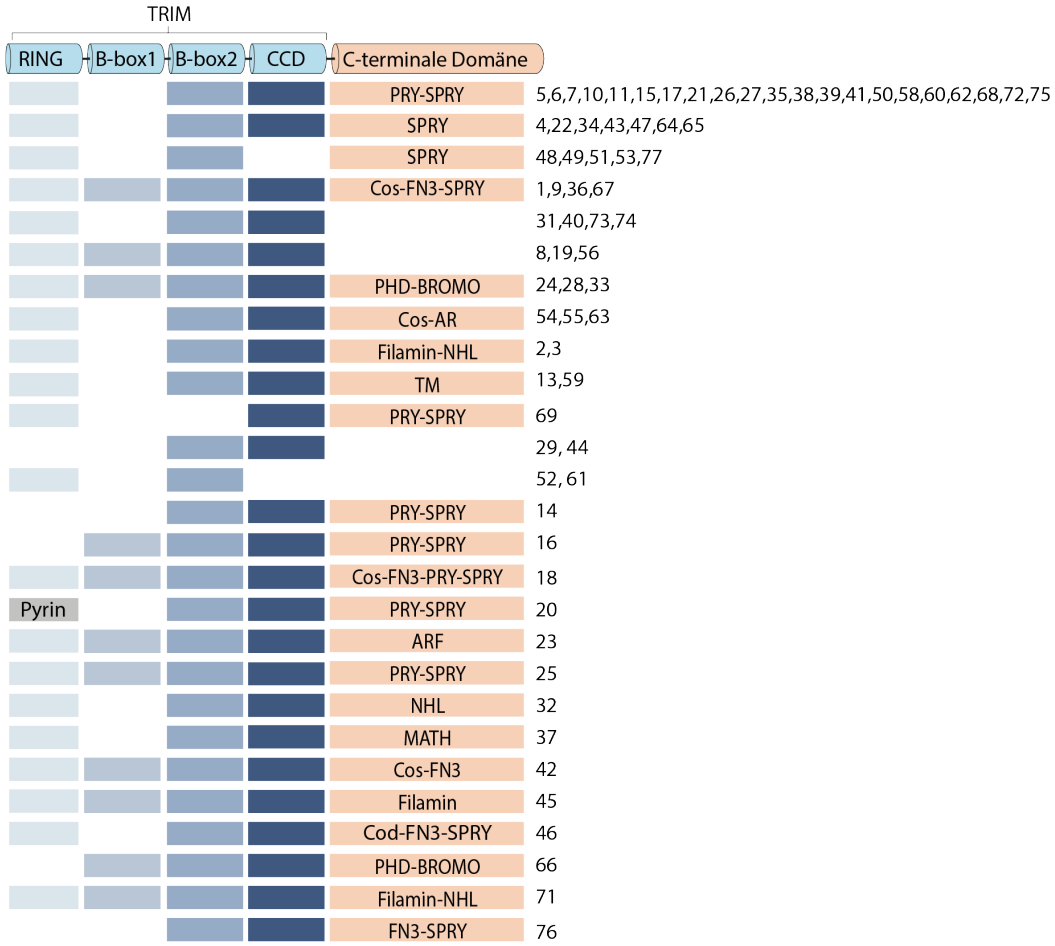


Abbildung 4. Struktureller Aufbau der TRIM-Proteinfamilie. TRIM-Proteine werden anhand ihrer Domänestruktur in mehrere Subgruppen klassifiziert. Die Nummerierung auf der rechten Seite bezieht sich auf die einzelnen TRIM-Proteine. Der N-terminale TRIM-Teil besteht aus einer *really-interesting-new-gene* Domäne (RING), einer bzw. zwei B-Box-Domänen, einer *coiled-coil*-Domäne (CCD), welche von einem C-terminalen variablen Rest gefolgt ist. TRIM-Proteine weisen mehrheitlich eine *SPRY-associated*-Domäne (PRY) und/oder eine *SPIa-and-the-ryanodine-receptor-Domäne* (SPRY) auf. Zu den C-terminalen Domänen zählen noch die *C-terminal-subgroup-one-signature*-Domäne (Cos), die *fibronectin-type-3*-Domäne (FN3), die *plant-homeodomain* (PHD), *die bromo*-Domäne (BROMO), die *acid-rich*-Region (AR), die *filamin*-Domäne, *NHL repeats* (NHL), eine Transmembrandomäne (TM), die *ADP-ribosylation -factor*-Domäne (ARF), und die *meprin-and-TNF-associated-factor-homology*-Domäne (MATH). Abbildung nachgezeichnet und modifiziert nach van Gent et al. 2018.

teinqualitätskontrolle, in der Autophagie, in der Onkogenese sowie in Signalkaskaden der angeborenen Immunität involviert (Hatakeyama 2017).

TRIM-Gene zeichnen sich durch extensives alternatives Splicing aus, welches die Synthese unterschiedlicher Transkripte und dementsprechend die Expression unterschiedlicher Isoformen zur Folge hat (Rajsbaum et al. 2014). Dadurch wird die Analyse der TRIM-Proteinfunktionen erschwert. Wie für mehrere TRIM-Proteine – einschließlich TRIM5, TRIM19 (syn. Promyelozytenleukämie Protein, PML) und letztens auch für TRIM9 – bereits demonstriert werden konnte, können spezifische TRIM-Isoformen des

gleichen Ursprunggens fundamental unterschiedliche Funktionen aufweisen (Battivelli et al. 2011,Nisole et al. 2013,Qin et al. 2016).

1.3.2. Antivirale Funktionen von TRIM-Proteinen

Die Bedeutung der TRIM-Proteine im komplex verflochtenen System der antiviralen Immunabwehr des Wirtes wurde mehrfach von wissenschaftlichen Untersuchungen der letzten Jahre hervorgehoben. Dabei werden die antiviralen Funktionen von TRIM-Proteinen in drei übergeordnete Kategorien unterteilt (van Gent et al. 2018,van Tol et al. 2017):

1. TRIM-Proteine können modulierend in PRR-abhängige Signalwege der angeborenen Immunität eingreifen (Versteeg et al. 2013).
2. Sie können als Restriktionsfaktoren und als Teil der sogenannten “Intrinsischen Immunität”[1] direkt mit dem Lebenszyklus von Viren interferieren (Nisole et al. 2005).
3. Sie können die Autophagie-vermittelte antivirale Abwehr regulieren (Sparrer und Gack 2018,van Tol et al. 2017).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zu TRIM9 im Hinblick auf eine mögliche Rolle innerhalb der ersten Kategorie durchgeführt.

1.3.2.1. TRIM-Proteine als Modulatoren angeborener Immunsignalwege

Die Signalwege des angeborenen Immunsystems unterliegen im Sinne der Gewährleistung der Immunhomöostase einer strengen Regulation durch post-translationale Modifikationen wie Ubiquitinylierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen (Chiang und Gack 2017). TRIM-Proteine sind maßgeblich an diesen Regulationsmechanismen beteiligt und können Signalwege verstärken oder abschwächen (positive bzw. negative Regulation) (Rajsbaum et al. 2014). Dabei ist die Funktion mancher TRIM-Mitglieder für einen reibungslosen Ablauf der Signalkaskaden unentbehrlich. So kontrolliert beispielsweise TRIM25 mittels der von ihm abhängigen K63-Ubiquitinylierung die Konformation von RIG-I, welche für die Wechselwirkung mit MAVS und somit für die Signalweiterleitung ausschlaggebend ist (Gack et al. 2007). TRIM14 greift entscheidend in den cGAS-STING-Signalweg ein, indem es die Degradation von cGAS hemmt (Chen et al. 2016). TRIM38 interagiert im Rahmen der TLR-Aktivierung mit TRIF und vermittelt über K48-Polyubiquitinylierung seine proteasomale Degradation (Hu et al. 2015). Im Rahmen des JAK-STAT-Signalwegs weisen manche TRIM-Prote-

[1]Als “Intrinsische Immunität” wird eine Reihe eukaryotischer Abwehraktivitäten bezeichnet, die von konstitutiv exprimierten und ggf. durch Virusinfektion induzierten Proteinen entfaltet werden. Dies erfordert in Abgrenzung zur angeborenen und adaptiven Immunität weder die Initiation immunologischer Signalkaskaden noch jegliche interzelluläre Kommunikation. Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 2004; 5:1109-15.

ine ebenfalls regulatorische Funktionen auf. Ein prominentes Beispiel hierfür ist TRIM6, welches mit der STAT1-phosphorylierenden IKKε-Kinase interagiert und dabei die Induktion einer IKKε-abhängigen ISG-Untergruppe fördert (Rajsbaum et al. 2014).

Das Interferon-induzierbare TRIM21 vermittelt die Degradation des DNA-Sensors *"DEAD-Box Helicase 41"* (DDX41) und kann somit als negativer Modulator der IFN-β-Antwort in Reaktion auf eine Exposition mit körperfremden dsDNA verstanden werden (Zhang et al. 2013). Interessanterweise kann eine Infektion mit dem Japanische-Enzephalitis-Virus (JEV) ebenfalls die Expression von TRIM21 induzieren und durch die TRIM21-vermittelte negative Regulation der IFN-β-Signalkaskade ein für die eigene virale Replikation vorteilhafteres Milieu schaffen (Manocha et al. 2014). Dieses Beispiel legt dar, wie Viren im Zuge der Evolution Mechanismen entwickelt haben, um die immunmodulatorischen Funktionen von TRIM-Proteinen für sich zu vereinnahmen bzw. in ihrem Sinne zu steuern. Außerdem ist dadurch ersichtlich, dass TRIM-Proteine die Immunantwort in Reaktion auf eine virale Infektion sowohl fördern als auch unterdrücken können.

1.3.2.2. TRIM9 als Modulator PRR-abhängiger Signalwege

TRIM9 scheint ebenfalls an Signalwegen der angeborenen Immunität beteiligt zu sein. Die Expression des auf Chromosom 14q22.1 lokalisierten Gens von TRIM9 führt in humanen und murinen Zellen auf Proteinebene zur Synthese zweier Isoformen: Einer langen (TRIM9l) und einer kurzen (TRIM9s) Isoform. Letztere weist 160 Aminosäuren weniger als TRIM9l auf und besitzt demzufolge die PRY-SPRY Domäne nicht (Qin et al. 2016,Tanji et al. 2010). Die ersten mittels mehrerer Screening-Verfahren erhobenen Daten zu TRIM9 aus immunologischer Perspektive ließen im Jahr 2013 eine fördernde Rolle von TRIM9l auf PRR-abhängige Signalwege erkennen. So führte zum Beispiel in HEK293T-Zellen die artifizielle Überexpression von TRIM9l zu einer potenten Induktion des ISRE-Promotors sowie zu einer schwächeren Induktion von IFN-β und NF-κB (Versteeg et al. 2013). Interessanterweise wurde ein Jahr später berichtet, TRIM9 blockiere die NF-κB-Aktivierung, indem es mit *β-Transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase* (β-TrCP) interagiere und seine Bindung an IκB verhindere (Shi et al. 2014). Im Jahr 2016 berichteten Qin et al. erstmals von TRIM9s und beschrieben einen fördernden Einfluss der kurzen Isoform von TRIM9 auf die IRF-3-vermittelte Typ-I-IFN-Antwort humaner Zellen im Rahmen einer Infektion sowohl mit RNA- als auch mit DNA-Viren (Qin et al. 2016). Der zugrundeliegende Mechanismus scheint die durch K63-autoubiquitinyliertes TRIM9s vermittelte Verbindung von TBK-1 mit der Glykogen-Synthase-Kinase-3-β (GSK-3β) sowie die nachfolgende IRF-3-Aktivierung durch verstärkt oligomerisiertes und autophosphoryliertes TBK-1 zu sein. Die gleiche Publikation berichtet von einer TRIM9s-vermittelten Suppression der NF-κB-Aktivierung und der davon

abhängigen Zytokinproduktion in Reaktion auf eine Infektion mit VSV und dem Herpes-simplex-Virus 1 (HSV-1).

TRIM9s scheint also nicht nur unterschiedliche, sondern sogar gegensätzliche Funktionen hinsichtlich der Regulation der NF-κB- und IRF-3-Aktivierung aufzuweisen. Während die NF-κB-Aktivierung mit der Induktion einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine (unter anderem IL-1β, IL-6, TNF-α) und nur einer schwachen Typ-I-IFN-Antwort einhergeht, zielt die Aktivierung von IRF-3 relativ spezifisch auf die Typ-I-IFN-Synthese ab. Die modulatorische Aktivität von TRIM9s scheint somit die Signalwege innerhalb der Zelle in eine eher antivirale Richtung zu lenken und die rein inflammatorischen Signale zu unterdrücken. Für eine andere E3-Ubiquitinligase, *neuregulin receptor degradation protein-1* (Nrdp-1), wurde ebenfalls gezeigt, dass sie in ähnlicher Weise die TRIF- und (weiter stromabwärts) TBK-1- und IRF-3-vermittelte Produktion von Typ-I-IFN fördert und gleichzeitig die MyD88- und NF-κB-abhängige Synthese proinflammatorischer Zytokine unterdrückt (Qin et al. 2016,Wang et al. 2009).

1.3.1. Die genetische Varianz in der TRIM-Protein-Familie verändert die Empfänglichkeit des Wirtes gegenüber viralen Erregern

SNP in den Genen mancher TRIM-Proteine können die Anfälligkeit von Wirtsorganismen gegenüber viralen Infektionen beeinflussen und sind als Indizien für das evolutionäre Wettrüsten zwischen Viren und Wirten zu verstehen. Dieser Zusammenhang wurde bisher am besten im Fall von TRIM5 und TRIM22 gegenüber HIV untersucht. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass eine einzige Aminosäurensubstitution in der Position R332P der Aminosäurensequenz der für die Immunabwehr gegen Retroviren bedeutsamen TRIM5α-Isoform des Menschen die Fähigkeit zur effektiven Restriktion der HIV-1-Replikation bestimmen kann (Yap et al. 2005). Die Proteinregion AA 332-340 der TRIM5α-Isoform weist die größten Unterschiede zwischen Menschen, Rhesusaffen und afrikanischen Grünmeerkatzen auf (Hatziioannou et al. 2004,Keckesova et al. 2004). Interessanterweise zeichnen sich Rhesusaffen- und afrikanische-Grünmeerkatzen-Sequenzen durch die Anwesenheit der Aminosäure Prolin in ebenjener Position AA 332 aus (Yap et al. 2005). Diese Spezies sind HIV-1 gegenüber resistent (Nomaguchi et al. 2008); demnach ist anzunehmen, dass möglicherweise im Zuge der Evolution Änderungen der Aminosäurensequenz stattfanden, welche die Empfänglichkeit des Menschen gegenüber HIV-1 maßgeblich beeinflussten (Yap et al. 2005).

Im Fall von TRIM22 konnten bisher zwei SNP mit einem Verlust der repressiven Effekte von TRIM22 auf die HIV-1-Transkription in Assoziation gebracht werden (Ghezzi et al. 2013). Kürzlich wurde ein weiterer SNP identifiziert, welcher die Expression von TRIM22 und dessen antivirale Aktivität gegenüber HIV-1 ebenfalls verändert (Kelly et al. 2014).

1.4. Vorarbeiten

1.4.1. Initiation des Projekts: TRIM9 als potenzieller Akteur in der antiviralen Immunität und die Assoziation eines SNP im Gen von TRIM9 mit dem Verlauf einer Hepatitis-C-Infektion

Vor Beginn der eigenen experimentellen Arbeit im April 2015 hatte sich unsere Arbeitsgruppe bereits über einen Zeitraum von etwa 18 Monaten mit dem der TRIM-Familie zugehörigen Protein TRIM9 beschäftigt. Zwei grundlegende Beobachtungen führten zur ursprünglichen Initiation des Projekts. Erstens veröffentlichten Versteeg, Rajsbaum et al. im Jahr 2013 die Ergebnisse eines Screenings zahlreicher TRIM-Proteine auf ihre mögliche Beteiligung an Signalwegen des angeborenen Immunsystems (Versteeg et al. 2013). Im Rahmen dieses Screenings wurde TRIM9 erstmals als potenziell immunstimulatorisch und antiviral aktives Protein beschrieben. Zweitens konnte eine bisher unpublizierte GWAS-Studie eines Kollaborationspartners einen SNP (PubMed-Referenz: “rs12879906”) in der 3’ untranslatierten Region (UTR) von TRIM9 mit höherer Wahrscheinlichkeit des spontanen Ausheilens von Hepatitis-C-Infektionen assoziieren (vgl. Abschnitt 3.2.1)[2]. Auf Basis dieser beiden Beobachtungen versucht unsere Arbeitsgruppe, die Rolle von TRIM9 in der angeborenen Immunität und im Zuge viraler Infektionen genauer zu charakterisieren. Dabei möchten wir herausfinden, an welcher Stelle TRIM9 bei der Aktivierung von Typ-I-IFN eingreift und wie es den Verlauf einer Virusinfektion, insbesondere den der Hepatitis-C-Infektion, beeinflussen kann. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten bereits neue Funktionen von TRIM9 in der Virusabwehr experimentell nachweisen. Diese Ergebnisse werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

1.4.2. Zusammenfassung der bis April 2015 durchgeführten und für diese Arbeit relevanten Vorarbeiten (Rückel 2018)

Ausgehend von der Assoziation des o.g. SNP in Basenposition 1379 der 3’UTR von TRIM9 mit der Spontanausheilung von Hepatitis C wurden die zwei unterschiedlichen SNP-Varianten mit Blick auf eine mögliche Affektion des Expressionsniveaus von TRIM9 untersucht. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die SNP-Variante, welche mit einem Vorteil in der Spontanausheilung von Hepatitis C assoziiert ist, zu einem höheren Expressionsniveau eines 5’ stromaufwärts der TRIM9 3’UTR gelegenen Reportergens führt. Dieser Zusammenhang lässt sich mutmaßlich auf das TRIM9-Expressionsniveau übertragen und weist auf eine eher antivirale Rolle von TRIM9 hin.

[2] Die genomweite Assoziationsstudie wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Ulrike Protzer am Institut für Virologie der Technischen Universität München durchgeführt.

Anschließend konnte eine Regulation der TRIM9-Expression auf Transkriptionsebene in Abhängigkeit von IFN-β bzw. von einer TLR-3-Stimulation festgestellt werden. Dabei schienen IFN-β und die TLR-3-abhängig induzierten Faktoren eine Suppression der Transkription von TRIM9 zu bewirken.

Weiterhin wurde *in vitro* das Expressionsniveau von TRIM9 artifiziell modifiziert und der Einfluss dieser Modifikation auf die virusinduzierte Interferonantwort und die virale Replikation untersucht. Nach Etablierung humaner TRIM9-*knock-out*-(KO)-Varianten der Zelllinien 1205Lu, A549 und HEK293T konnte im Rahmen von *in-vitro*-Experimenten gezeigt werden, dass bei ausgeschalteter TRIM9-Expression eine deutlich reduzierte Immunantwort auf (-)ssRNA-Viren zu beobachten ist. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Versteeg et al. 2013 überein. Dabei ging die reduzierte Interferonantwort im Falle von (-)ssRNA-Viren mit einer supprimierten Virusreplikation einher. Im Fall von (+)ssRNA-Viren zeigte sich hingegen eine durch die TRIM9-Defizienz bedingte Steigerung der virusinduzierten Immunantwort und eine Suppression der Virusreplikation. Ob eine primär gesteigerte Interferonantwort die Virusreplikation sekundär inhibiert, blieb ungeklärt.

Interessanterweise war kein genereller Unterschied in der Interferonantwort auf RLR-Stimulation zwischen humanen WT- und TRIM9-KO-Zellen festzustellen. Nach TLR-3-Aktivierung stellte sich die Interferonantwort in TRIM9-defizienten Zellen hingegen als gesteigert dar.

Des Weiteren konnte der in der Literatur vorbeschriebene negativ regulatorische Einfluss der langen Isoform von TRIM9 auf den in der angeborenen Immunabwehr zentralen NFκB-Signalweg experimentell bestätigt werden (Shi et al. 2014). In ähnlicher Weise war eine gesteigerte Aktivität von NFκB in TRIM9-defizienten Zellen zu beobachten, in denen die Expression beider Isoformen ausgeschaltet war.

Die Frage nach dem molekularen Wirkmechanismus der TRIM9-abhängigen fördernden Effekte auf die (-)ssRNA- bzw. (+)ssRNA-Virusreplikation blieb unzureichend beantwortet. Auf Basis dieser Fragestellung durchgeführte Experimente wiesen auf einen zumindest teilweisen Zusammenhang zwischen der gesteigerten NFκB-Aktivität und der supprimierten Virusreplikation in TRIM9-defizienten Zellen hin.

1.5. Fragestellung

Wie bereits angesprochen (vgl. Abschnitt 1.4.1) bildet erstens die von Versteeg et al. 2013 vorgeschlagene potenzielle Rolle von TRIM9 in der antiviralen Immunität und zweitens die Assoziation zwischen genetischer Varianz im Gen von TRIM9 und einem veränderten Verlauf von Hepatitis-C-Infektionen den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden die Funktionen von TRIM9 in Signalwegen des angeborenen Immunsystems und bei viralen Infektionen *in vitro* näher charakterisiert (vgl. Abschnitt 1.4.2) (Rückel 2018). Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage nach der kausalen Verbindung zwischen den *in vitro* beobachteten Einflüssen von TRIM9 auf die antivirale Immunabwehr und dem auf Populationsebene beobachteten Einfluss der Varianz im Gen von TRIM9 auf den Verlauf von Hepatitis-C-Infektionen. Im Rahmen dieser übergeordneten Fragestellung wurden in dieser Arbeit folgende spezifische Fragen bearbeitet:

I. In welchen Geweben und Zellarten wird TRIM9 exprimiert? Auf Grund der vermuteten Rolle von TRIM9 im Rahmen von Hepatitis-C-Infektionen wurde das Expressionsmuster von TRIM9 in unterschiedlichen Geweben - insbesondere in der Leber - untersucht. Für diese Fragestellung wurde das bereits im neurowissenschaftlichen Kontext beschriebene Modell der TRIM9-KO-Maus verwendet (Winkle et al. 2014).

II. Gestützt auf den bereits festgestellten Einfluss der TRIM9 3'UTR auf die Spontanausheilungsrate von Hepatitis C und auf die Expression des 5' von ihr gelegenen Gens, sollte untersucht werden, ob zusätzlich zu dem bereits untersuchten SNP ein weiterer in der TRIM9 3'UTR gelegener SNP (rs1049371) ebenfalls eine Rolle bei der TRIM9-Expression spielt und die Allelhäufigkeitsverteilung beider SNP in einem Hepatitis-C-Patienten-Kollektiv mit dem Verlauf der Infektion korreliert.

III. Welchen Einfluss hat das Fehlen von TRIM9 auf die *in-vitro*-Infektion einer humanen Hepatomzelllinie (Huh-7) mit dem Hepatitis-C-Virus? Experimente zu dieser Frage wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Protzer (TU München) durchgeführt.

IV. Gibt es bezüglich des Fehlens von TRIM9 Spezies-spezifische Unterschiede mit Blick auf die virusinduzierte Immunantwort und die Virusreplikation zwischen Mauszellen und humanen Zellen?

V. Gibt es für die von Qin et al. 2016 beschriebenen Isoformen von TRIM9 spezifische Funktionen im Kontext viraler Infektionen?

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Tabelle 2:	
Geräte	**Hersteller**
Alpha *Imager*	Alpha Innotec, San Leandro (USA)
CO_2-Brutschrank BBD 6220	Heraeus, Hanau (D)
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim (D)
Durchflusszytometer BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Eismaschine	Manitowoc Company, Manitowoc (USA)
Fluoreszenzmikroskop Axio Vert.A1	Zeiss, Oberkochen (D)
Gefrierschrank -80 °C	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Heraeus *Multifuge* 3L-R	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Heraeus *Multifuge* 4KR	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Image Reader LAS-4000	Fujifilm, Minato (Japan)
Kühl- und Gefrierschränke -4 °C, -20 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (D)
Laminar Air Flow Werkbank HB 2472 S	Heraeus, Hanau (D)
Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen (D)
Light Cycler 480 II	Roche, Basel (CH)
Mithras LB940 *Microplate Rea*der	Berthold Technologies, Bad Wildbad (D)
NanoDrop 2000C *Spectrophotometer*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
pH-Meter	WTW, Weilheim (D)
Pipetus	Hirschmann, Eberstadt (D)
PowerPac Basic Spannungsquelle	Biorad, Hercules (USA)
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen (D)
T3 *Thermocycler* Tripleblock	Analytik Jena, Jena (D)
Thermomixer *compact/comfort*	Eppendorf, Hamburg (D)
Thermoshake	Gerhardt, Königswinter (D)
Ultra-TURRAX®	IKA, Staufen im Breisgau (D)
UV *Transilluminator*	LKB Bromma, Schweden (D)
UV *Crosslinker* CL-1000	Analytik Jena, Jena (D)
Vortexer	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Waage	Sartorius Industries, Göttingen (D)
Wärmeschrank B290	Heraus, Hanau (D)

Tabelle 2:	
Geräte	**Hersteller**
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen (D)

2.2. Allgemeine Materialien

2.2.1. Reagenziensätze

Tabelle 3:		
Verfahren	**Reagenziensätze**	**Hersteller**
Proteinmengen-quantifizierung	DC™ *Protein Assay (Bradford Assay)*	Biorad, Hercules (USA)
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	Humanes IL-6 ELISA Set	BD Biosciences, Heidelberg (D)
	Humanes IP-10 ELISA Set	
	Murines IL-6 ELISA Set	
	Murines IP-10 ELISA DuoSet	R&D Systems, Minneapolis (USA)
DNA Extraktion	GeneJET *Plasmid Miniprep Kit*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
	PureYield™ *Plasmid Maxiprep System*	Promega, Fitchburg (USA)
	peqGOLD *Gel Extraction Kit*	Peqlab, Erlangen (D)
Mutagenese	Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit*	New England Biolabs, Ipswich (USA)
RNA Extraktion	peqGOLD *Total RNA Kit*	Peqlab, Erlangen (D)
Organlysate	peqGOLD TriFast™	
cDNA-Transkription	RevertAID™ *First Strand cDNA Synthesis Kit*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

2.2.2. Chemikalien und Verbrauchsmittel

Tabelle 4: cDNA-Synthese und qRT-PCR	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
Flüssiger Stickstoff	Klinikumsapotheke, München (D)
Desoxynukleotidtriphosphate	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
KAPA *Probe Fast Universal Master Mix*	Kapa Biosystems, Wilmington (USA)
Oligo(dT)-Primer	Metabion, Martinsried (D)
Reverse Traskriptase (RevertAid)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
RNAase-Inhibitor Ribolock	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 5: Zytokin-Quantifizierung mittels *Enzyme-linked immunosorbent assay*	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
BD OptEIA ELISA Substrat	BD Sciences, Heidelberg (D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Sciences, Carlsbad (USA)
Natriumhydrogencarbonat $NaHCO_3$	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumcarbonat Na_2CO_3	Merck, Darmstadt (D)
Natriumoxid NaOH	Roth, Karlsruhe (D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel (CH)
Schwefelsäure	LMU Klinikumsapotheke, München (D)
Tween-20 Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe (D)
Tetramethylbenzidin / Hydrogenperoxid	BD Sciences, Heidelberg (D)

Tabelle 6: Transfektionsreagenzien	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
Lipofectamine2000	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Lipofectamine RNAiMax	Invitrogen, Carlsbad (USA)
Opti-MEM	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
TransIT-X2	Mirus, Madison (USA)

Tabelle 7: Gewinnung, Vervielfältigung, Modifikation und Visualisierung von DNA	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
6x DNA *Loading Dye*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Calcium-Dihydrat	Roth, Karlsruhe (D)
DNA stain clear G	Serva, Heidelberg (D)
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
Kompetente recA defiziente Bakterien: DH5alpha	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
LB Medium / LB Agar	Roth, Karlsruhe (D)
LE-Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (D)
Manganchorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe (D)
NucleoBond Xtra Maxi Plus EF	Macherey-Nagel, Düren (D)
O'Gene Ruler DNA *Ladder Mix*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Phusion *High-Fidelity Polymerase*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Q5 *High-Fidelity DNA Polymerase*	New England Biolabs, Ipswich (USA)
QuickExtract™ DNA *Extraction Solution*	Epicentre, Madison (USA)
Restriktionsenzym BsmBI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
SOC Medium (Super Optimal broth + 20 mM Glucose)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
T4-DNA-Ligase	Promega, Fitchburg (USA)
T4-DNA-Ligasepuffer	Promega, Fitchburg (USA)
T7-Endonuclease I	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Taq-DNA-Polymerase	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)

Tabelle 8: **Dualer *luciferase assay***	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
Acetyl-Coenzym A-Trilithiumsalz	AppliChem, Gatersleben (D)
Adenosin-5'-Triphosphat-Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Coelenterazine	Promega, Fitchburg (USA)
EDTA (pH 8.0) USB	Corporation, Cleveland (USA)
Magnesiumcarbonathydroxid	Sigma-Aldrich, St. Luis (USA)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe (D)
Passive Lysis Buffer 5x	Promega, Fitchburg (USA)
SensoLyte pNPP *Secreted Alkaline Phosphatase Reporter Gene Assay* „Luminometric“	ANASPEC/EGT, Freemantle (USA)
Tricine	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Tabelle 9: **Zellkultur, Zellisolation und Organlysate**	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Lonza, Basel (CH)
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI)	Lonza, Basel (CH)
Fötales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
HEPES-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
L-Glutamin	Lonza, Basel (CH)
Natrium-Pyruvat	PAA, Pasching (AT)
Opti-MEM	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Penicillin-Streptomycin (10,000 U/mL)	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel (CH)
Sterile NaCl-Lösung 0,9 %	B. Braun, Melsungen (D)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin	Lonza, Basel (CH)
Tryptose-Phosphat-Broth-Lösung	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Polybrene	Merck, Kenilworth (USA)
Flüssiger Stickstoff	Klinikumsapotheke, München (D)

Tabelle 10: Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) und *Western blot*	
Chemikalien und Verbrauchsmittel	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Acrylamidstammlösung (30%)	Roth, Karlsruhe (D)
Ammonium Persulfat (10%)	Roth, Karlsruhe (D)
Bovines Serum Albumin	Roth, Karlsruhe (D)
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe (D)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Glycerol	Roth, Karlsruhe (D)
Glycin	Roth, Karlsruhe (D)
Methanol	Merck, Darmstadt (D)
Milchpulver	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid NaCl	Roth, Karlsruhe (D)
Protease Inibitor Cocktail P8340	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
SuperSignal *West Pico Chemiluminescent Substrate*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
SuperSignal *West Femto Sensitivity Substrate*	ThermoFisher Scientific, Waltham (USA)
Tetramethylethylendiamin	Roth, Karlsruhe (D)
Transfermembran, Porengröße 45 µm	Merck, Darmstadt (D)
Tromethamin (TRIS)	Roth, Karlsruhe (D)
Tween-20	Roth, Karlsruhe (D)

2.2.3. Zusammensetzung von Puffern, Lösungen und Medien

Tabelle 11: Agarose-Gelelektrophorese		
TAE Puffer (50x)		
242,3 g/l Tromethamin (TRIS)	17,51 Vol.% Essigsäure	18,61 g/l EDTA-2Na-2H_2O (Titriplex III) in Wasser

Tabelle 12: *Enzyme linked immunosorbent assay*		
Assay diluent	**Waschpuffer**	***Coating* Puffer**
10 Vol.% FCS in PBS	0,05 Vol.% Tween-2 in PBS	0,1 M Natriumkarbonat pH 9,5 in Wasser

Tabelle 13: Zellkultur		
DMEM Vollmedium	**RPMI Vollmedium**	**BHK-Vollmedium**
10 Vol.% FCS	10 Vol.% FCS	10 Vol.% FCS
10 mM L-Glutamin	10 mM L-Glutamin	10 mM L-Glutamin
100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin	100 U/ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin	100 µg/ml Streptomycin
Für die Kultivierung von MEF wurde zusätzlich mit 0.1 mM β-Mercaptoethanol supplementiert	1 mM/l Natrium-Pyruvat	1 Vol. % Tryptose-Phosphat-Lösung (29,5 g/l) in DMEM
Zellkulturflaschen und -platten sowie andere Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von folgenden Firmen erworben:		
Millipore, Billerica (USA)	Greiner Bio-One, Kremsmünster (D)	
Sartorius, Göttingen (D)	BD Falcon, Franklin Lakes (USA)	
Corning, Corning (USA)	Becton Dickinson, Heidelberg (D)	

Tabelle 14: Bakterienkultur		
LB-Medium	**LB-Selektionsmedium**	**Inoue Transformations-puffer**
10 g/l Trypton	LB-Medium	55 mM Manganchlorid-Tetrahydrat
5 g/l Hefeextrakt	100mg/l Ampicillin	15 mM Calciumchlorid Dihydrat
10 g/l NaCl in Wasser		250 mM KCl
		10 mM PIPES (0.5 M, pH 6,7) in Wasser

Tabelle 15: *Luciferase assay*	
***Firefly-Luciferase* Substrat**	
20 mM Tricine	0,265 mM Magnesiumcarbonathydroxid in Wasser
0,53 mM ATP	2,67 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat
0,1 mM EDTA, pH 8,0	131,6 µg/ml Luciferin
33,3 mM Dithiothreitol	5 mM Natriumhydroxid
270 µM Acetyl-Coenzym A	

Tabelle 16: *Western blot*		
Laufpuffer	**Transferpuffer**	**TBST Puffer (1x)**
192 mM Glycin	100 mM Glycin	50 mM TRIS
25 mM TRIS	10 mM TRIS	150 mM NaCl
3,47 mM SDS	20 Vol.% Methanol in Wasser	0,1 Vol.% Tween-20
Gelöst in Wasser		pH Einstellung 7,6 in Wasser

***Resolving gel* Puffer (4x)**	***Stacking gel* Puffer**	***Blocking* Puffer**
1,5 M TRIS	250 mM TRIS	5 Vol.% Milchpulver in TBST
13,87 mM SDS	13,87 mM SDS	
pH Einstellung 8,8 in Wasser	pH Einstellung 6,6 in Wasser	

Laemmli Puffer (6x)	**Zelllysepuffer (RIPA)**
1,2 g SDS	150 mM NaCl
2 mg Bromphenolblau	25 mM TRIS-HCl
4,7 ml Glycerol	Proteaseinhibitor, P8340, 1:100
4,2 ml von 0,5 M TRIS (pH 6,8)	2 mM Na_3VO_4
0,93 Dithiothreitol	0,1 Vol.% SDS in Wasser
4,1 ml Wasser	

2.3. Projektspezifische Materialien

2.3.1. Zelllinien

Tabelle 17: Zelllinien			
Zelllinie	**Zellart**	**Verwendetes Medium**	**Herkunft**
1205Lu	Humane Melanomzelllinie, isoliert aus einer Lungenmetastase	DMEM Vollmedium	Zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Besch, Ludwig-Maximilians-Universität München
Huh 7.5	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie Mutation in RIG-I, Suszeptibilität auf HCV-Infektion	DMEM Vollmedium	Zur Verfügung gestellt von Prof. Ulrike Protzer, TU München und Prof. Charles M. Rice, Rockefeller University, New York City, USA
BHK21	Embryonale Nierenfibroblastenzelllinie Hamsterursprungs	BHK Medium	Bezogen von *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA)
L929	Murine Fibroblastenzelllinie	RPMI Medium	Zur Verfügung gestellt von Prof. Sebastian Kobold, Ludwig-Maximilians-Universität München
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	DMEM Vollmedium	Bezogen von *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA)
A549	Humane Adenokarzinomzelllinie (alveolär-epithelial)	DMEM Vollmedium	Bezogen von *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA)
HepG2	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie	DMEM Vollmedium	Bezogen von *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, USA)

2.3.2. Zuchttiere

Alle verwendeten männlichen und weiblichen Mäuse hatten einen C57BL/6J Hintergrund. Die ursprüngliche TRIM9-Knock-Out Mauslinie wurde bei der University of North Carolina, in Chapel Hill, gezüchtet und mit freundlicher Genehmigung von Dr. Stephanie Gupton erworben. Die Zucht wurde nach Genehmigung der zuständigen Behörden (Regierung von Oberbayern) in einem geeigneten Tierstall der Ludwig-Maximilians-Universität Universität München fortgesetzt. Für die experimentellen Zwecke der vorliegenden Arbeit wurden TRIM9-Knock-out (KO) und altersgleiche Wildtyp-(WT)-Mäuse von der gleichen Mauslinie verglichen. Die gentechnische Herstellung der KO-Mäuse ist bereits von Winkle et al. beschrieben (Winkle et al. 2014).

2.3.3. Antikörper

Tabelle 18: Antikörper			
Erkanntes Protein	**Klonalität**	**Ursprung**	**Hersteller und Artikelnummer (A-Nr.)**
TRIM9	polyklonal	Hase	ProteinTech, Chicago (USA) A-Nr. 107861-AP
GAPDH	monoklonal (Klon 6C5)	Maus	Merck Millipore, Darmstadt (D) A-Nr. CB1001-5000UG
β-Actin-HRP	monoklonal (Klon C4)	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA) A-Nr. SC-47778
2°Maus Fc(IgG)-HRP	polyklonal	Ziege	Biorad, Hercules (USA) A-Nr. 1721011
2°Hase Fc(IgG)-HRP	Polyklonal	Ziege	Biorad, Hercules (USA) A-Nr. 1706515 / 1721019

2.3.4. PCR-Primer

Tabelle 19: PCR-Primer		
Primersequenz 5'→3'	**Verwendungszweck**	**Annealing Temp. (°)**
CTGGTGCAGACCCCAG	Sequenzierung: Bestätigung der Mutationen an der CRISPR-Target-Stelle	-
CAACTCCTCTTCCATCTCCTC		
GGAAATGGGCAAGGGTCAAAGAG	Sequenzierung: Bestätigung der Punktmutation am SNP rs1049371 im Rahmen der Mutagenese der TRIM9 3'UTR	-
CACAGAGCTAGCGCCTCTC	Amplifikation der CRISPR-Ziel-region	67°
TACGCGATTCTTGGGGAAGC		
CGACGGTATCGATAAAGC-TAGCTTGG	Genotypisierung der TRIM9-KO-Mäuse	64°
CGTGAGAGCTGCTTTCTTATTGG		
CGACGGTATCGATAAAGC-TAGCTTGG		
GGAAATGGGCAAGGGTCAAAGAG	Sequenzierung der 3'UTR von TRIM9	-
ACAGCCTAATATTCTGGATAG	Q5-Mutagenese der Reporter-plasmide	63°
GAATGGCAGCAGAGTGGA		
Die Primer für die Q5-Mutagenese wurden mithilfe des Webtools "NEBase Changers" entworfen.		
Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion, Planegg (D), bezogen.		

2.3.5. Plasmide

Tabelle 20: Reporterplasmide				
Promotor	***Reporter***	**3'UTR**	**Vektorrückgrat**	**Hersteller**
SV-40	Gauss'-sche Luci-ferase	TRIM9 3'UTR ("A-T" an Position bp 1379)	pEZX-MT05	Genecopoeia, Rockville (USA)
		TRIM9 3'UTR ("G-C" an Position bp 1379)		
		TRIM9 3'UTR ("G-C" an Position bp 1339)		
		TRIM9 3'UTR ("A-T" an Position bp 1339)		
CMV-F	-		pcDNA3.1 (Leer-vektor)	Invitrogen, Carlsbad (USA)

Tabelle 21: CRISPR-Plasmide				
Vektorrückgrat	**Selektions-marker**	**Gen/*Insert***	**Urheberlabor**	**Hersteller**
lentiCRISPRv2	Puromycin (eukaryot.) Ampicillin (prokaryot.)	P2A-Puro Cas9	Feng Zhang lab, Broad Institute, Cambridge, USA	Addgene, Watertown (USA)
pCMV_R8.74	Ampicillin	HIV-1 gag, pol		
pVSV.G	Ampicillin	VSV-G Hüllpro-tein (Pseudo-typisierung)		

Das in dieser Arbeit verwendete lentiCRISPRv2-Plasmid wurde von Feng Zhang und Kollegen entwickelt (Sanjana et al. 2014,Shalem et al. 2014).

2.3.6. qRT-PCR Primer und Sonden

Tabelle 22: qRT-PCR Primer und Sonden:		
Primersequenz 5'→3'	**UPL-Sonde**	**Ziel mRNA**
l: TGGATTTCGTGCAAGTGAAA	55	TRIM9 (human) l: komplementär zu Sequenz in Exon 5 r: komplementär zu Sequenz in Exon 6
r: CCAGCTGTAGGATAGGGGTTG		
l: ACGACAAAGCTTGGGCAATA	44	TRIM9 (murin)
r: CTTTCTGTTTAAGTCGAGGAGGA		
l: CCAACCGCGAGAAGATGA	64	β-Actin (human)
r: CCAGAGGCGTACAGGGATAG		
l: CTAAGGCCAACCGGGAAAAG	64	β-Actin (murin)
r: ACCAGAGGC ATA CAG GGA CA		
Die verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion, Planegg (D), bezogen. Die verwendeten Hybridisierungssonden stammen von der Universal Probe Library (UPL) der Firma Roche, Basel (CH).		

2.3.7. siRNA

Die folgenden siRNAs wurden von der Firma Metabion, Planegg (D), bezogen.

Tabelle 23: siRNA		
Name der siRNA	**Sense-Sequenz 5'→3'**	**Verwendungszweck**
Control-siRNA (Co-siRNA)	GCGCUAUCCAGCUUACGUA	Kontrolle gegenüber der RLR-Stimulation bei Experimenten, in denen immunstimulatorische RNA transfiziert wurde
TRIM9 #58	CUGGACAAGAUGAGCCUAU	*Knock-down* beider Trim9-Isoformen
TRIM9 #95	CUGGACAAGAUGAGCCUAUUU	*Knock-down* beider Trim9 Isoformen
TRIM9l #1	CCACCCUGAUCCUGCCUUU	Gezielter *knock-down* der langen Isoform von Trim9
TRIM9l #2	GCAAUGUAUGUGGACAAUA	Gezielter *knock-down* der langen Isoform von Trim9
TRIM9s #1	GCAGUACCCUCAGAGCGA	Gezielter *knock-down* der kurzen Isoform von Trim9
TRIM9s #2	GCGAGAACUGCGUGGCAUC	Gezielter *knock-down* der kurzen Isoform von Trim9

2.3.8. CRISPR-sgRNA

Tabelle 24: CRISPR-sgRNA		
Zielsequenz 5'→3'	**Target**	**Orientierung**
GCGGCTATGGCTCCTACGGG	Bp 227-249 in Exon1	forward
CCCGTAGGAGCCATAGCCGC		reverse

2.3.9. Viren

Tabelle 25: Viren				
Virus-Name	**Gattung**	**Polarität**	**Besonderheiten**	**Herkunft**
Vesicular stomatitis-Virus (VSVwt)	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	Indiana Stamm, wenig Induktion von Typ-I-IFN in der Zellkultur	Zur Verfügung gestellt von Prof. Anne Krug, Ludwig-Maximilians-Universität München
Vesicular stomatitis-Virus (VSVwt)	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	GFP-markiertes P-Protein	Zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Ebert, Technische Universität München
Vesicular stomatitis-Virus M51R	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	Die M51R-Mutation ermöglicht eine verstärkte Immunantwort	Zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Ebert, Technische Universität München
Sendai Virus	Paramyxoviridae	(-)ssRNA	Cantell Stamm	Charles River Laboratories, Wilmington (USA)
Semliki *Forest*-Virus (SFV)	Togaviridae	(+)ssRNA	-	Zur Verfügung gestellt von Dr. Jovan Pavlovic, Universität Zürich
Gelbfieber-Virus (YFV)	Flaviviridae	(+)ssRNA	Impfvirus YF-17D, ausgehend von Stamaril® verwendet	Sanofi S.A., Paris (F)
Enzephalomyokarditis Virus (EMCV)	Picornaviridae	(+)ssRNA	-	Zur Verfügung gestellt von Prof. Anne Krug, Ludwig-Maximilians-Universität München
Mengovirus	Picornaviridae	(+)ssRNA	Die C19-22A-Mutante ermöglicht eine verstärkte Typ-I-Interferonantwort	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Frank J. M. van Kuppeveld, Universiteit Utrecht (NL)

2.3.10. Synthetische Rezeptorliganden

Tabelle 26: Synthetische Rezeptorliganden			
Ligand	**Abkürzung**	**Rezeptor**	**Hersteller**
Hochmolekulare Polyinosin-Polyzytosin-Säure	p(I:C)	MDA5 TLR-3	Invivogen, Carlsbad (USA)
5’ Triphosphat RNA 5’→3’: GGCAUGCGACCUCU-GUUUGAUCAAACAGAG-GUCGCAUGCC	pppRNA	RIG-I	Mittels *in-vitro* Transkription hergestellt
5’ OH-RNA 5’→3’: GCGCAUUCCAGCUUAC-GUA	OH-RNA	Negativkontrolle	
2’-3’-Zyklisches Guanosin Monophosphat-Adenosin Monophosphat	cGAMP	STING	Invivogen, Carlsbad (USA)
Poly(deoxyadelyl-deoxythymidyl) Natriumsalz	Poly(dA:dT)	Indirekter RIG-I Agonismus	
Lipopolysaccharid	LPS	TLR-4	
Resiquimod	R848	TLR-7 und -8	
DNA Oligonukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven	CpG	TLR-9	
Chloroquin	Chlq	Endosomale TLR-Blockade	
Glucosepolymer Curdlan (1,3)-β-glucan	Curdlan	Dectin-1	
Glucosepolymer Zymosan	Zymosan		

2.3.11. Software

Tabelle 27: Software	
Software	**Hersteller**
FlowJo, Version 8.7	Tree Star, Ashland (USA)
GraphPad Prism, Version 5.0b	GraphPad Software, La Jolla (USA)
Microsoft Office 2020	Microsoft, Redmond (USA)
Apple Pages, Version 10.3.9	Apple, Cupertino (USA)
Adobe Ilustrator CS6, Version 25.2.1	Adobe, San José (USA)
Endnote X9.3.3	Clarivate Analytics, Philadelphia (USA)
ApE-A *plasmid editor*, Version 2.0.37	University of Utah, Salt Lake City (USA)
NEBase *Changer*, Version 1.2 (Webtool)	New England Biolabs, Ipswich (USA)
FACS DiVa, Version 8.0	BD Bioscience, Franklin Lakes (USA)
Lightcycler 480 SW 1.5	Roche, Basel (CH)
Image Studio Lite, Version 5.2.5	LI-COR, Lincoln NB (USA)

2.4. Zellulär-immunologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1. Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die verschiedenen Zelllinien wurden in entsprechenden Medien (vgl. Abschnitt 2.2.3) unter folgenden Umweltbedingungen im CO_2-Begasungsbrutschrank kultiviert:

- Temperatur: 37 °C
- 95 % Luftfeuchtigkeit
- 0.05 % CO_2-Gehalt der Luft

Konfluenz und Vitalität der Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop beurteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte bei einer Konfluenz von 80 bis 100 % unter Verwendung 1-facher Trypsinlösung bei sterilen Bedingungen. Überschüssige Zellen wurden verworfen. Das Einfrieren von Zellen erfolgte in fötalem Kälberserum (FCS) unter Zusatz von 10 Vol.-% DMSO bei -80 °C. Die Zellen wurden nach geeigneter Verdünnung mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Dabei wurde die Zellzahl pro ml mithilfe folgender Formel ermittelt:

Zellzahl pro ml = gezählte Zellen pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10^4

Testungen auf eine mögliche Mykoplasmen-Kontamination fanden im Zweiwochenrhythmus statt.

2.4.1.2. Kultivierung und Verwendung von Tumorzelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden WT- und TRIM9-KO-Zellen der Zelllinien 1205Lu und Huh-7.5 für Versuche verwendet. Hinsichtlich der 1205Lu-Zelllinie lagen bei Beginn der experimentellen Arbeit dank Vorarbeiten bereits drei verschiedene TRIM9-KO Einzelzellklone vor [3]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden drei TRIM9-KO- Einzelzellklone der Huh-7.5-Zelllinie angefertigt. Um klonspezifische Effekte zu minimieren, wurden bei Experimenten mit KO-Zellen die drei TRIM9-KO-Einzelzellklone im Verhältnis 1:1:1 vermischt und gemeinsam ausplattiert. Weiterhin wurden im Rahmen von Expressionsanalysen (vgl. Abschnitt 3.1) vergleichend die Zelllinien A549 und HepG2 sowie ein TRIM9-Überexpressionsklon (OE) der Zelllinie A549[3] verwendet.

BHK21-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich zum Zweck des TCID50-Endpunktverdünnungsassays verwendet (vgl. Abschnitt 2.4.5). Sie wurden in BHK-Medium kultiviert (vgl. Abschnitt 2.2.3).

Es ist bekannt, dass die L929-Zelllinie zur Herstellung eines Mediums, das *Macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) Medium enthält, verwendet werden kann (Rios et

[3] Die drei 1205Lu TRIM9-KO-Klone und der A549-OE-Klon wurden von Dr. Johannes Rückel hergestellt.

al. 2017). Hierzu wurde L929-Zellen im Rahmen dieser Arbeit kultiviert. Dabei wurden $20x10^6$ Zellen in 40 ml RPMI in einer T125 Zellkulturflasche ausgesät. Die Überstände wurden nach sieben Tagen in Kultur abgenommen. Die Überstände wurden vor dem Einsatz zentrifugiert und durch eine 0.20 µm Filtermembran passiert. Zur Ausdifferenzierung von murinen Knochenmarkszellen zu Makrophagen wurde der M-CSF-haltige Überstand zu 15 Vol.-% mit frischem RPMI-Medium vermischt.

Die HEK293T-Zelllinie wurden ausschließlich zur Herstellung der lentiviralen Vektoren im Rahmen der CRISPR-Cas9-Methode verwendet (vgl. Abschnitt 2.4.3).

2.4.1.3. Präparationsmethoden und *ex-vivo*-Kultivierung primärer muriner Zellen

Bone marrow derived macrophages (BMM)

Nach Tötung des Tieres wurden die Knochen der unteren Extremität freipräpariert und anschließend im Hüftgelenk und im oberen Sprunggelenk durchtrennt. Nach Aufschneiden der Epiphyse wurden Femur und Tibia mit PBS + 1 % FCS durchgespült und die dadurch gewonnenen Zellen in eine Einzelzellsuspension gebracht. Nach Anwendung eines Erythrozytenlyse-Puffers wurde die primäre Knochenmarkzellsuspension in RPMI + 15 Vol.-% L929-Überstand (BMM-Medium) überführt und über 6 Tage hinweg in 48-*well*-Platten kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage mit PBS gewaschen, und anschliessend wurde ihnen frisches BMM-Medium zugeführt. Der M-CSF-Wachstumsfaktor führte zur Differenzierung der primären Knochenmarkszellen zu Makrophagen.

Splenozyten

Nach Tötung des Tieres und Eröffnung der Peritonealhöhle wurde die Milz entfernt und mit Hilfe eines Zellsiebes (Porenöffnung: 70 µm) in Einzelzellsuspension gebracht. Nach Anwendung eines Erythrozytenlysepuffers wurden die primären Splenozyten in RPMI-Vollmedium (vgl. Abschnitt 2.2.3) kultiviert.

Murine embryonale Fibroblasten (MEF)

MEF wurden nach dem Protokoll von Jiangming Xu hergestellt (Xu 2005). Im Folgenden wird eine kurze Zusammenfassung der Protokollvorgaben präsentiert:

Die Isolation der Mausembryos erfolgte zwischen E12.5 und E18.5. Nach Entfernung des Kopfes, des Schwanzes, der Extremitäten und der inneren Organe wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und in 1-facher Trypsinlösung bei 37 °C über eine Stunde hinweg behandelt. Anschließend wurde das Gewebe in Einzelzellsuspension gebracht und in DMEM-Vollmedium mit β-Mercaptoethanol-Zusatz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in Kultur expandiert und im Dreitagesrhythmus seriell passagiert.

2.4.1.4. Herstellung von murinen Gewebelysaten

Nach Entnahme wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Bearbeitung wurde fortgesetzt, indem die gefrorenen Organe mechanisch zermahlen und mittels Ultra-TURRAX® in geeigneten Lysepuffern (RIPA für die Proteinextraktion; kommerzieller RNA-*lysis-buffer* für die RNA-Extraktion) auf Eis homogenisiert wurden. Die RNA-Isolation erfolgte im Anschluss gemäß Herstellerangabe des *PeqGold Total RNA Kits* (vgl. Abschnitt 2.2.1). Zur Proteinextraktion wurden in einem weiteren Schritt die restlichen nicht-homogenisierten Gewebebestandteile mittels Zentrifugation aus der Lösung entfernt.

2.4.2. Stimulation & Infektion von Zellen

Transfektion von RNA

Zur Transfektion immunstimulatorischer RNA bzw. von siRNA wurde das Transfektionsreagenz “RNAiMax” verwendet. Vor der Transfektion wurden die RNA und das Transfektionsreagenz in zwei parallelen Ansätzen in OptiMEM zubereitet und 10 Minuten lang inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vermischt und weitere 20 Minuten lang inkubiert. Das Gemisch wurde nach Abnahme des entsprechenden Volumens Zellkulturmedium ins Well gegeben. Die siRNA wurde “invers” transfiziert. Das Transfektionsgemisch wurde dabei auf die gleiche Art und Weise vorbereitet, es wurde aber zeitgleich mit dem Ausplattieren der Zellen in die Wells gegeben.

- Stimulationskonzentrationen und Transfektionsreagenzmengen für primäre murine Zellen:
  - p(I:C) 200 ng/ml + 1 µl RNAimax pro 200ng p(I:C)
  - pppRNA 1 µg/ml + 3 µl RNAimax pro 1µg pppRNA
- Stimulationskonzentrationen und Transfektionsreagenzmengen für die Zelllinie 1205Lu:
  - p(I:C) 20 ng/ml + 1 µl RNAimax pro 20ng p(I:C)
  - pppRNA 1 µg/ml + 3 µl RNAimax pro 1µg pppRNA

Transfektion von DNA

Für die Transfektion immunstimulatorischer DNA wurden die Transfektionsreagenzien “Lipofectamine2000” und “RNAiMax” verwendet. Die Transfektion von Plasmid-DNA im Rahmen des Luciferaseassays erfolgte mittels des Transfektionsreagenzes “TransIT-X2” für die 1205Lu-Zelllinie. Die Transfektion von Plasmid-DNA im Rahmen des CRIS-

PR-Cas9-Geneditierungsprotokolls erfolgte mittels des Transfektionsreagenzes “Lipofectamine2000” für die HEK293T-Zelllinie.

- Konzentrationen immunstimulatorischer DNA und Transfektionsreagenzmengen für primäre murine Zellen und für die Zelllinie 1205Lu:
  - cGAMP 4 µg/ml + 1 µl Lipofectamine2000 pro 2µg cGAMP
  - CpG-DNA 1 µg/ml + 3 µl RNAiMax pro 1µg CpG-DNA
- Zur Transfektion von Luciferasereporter- (Fa. Genecopoeia) und CRISPR-Plasmiden (Fa. Addgene) wurde die in den Kapiteln 2.4.3.3. und 2.4.8. aufgeführten Mengen eingesetzt.

Infektion mit Viren

Mit Ausnahme des nicht-plaqueformenden Sendai-Virus wurde für alle anderen Viren als Maß für die infizierende Virusmenge die sogenannte “Multiplizität der Infektion” (MOI) verwendet. Diese beschreibt das Verhältnis von viralen “Plaqueformenden Einheiten” (engl. *Plaque forming units*, PFU) zur Zellzahl. Im Fall des Sendai-Virus wurde die Virusmenge in Units/ml, wie vom Hersteller (Fa. Charles Rivers) angegeben, eingesetzt. Die im Rahmen der Infektionsassays dieser Arbeit verwendete MOI unterschied sich je nach Virus- und Zelltyp und ist an den entsprechenden Stellen angegeben. Die Infektion erfolgte in OptiMEM. Nach drei- bis vierstündiger Inkubationszeit wurde das virushaltige OptiMEM-Medium mit näherstoffhaltigem Vollmedium ersetzt. Nach Beendigung der Infektionsassays wurden aus Sicherheitsgründen vor der Weiterverarbeitung von Überständen bzw. Lysaten die Replikationsfähigkeit der Viren mittels ultraviolettem (UV) Licht inaktiviert. Dabei wurde UV-Licht einer Wellenlänge von 254nm mit einer Energie von 10 mJ/cm^2 über 1 Minute hinweg eingesetzt.

2.4.3. CRISPR/Cas9-Geneditierung: Etablierung stabiler TRIM9-*Knock-Out*-Zelllinien

2.4.3.1. CRISPR/Cas9: Theoretischer Hintergrund

Als *“Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”* (CRISPR) werden repetitive Sequenzen im Genom vieler Prokaryoten bezeichnet, die Resistenz gegenüber einer Infektion mit Viren (z.B. Bakteriophagen) verleihen können und als ein prokaryotisches Äquivalent des adaptiven Immunsystems verstanden werden; dabei ist die Spezifität des Systems dem zielgerichteten Abbau fremder Nukleinsäuren auf Basis komplementärer Sequenzen geschuldet (Horvath und Barrangou 2010,Jinek et al. 2012). Die auf diesem Prinzip basierende CRISPR/Cas9-Methode wurde erstmalig erfolgreich im Jahr 2013 zur gezielten Manipulation eukaryotischer Gene eingesetzt (Cong et al. 2013,Jinek et al. 2013,Mali et al. 2013). Zentrale Komponenten des Sys-

tems sind einerseits eine zur Zielregion der DNA komplementäre Leitsequenz (*small guide RNA, sgRNA*) und andererseits die sgRNA-geführte DNA-Endonuklease *"Cas9"*, welche einen Doppelstrangbruch im Bereich der CRISPR-Zielregion verursachen kann. Aufgrund fehlerhafter Reparaturmechanismen (vorrangig nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung) entstehen oft Insertionen, Deletionen oder Kombinationsmutationen. Diese ziehen in den meisten Fällen eine Leserasterverschiebung mit Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Kodons nach sich und führen letztlich zum funktionellen Knock-Out des Zielgens.

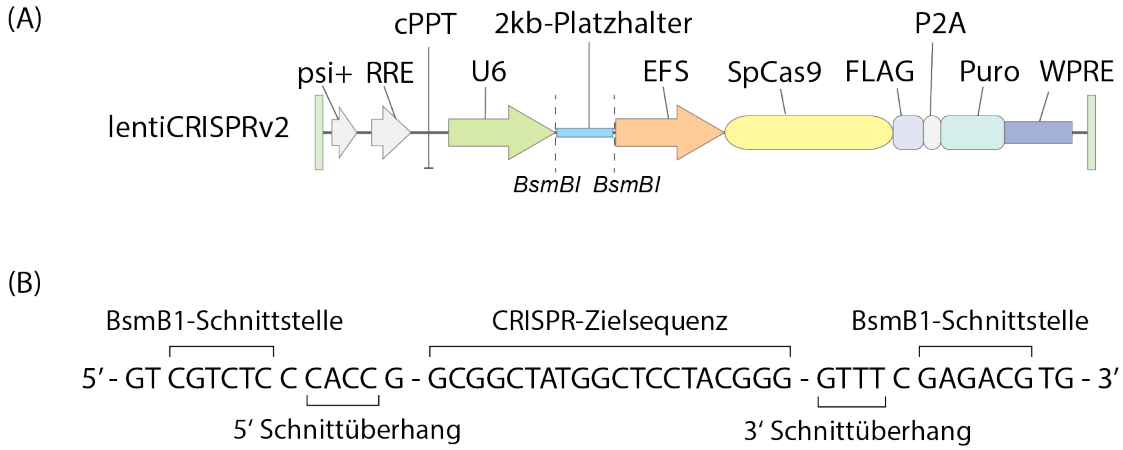


Abbildung 5. (A) LentiCRISPRv2-Vektor: Der Vektor enthält die zwei konstitutiv aktiven Promotoren U6 und EFS. Der Platzhalterbereich zwischen ihnen wird von Schnittstellen des Restriktionsenzyms BsmBI flankiert und dient der Insertion der hybridisierten einzelsträngigen DNA-Templates der sgRNA. Unter dem Einfluss des EFS-Promotors entsteht zunächst ein aus Cas9, FLAG-Tag und Puromycin zusammengesetztes Polypeptid, welches dank der P2A-Sequenz selbstspaltbar ist. Somit wird eine Cas9- und Puromycin-Synthese im Verhältnis 1:1 gewährleistet. (**B) Designprinzip der sgRNA-Oligos:** Die CRISPR-Zielsequenz ist von zwei BsmBI-Schnittstellen flankiert.

Abbildung (A) nachgezeichnet und modifiziert nach "Lentiviral CRISPR Toolbox Protocol", Zhang Lab

2.4.3.2. Lentivirale Transduktion: Methodisches Prinzip

Zur Erzeugung von CRISPR-Knock-Out Zellen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Prinzip der lentiviralen Transduktion gemäß des Protokolls für LentiCRISPRv2 des Feng-Zhang-Labors angewandt (vgl. Abschnitt 2.3.5.2) (Sanjana et al. 2014,Shalem et al. 2014). Dabei wurden lentivirale Partikel hergestellt, welche für die sgRNA sowie für die Cas9-Endonuklease kodieren und die entsprechenden Genkassetten stabil ins Wirtsgenom der infizierten Zielzellen integrieren können. Zur Herstellung der lentiviralen Partikel wurde die Verpackungszelllinie HEK293T mit dem lentiCRISPRv2-Vektor (vgl. Abbildung 5-A) und mit zwei für Lentivirusbestandteile kodierenden Plasmiden tranfiziert (vgl. Tabelle 21). Zuvor wurde das DNA-Template der zu

Exon 1 von TRIM9 komplementären sgRNA (vgl. Tabelle 24) in den LentiCRISPRv2-Vektor eingesetzt. Unter dem Einfluss der konstitutiv aktiven U6- und EFS-Promotoren wurden in den lentiviral infizierten Zielzellen sowohl die sgRNA als auch die Cas9-Endonuklease stabil exprimiert. Ein Puromycin-Resistenzgen, welches ebenfalls dem Einfluss des EFS-Promotors unterliegt, erlaubte die Selektion der erfolgreich transduzierten eukaryotischen Zellen.

2.4.3.3. Protokoll

Dank Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war eine geeignete Zielsequenz (vgl. Tabelle 24) im Bereich des Exon 1 von TRIM9 bereits identifiziert worden. Die sgDNA-Oligos wurden so entworfen, dass die CRISPR-Zielsequenz von zwei BsmBI-Schnittstellen flankiert war (vgl. Abbildung 5-B).

Die Hybridisierung (engl. *annealing*) der Oligos wurde erreicht, indem ein Gemisch aus forward und reverse Oligos in TE-Puffer auf 99 °C aufgeheizt und anschließend langsam (>2 h) auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. Zum Einbau des hybridisierten Oligopaares in den LentiCRISPRv2-Vektor wurde nach dem "*golden gate reaction*"-Prinzip von New England Biolabs (NEB) vorgegangen. Dabei finden in einem Reaktionsansatz nacheinander ein BsmBI-vermittelter Restriktionsverdau, eine T4-Ligase-vermittelte Ligation und eine anschließende Inaktivierung der Enzyme statt. Im Anschluss wurde das Reaktionsprodukt in recA-defizienten *E.coli*-Bakterien vervielfältigt und auf Ampicillin selektioniert. Positive Kolonien wurden mittels Sanger-Sequenzierung auf korrekten Einbau des sgRNA-Templates in den Vektor und auf Produktreinheit hin überprüft.

Als Verpackungszelllinie für die Lentivirusproduktion diente die HEK293T-Zelllinie. $3{,}5 \times 10^6$ Zellen wurden in einer 10cm-Schale ausplattiert. Am Folgetag fand die Transfektion von 5 µg pVSV.G, 7.5 µg pCMV-R8.74 und 11 µg pLentiCRISPRv2 mittels OptiMEM und Lipofectamine2000 statt. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, wobei das alte Medium durch 30% FCS-haltiges DMEM-Vollmedium ersetzt wurde. Der virushaltige Überstand wurde am folgenden Tag eingesammelt, durch einen 0.45 µm-Filter passiert und unter Zusatz von HEPES-Puffer (1:50) und *Polybrene* (1:1000) bei -80° C aufbewahrt bzw. direkt zur Transduktion verwendet.

Zur lentiviralen Transduktion wurden 5×10^5 Huh-7.5-Zellen im 6-Well-Format ausplattiert. Etwa 4 Stunden danach wurden die Zellen nach Abnahme des ursprünglichen Mediums in 200 µl lentivirushaltigem Medium bei 37 °C für etwa vier Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden 2 ml frisches DMEM-Vollmedium zugesetzt. Zwei Tage später begann der Selektionsprozess, indem das alte Medium durch puromycinhaltiges Medium (c = 5 µg/ml) ersetzt wurde. Die Selektion erfolgte über mindestens fünf Tage hinweg. Die überlebenden Zellen wurden je nach Bedarf expandiert und bei ausreichen-

der Zellzahl mit einer Konzentration von 0,3 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausgesät.

Heranwachsende Einzelzellklone wurden mithilfe eines T7-Endonukleaseverdaus auf eine stattgefundene Mutation hin untersucht (vgl. Abschnitt 2.5.3). T7-positive Klone wurden mittels Immunoblotting (vgl. Abschnitt 2.4.4) auf eine Ausschaltung der Expression auf Proteinebene getestet. Anschließend wurde bei TRIM9-defizienten-Klonen die stattgefundene Mutation mittels Sanger-Sequenzierung der CRISPR-Zielregion nachgewiesen und der funktionelle Knock-Out genetisch bestätigt (vgl. Abschnitt 3.3).

2.4.4. Western Blot

Der Western Blot ist eine der zentralen Methoden zur Immundetektion und Quantifizierung von Proteinen. Zellen wurden in einem adäquaten Volumen RIPA-Puffers 30 Minuten lang auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile wurden mittels Zentrifugation (14.000 g, 4 °C, 10 min) entfernt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte gemäß Herstellerangabe mittels des Bradford-Assays (DC™ Protein Assay, vgl. 2.2.1). Anschließend wurden zwecks Proteindenaturierung die Proben in Lämmli-Puffer 5min bei 95 °C erhitzt. Geeignete Mengen an Proteinprobe sowie der Marker, PageRuler-Prestained®, wurden auf ein 10% Natriumlaurylsulfat-(SDS)-Gel geladen und 90 Minuten lang bei 100 V Spannung aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte der Transfer der Proteine (engl. *blotting*) auf eine Polyvinyliden-fluoridmembran (PVDF-Membran) innerhalb von zwei Stunden bei einer Stromstärke von 200 mA. Die freien Bindungsstellen der Membran wurden in einer 5 Vol.-% fettfreien Milchlösung in TBST-Puffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur geblockt. Die proteinbesetzte Membran wurde über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper und anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper in 5 Vol.-% BSA in TBST-Puffer inkubiert. Zwischen den einzelnen Schritten wurde die Membran in reinem TBST-Puffer gewaschen. Durch Zugabe eines geeigneten Substrats (vgl. 2.2.1) wurde die Lumineszenzreaktion gemäß Herstellerangabe gestartet. Das Signal wurde mittels Alpha-Imager (vgl. Abschnitt 2.1) aufgenommen.

2.4.5. *Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)*

Der ELISA ist eine Standardmethode zur Quantifizierung von Zytokinmengen in Zellkulturüberständen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden murine und humane ELISA-Kits zur Quantifizierung von IL-6 und IP-10 verwendet (vgl. 2.2.1), wobei alle Kits auf dem *"Sandwich"*-Prinzip basierten. Der Standard wurde mittels Verdünnungsreihe eines rekombinanten Proteins bekannter Konzentration angefertigt. Vor Durchführung der Methode wurden die Proben soweit verdünnt, dass deren Konzentration innerhalb des

vom Standard vorgegebenen Bereichs lagen. Die laborchemische Durchführung der Methode entsprach den Protokollvorgaben des Herstellers. Die Umrechnung der photometrisch gemessenen optischen Dichte in Proteinkonzentration erfolgte mittels Interpolation anhand einer 4-Parameter-logistischen-Regressionskurve.

2.4.6. Virustiterbestimmung mittels TCID50-Endpunktverdünnungsassay

Virustiter werden üblicherweise indirekt über serielle Verdünnungen virushaltiger Zellkulturüberstände bestimmt. Der *"Tissue Culture Infective Dose 50%"*-(TCID50)-Wert gibt die Verdünnungsstufe an, die erforderlich ist, um in 50% der infizierten Wirtszellkulturen zytopathische Effekte hervorzurufen; der Messwert kann über den Spearman-Kärber Algorithmus berechnet werden (Hierholzer und Killington 1996). Er korreliert mit der ursprünglichen Viruslast im unverdünnten untersuchten Überstand.

Virussensitive BHK21-Wirtszellen (5.000-10.000/Well) wurden im 96-Well-Format ausplattiert und in verschiedenen Verdünnungen virushaltigen Mediums inkubiert. Dabei entsprach jede Reihe der 96-Well-Platte einer Verdünnungsstufe. Die jeweils nächste Reihe war um den Faktor 10 höher verdünnt. Nach drei bis fünf Tagen wurde die Anzahl der Wells dokumentiert, in denen zytopathische Effekte lichtmikroskopisch zu beobachten waren. Aus dieser Zahl ließ sich mittels des o.g. Algorithmus der TCID50-Wert berechnen.

2.4.7. Durchflusszytometrie

Zellen in Suspension lassen sich durchflusszytometrisch quantifizieren und anhand ihrer Größe, Granularität und ihrer Oberflächenmerkmale voneinander unterscheiden. Das Zytometer erzeugt eine laminare Strömung, welche die Passage einzelner Zellen nacheinander durch Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen gewährleistet. Dabei können Zellpopulationen auf Basis ihres charakteristischen Lichtstreuungsverhaltens identifiziert werden. Außerdem lassen sich fluoreszierende Zellen anhand ihres Emissionsverhaltens bei Anregung mit Laserstrahlen bestimmter Wellenlängen erkennen. Dadurch können die Charakteristika von mehreren Tausend Zellen schnell analysiert werden.

Das verwendete Durchflusszytometer, BD FACSCanto II, verfügte über drei Laser (λ = 488 nm, 633 nm und 405 nm). Als Maß für die virale Replikationsgeschwindigkeit wurden im Rahmen dieser Arbeit Zellpopulationen entsprechend der Expression grünfluoreszierenden Proteins (GFP) nach Infektion mit einem GFP-markierten VSV-Virus analysiert. Zur Bestimmung der Lichtstreuung [forward scatter (FSC) und sideward scatter (SSC)] sowie zur Anregung von GFP-markierten Zellen wurde der 488 nm-Laser eingesetzt. Die Emissionswellenlänge von GFP beträgt 509 nm. Der Vergleich zu nicht-

infizierten Zellen erlaubte die Unterscheidung und Quantifizierung GFP-positiver-Zellen (vgl. Abbildung 16).

Vor der durchflusszytometrischen Analyse wurden virusinfizierte Zellen nach UV-Inaktivierung in Suspension gebracht und 30 Minuten lang in 4 Vol.-% Paraformaldehyd (PFA) in PBS-Puffer fixiert.

2.4.8. Dualer Luciferase-Assay

Mittels des Vektors pEZX-MT05 von Genecopoeia (vgl. Abbildung 8-B) wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss haplotypischer Varianten der 3'UTR von TRIM9 auf die Expression eines stromaufwärts gelegenen Gens untersucht. Der Vektor kodiert für zwei Luciferasen: Die Gauss'sche Luciferase (GLuc) und die sezernierte Alkalische (seAP) Phosphatase. Die Expression beider Luciferasen unterliegt der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors: des SV40-Promotors im Fall der GLuc und des CMV-Promotors im Fall der seAP. Dabei wird die Expression der GLuc zusätzlich über die ersten 2026 bp der 3'UTR von TRIM9 kontrolliert. Die von weiteren regulatorischen Einflüssen unabhängige Expression der seAP dient als Transfektionseffizienzkontrolle. Dem Hersteller zufolge findet die Regulation der GLuc-Expression post-transkriptionell über Interaktionen der 3'UTR mit microRNAs statt. Dies hat die Bildung des *"RNA-induced silencing complex"*-(RISC)-Komplexes und die anschließende Degradation des chimären Primärtranskripts aus Gluc und einem Abschnitt der TRIM9-3'UTR zur Folge. Dank Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Rückel 2018) lagen bereits entsprechend des SNPs "rs12879906" zwei Varianten des Reporterplasmids vor. Mittels eines gezielten Mutagenese-Verfahrens (vgl. Abschnitt 2.5.2) wurden zwei weitere Varianten entsprechend des SNPs "rs1049371" hergestellt. Anhand des Verhältnisses der GLuc- zur seAP-Expression in Abhängigkeit der aus den untersuchten SNP sich ergebenden vier haplotypischen Varianten der TRIM9 3'UTR (vgl. Abschnitt 3.2.1 und Abbildung 8-B) kann eine Aussage über einen möglichen Einfluss der 3'UTR auf die Expression von TRIM9 getroffen werden.

30.000 1205Lu Zellen/well wurden im 96-well-Format ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion mit 5 ng bzw. 50 ng Reporterplasmid in Triplikaten. 24 Stunden nach Transfektion wurde in zwei getrennten Ansätzen durch Zugabe von 20 µl des jeweiligen Enyzmsubstrats (GLuc: Coelenterazin 1:250 in Wasser verdünnt; seAP: "Component A" des Herstellerkits) auf 50 µl Zellkulturüberstand die Lumineszenzreaktion gestartet. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und in Dunkelheit erfolgte die Detektion des Lumineszenzsignals mittels Mithras LB940 *Microplate Reader*.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein molekularbiologisches Standardverfahren zur Vervielfältigung eines doppelsträngigen DNA-Abschnitts. Sie basiert auf mehreren sich wiederholenden Zyklen einer vorgegebenen Abfolge von Reaktionstemperaturen. Dabei gibt die Temperatur die jeweilige Reaktionsphase vor. Jeder Zyklus besteht aus einer DNA-Denaturierungs-, einer Primer-Hybridisierungs- und einer Polymerisationsphase.

Die PCR kam im Rahmen dieser Arbeit an verschiedenen Stellen zum Einsatz. So erfolgte mittels PCR die Verifizierung des Genotyps von TRIM9-KO-Mäusen, die Amplifikation der CRISPR-Zielregion im Rahmen des T7-Endonuklease-*screenings*, die Sequenzierung der Huh-7.5-CRISPR-Klone und die Bereitstellung von DNA-Fragmenten, welche anschließend in Plasmide eingebaut wurden. Für die jeweiligen Verwendungszwecke wurden geeignete Primer und *annealing*-Temperaturen gewählt (vgl. Abschnitt 2.3.4). Die DNA-Isolation erfolgte gemäß Herstellerangabe mittels QuickExtact™ DNA. Für die Mausgenotypisierung wurden etwa 2 bis 5 mm lange Schwanzspitzen verwendet. Als Enzyme kamen die Taq-, HF-Phusion- und Q5-Polymerasen in ihren jeweiligen Pufferlösungen zum Einsatz (vgl. Abschnitt 2.2.2).

Zur Visualisierung der PCR-Produkte auf Basis ihrer Länge wurden die Proben und ein geeigneter Marker auf ein Agarose-Gel (0,5-2 Vol.-% in TAE-Puffer) aufgetragen und elektrophoretisch (Spannung: 70 V; Laufzeit: 30-60 min) aufgetrennt. Im Falle einer anschließenden DNA-Extraktion wurde die Bande auf der gewünschten Länge ausgeschnitten und mittels *“peqGOLD Gel extraction Kit”* gemäß Herstellerangabe prozessiert.

2.5.2. Q5-Mutagenese

Zur gezielten Einfügung von Punktmutationen in die Sequenz von Reporterplasmiden (vgl. Abschnitt 2.4.8) wurde das *“Q5 Site-Directed mutagenesis Kit”* von New England Biolabs verwendet. Geeignete Primer wurden mittels *“NEBaseChanger™”* entworfen (vgl. Abschnitt 2.3.4). Zunächst erfolgte die exponentielle Amplifikation linearer Abschnitte des Vektors mittels der mutationstragenden Primer und der Q5-Polymerase. In einem zweiten Schritt wurde die sog. “Kinase-Ligase-DpnI”-(KLD)-Reaktion gemäß NEB-Protokoll durchgeführt. In diesem Schritt werden die zunächst durch eine Kinase phosphorylierten Enden des neu amplifizierten linearen PCR-Produkts zu einem zirkulären Vektor ligiert und das alte nicht-mutationstragende Vektor-*template* durch das DpnI-Enzym degradiert. Im Anschluss erfolgte die Transformation des neu mutierten Ringvektors in recA-defiziente chemisch kompetente DH5alpha-Bakterien. Hierfür wurden 5 µl des KLD-Reaktionsprodukts zu 50 µl Bakteriengemisch gegeben und 30 Minu-

ten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 Sekunden und einer anschließenden fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien in 950 µl SOC-Medium bei 37 °C eine Stunde lang inkubiert, bevor 100 µl des Gemisches auf Ampicillin-haltigem Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert wurden.

2.5.3. T7-Endonukleaseverdau

Ein Cas9-induzierter DNA-Doppelstrangbruch führt aufgrund fehlerhafter Reparaturmechanismen der Zelle zu Mutationen. Die sog. T7-Endonuklease besitzt die Fähigkeit, mutationsbedingte Fehlpaarungen (engl. *mismatches*) von Basen innerhalb eines DNA-Doppelstrangs zu erkennen und an dieser Stelle zu schneiden. Auf Basis dieses Prinzips ließen sich in dieser Arbeit CRISPR-Klone identifizieren, deren DNA zuvor durch Cas9 editiert worden war.

Sobald im Zuge der Expansion heranwachsender Klone genügend Zellen zur Verfügung standen, wurde aus einem Aliquot des jeweiligen Klons die DNA mittels *QuickExtract™ DNA* entsprechend der Herstellerangabe isoliert. Anschließend wurde die CRISPR-Zielregion von Huh-7.5-Klonen und WT-Zellen PCR-amplifiziert (Enzym HF-Phusion; zu *annealing*-Temperatur und Primera vgl. Abschnitt 2.3.4). Im nächsten Schritt wurden die PCR-Amplifikate von WT-und Klon-Zellen im Verhältnis 1:1 (30 µl + 30 µl) vermischt und ein *reannealing* der DNA-Doppelstränge induziert, indem das Gemisch zunächst 10 Minuten auf 95 °C lang erhitzt wurde und anschließend in 10 °C-Schritten heruntergekühlt wurde, wobei nach jedem 10 °C-Abfall eine Minute lang auf der erreichten Temperatur inkubiert wurde. Bei Erreichen von 25 °C wurde das Programm beendet und die Probe auf 4 °C eingestellt. Es folgte der eigentliche T7-Verdau. 1 µl T7-Endonuklease mit entsprechender Pufferlösung wurden dem 60 µl-Mischansatz zugegeben und bei 37° C drei Stunden lang inkubiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt. In der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese ließen sich Cas9-editierte CRISPR-Klone durch das Auftreten einer in WT-Zellen nicht vorhandenen doppelten Bande identifizieren.

2.5.4. Quantitative mRNA-Analyse

Die *Quantitative Reverse Transcription PCR* (qRT-PCR) ist eine hoch sensitive Methode zur Quantifizierung von Kopienzahlen eines PCR-*template*. Über den Zwischenschritt des Umschriebs von mRNA in cDNA findet die qRT-PCR üblicherweise in der quantitativen Analyse der Transkription Anwendung und lässt Rückschlüsse auf die Genexpression zu. Die Quantifizierung beruht auf der Detektion eines zur Kopienzahl des PCR-*template* proportionalen Fluoreszenzsignals und erfolgt relativ zu einem konstitutiv exprimierten Referenzgen (engl. *housekeeping gene*).

Die RNA-Isolation erfolgte mittels *peqGOLD Total RNA isolation kit*. Zur Zelllyse wurde ein stark denaturierender Guanidinthiocyanat-haltiger Puffer eingesetzt. Primäres Mausgewebe wurde zusätzlich mittels *Ultra-Turrax®* mechanisch homogenisiert. Die homogenisierten Lysate wurden initial auf die DNA-isolierende Säule des Kits geladen und anschließend entsprechend der Herstellerangabe prozessiert.

Die RNA wurde mittels RevertAID™ *First Strand cDNA Synthesis kit* in cDNA umgeschrieben. Zum Einsatz kamen dabei die Reverse Transkriptase "*RevertAID™",* der RNAse-Inhibitor "RiboLock*™"* und Primer Oligonukleotide "*Oligo(dT_{18})",* welche die Bindung an einen polyA-Schwanz der mRNA ermöglichen. Die Transkriptionsreaktion fand in einem vom Kit vorgegebenen Reaktionspuffer unter Zugabe von 10 mM dNTP bei 42 °C über einen Zeitraum von 60 Minuten statt. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch auf 70 °C erhitzt, und somit die Reverse Transkriptase inaktiviert.

Die qRT-PCR erfolgte im 10 µl-Ansatz unter Verwendung des *KAPA Probe Fast Universal qPCR Master Mix*. Aufeinander abgestimmte Primer und Hybridisierungssonden wurden mithilfe der *Universal Probe Library* (Fa. Roche) entworfen und in der Reaktion eingesetzt (vgl. Abschnitt 2.3.4). Als Referenzgen wurde murines und humanes β-Actin verwendet.

Zur Quantifizierung orientiert man sich an dem sog. *Threshold Cycle-(CT)*-Wert. Als CT-Wert wird diejenige Zykluszahl definiert, in der das Fluoreszenzsignal erstmals deutlich über den Hintergrund ansteigt. Zu diesem Zeitpunkt läuft die Amplifikation noch exponentiell ab und erlaubt somit eine möglichst akkurate mathematische Modellierung der Reaktion. Unter Annahme einer Primereffizienz von 2 wurde das *Target-to-Reference-ratio* aus $2^{CT(Ref)} / 2^{CT(Target)}$ berechnet.

2.6. Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte dargestellt. Fehlerbalken illustrieren den Standardfehler des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean*, SEM). Falls nicht anders angegeben, wurde der Vergleich von Mittelwerten zwischen zwei unverbundenen Stichproben mittels ungepaarten Student t-Tests auf statistische Signifikanz geprüft. Die n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl unabhängig voneinander wiederholter Experimente (biologischer Replikate). Bei der Angabe des Signifikanzniveaus wird der biologische Fehler berücksichtigt. Folgende Signifikanzniveaus wurden gemäß Konvention angenommen: $p<0{,}05$ (*), $p<0{,}01$ (**), $p<0{,}001$ (***). Die statistische Analyse erfolgte mithilfe der "*GraphPad-Prism" software*.

Die Analyse von Allelhäufigkeiten (Abschnitt 3.2) erfolgte mittels des χ^2-Tests.

Zur Analyse des Einflusses zweier unabhängiger kategorialer Variablen auf eine Zielvariabel wurde der *two-way-ANOVA*-Test angewandt.

3. Ergebnisse

3.1. TRIM9 lässt sich in primären Geweben außerhalb des ZNS auf RNA-Ebene aber nicht auf Proteinebene nachweisen.

Auf der Grundlage neuerer Erkenntnisse, welche auf eine Expression von TRIM9 außerhalb des ZNS im Menschen hinwiesen (Carthagena et al. 2009,Qin et al. 2016) (vgl. Abschnitt 4.2.1), wurde untersucht ob und in welchen Geweben, eine TRIM9-Expression außerhalb des ZNS detektiert werden kann. Im folgenden Abschnitt wird eine Expressionsanalyse von TRIM9 im murinen System den Ergebnissen einer gezielten Suche nach der Expression von TRIM9 in humanem Lebergewebe gegenübergestellt.

Unter Verwendung primärer Gewebelysate von WT- und TRIM9-*Knock-out-(KO)*-Mäusen wurde die Expression auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Auf mRNA-Ebene zeigten sich geringfügige Unterschiede im TRIM9-Expressionsniveau zwischen WT- und KO-Mäusen in Leber-, Herz- und Kolongewebe (vgl. Abbildung 6-A1). Ein eindeutiger Unterschied von circa 200:1 in der TRIM9-mRNA-Expression zwischen WT- und KO konnte in Hirngewebe nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 6-A1). Folglich kann von einer relevanten mRNA-Expression von TRIM9 im ZNS von Mäusen ausgegangen werden. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise für eine Expression von TRIM9 auf mRNA-Ebene in murinem Leber-, Herz- und Kolongewebe.

Auf Proteinebene zeigten sich keine Unterschiede in der TRIM9-Expression zwischen WT- und KO-Lysaten (vgl. Abbildung 6-A2). Die Banden unterhalb bzw. oberhalb der 70 kDA-Markierung, welche in der Gehirn-KO-Probe nicht zu sehen sind, entsprechen der kurzen bzw. langen Isoform von TRIM9. Die restlichen Banden sind - in Anbetracht des simultanen Vorhandenseins einer Doppelbande auf Höhe der 70 kDA-Markierung in der Gehirn-KO-Probe und eines nach Angaben der *"Universal protein database"* (UniProt-Eintrag: Q8C7M3, Trim9 *Mus musculus)* (UniProt 2019) fehlenden entsprechenden Isoformtranskripts - am ehesten als unspezifische Banden zu werten.

Die Ergebnisse in primären humanen Gewebelysaten und in Tumorzelllinien menschlichen Ursprungs boten dagegen ein anderes Bild. Die mRNA-Transkript-Menge von TRIM9 in humanem Gehirn und humaner Leber zeigte sich in beiden Fällen gesteigert im Vergleich zur Transkriptmenge in 1205Lu-WT-Zellen (vgl. Abbildung 6-B1). Dank Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass 1205Lu-Zellen TRIM9 in relevanten Mengen auf mRNA-Ebene exprimieren (Rückel 2018).

Auf Proteinebene stellte sich unerwartet die Expression von TRIM9 in humanem Gehirnlysat deutlich niedriger als in Lysaten der 1205Lu-WT-Zellllinie dar. Im humanen Leberlysat konnte kein TRIM9 detektiert werden (vgl. Abbildung 6-B2). Die Bande auf Höhe der 70 kDa-Markierung entspricht am ehesten einer unspezifischen Bindung des Antikörpers. In der Zelllinie HepG2 gelang die Detektion von TRIM9 auf Proteinebene

ebenfalls nicht, wohingegen in Lysaten der Zelllinie Huh-7.5 die lange Isoform detektiert werden konnte, die kurze jedoch nicht. Die Gegenüberstellung eines Überexpressions- und eines KO-Klons der Zelllinie A549, die im Rahmen von Vorarbeiten hergestellt wurde (vgl. Abschnitt 1.4.2), trug ebenso wie die Gegenüberstellung eines WT- und KO-Klons der Zelllinie 1205Lu, zur Kontrolle der experimentellen Methodik bei. Zur

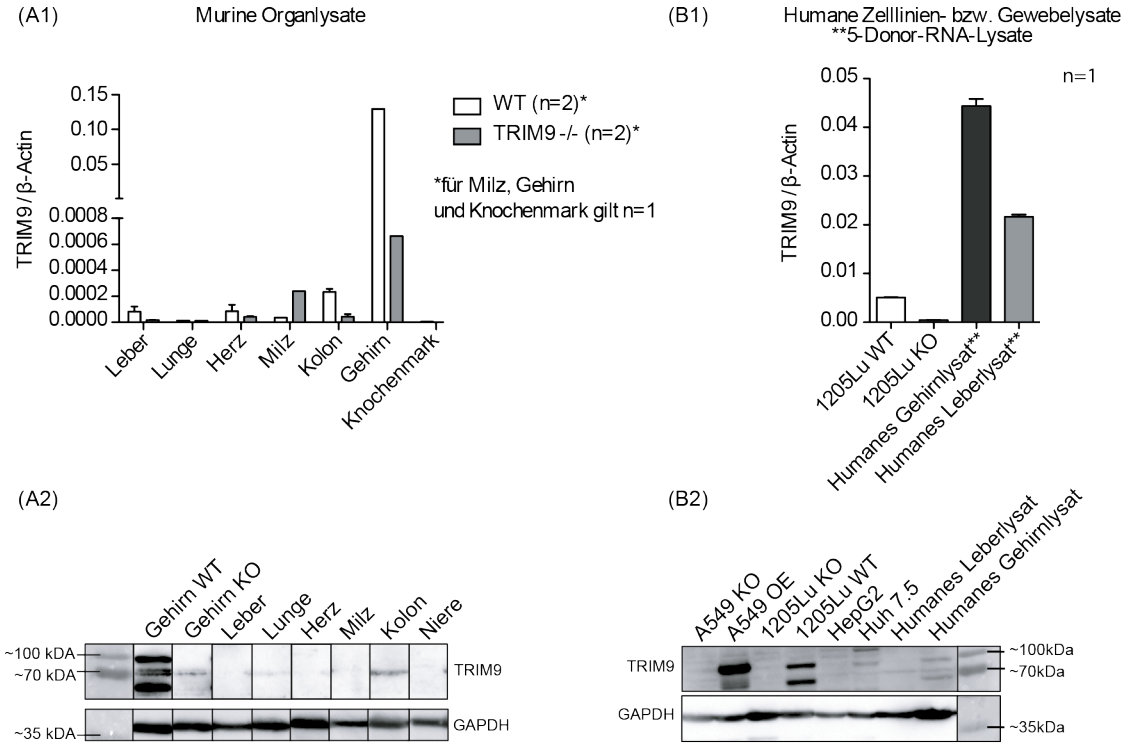


Abbildung 6. Bestimmung des Expressionsniveaus von TRIM9 auf mRNA- und Proteinebene in Zelllysaten verschiedenartiger Gewebe muriner und humaner Abstammung sowie in humanen Zelllinien.
(A) Wildtyp- und TRIM9-Knock-Out Mäusen wurden Organe entnommen. Nach Gewebeaufreinigung erfolgte: **(A1)** Die RNA-Isolation, anschließend die cDNA-Transkription und die Quantifizierung der TRIM9-mRNA mittels qRT-PCR wobei β-Actin als Referenzgen diente. **(A2)** Die Proteinanreicherung und der Nachweis des TRIM9-Proteingehalts in den jeweiligen Gewebeproben einer WT-Maus mittels Western Blot, wobei GAPDH als Ladekontrolle diente. Als Negativ- und Positivkontrollen dienten die Gehirnlysate altersgleicher WT- und TRIM9-KO-Mäuse. Die in (A1) aufgeführte n-Zahl bezieht sich auf unabhängige Experimente mit einzelnen WT- und KO-Mäusen. Die Daten sind als Mittelwert +SEM dargestellt.
(B) Es wurden kommerzielle humane Gewebelysate erworben und in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Zelllinien neu kultiviert und lysiert. Nach RNA-Isolation und Proteinanreicherung erfolgte: **(B1)** Die cDNA-Transkription und die Quantifizierung der TRIM9-mRNA mittels qRT-PCR, wobei β-Actin als Referenzgen diente. **(B2)** Der Nachweis des TRIM9-Proteingehalts in den jeweiligen Gewebe- und Zelllinienproben erfolgte mittels Western Blot wobei GAPDH als Ladekontrolle diente. Als Positivkontrollen dienten die Wildtyp-Zelllinien 1205Lu und der A549-Überexpressionsklon. Als Negativkontrollen dienten die 1205Lu- und A549-KO-Klone. Die unter (B1) genannte qRT-PCR wurde in Duplikaten durchgeführt. Dargestellt sind die Daten als Mittelwert +SEM der Duplikate.

simultanen Detektion beider TRIM9-Isoformen wurde im Rahmen dieser Arbeit der gleiche polyklonale Antikörper von “Proteintech” (vgl. Abschnitt 2.3.3) verwendet, der in der Arbeit von Qin et al. zum Einsatz kam (Qin et al. 2016).

Zusammenfassend konnte in humanen Lebergewebeproben TRIM9 zwar auf mRNA-Ebene detektiert werden, auf Proteinebene jedoch nur in einer humanen Hepatozyten-Zelllinie, nicht aber in den primären Gewebelysaten. Dieser Widerspruch kann sowohl biologische als auch methodische Gründe haben und wird in dem Abschnitt 4.2.1 diskutiert. In Mäusen gibt es zwar Hinweise auf eine Expression auf mRNA-Ebene auch außerhalb des Gehirns. Auf Proteinebene war dies jedoch mit den angewendeten Methoden nicht darzustellen.

3.2. Einzelnukleotidpolymorphismen in der 3'UTR von TRIM9 beeinflussen das Expressionsniveau des stromaufwärts gelegenen Gens.

Im Rahmen einer unpublizierten an der Technischen Universität München (TUM) durchgeführten GWAS-Studie konnten SNP in der 3'UTR im Gen von TRIM9 mit einer veränderten Chronifizierungsrate von Hepatitis-C-Infektionen in Assoziation gebracht werden. Das hinsichtlich Alter, Geschlecht und Beobachtungszeitraum äußerst homogene Patientenkollektiv, welches der genannten GWAS-Studie zugrunde lag, umfasste HCV-Patientinnen der deutschen HCV-(1b)-Anti-D-Kohorte, deren klinische Verläufe hinsichtlich einer HCV-Chronifizierung bzw. HCV-Spontanausheilung bekannt waren; dabei stimmten die errechneten Chronifizierungs- und Spontanausheilungsraten innerhalb des Patientenkollektivs mit den in der Literatur angegebenen Raten überein (Rückel 2018).

Die Entdeckung der o.g. SNP der 3'UTR sowie die von Versteeg et al. erarbeitete Evidenz zur Beteiligung von TRIM9 in der Immunabwehr gegen Viren veranlassten unsere Arbeitsgruppe zur Aufstellung folgender Hypothesen (Versteeg et al. 2013):

1. Die haplotypische Variabilität im Gen von TRIM9 kann den Verlauf von Hepatitis-C-Infektionen beeinflussen.
2. Dies wird über einen direkten Einfluss auf das Expressionsniveau von TRIM9 vermittelt.

Um die erste Hypothese zu prüfen und die bereits vorbeschriebene Assoziation zu bestätigen, wurden zwei SNP in der 3'UTR von TRIM9 untersucht (vgl. Abbildung 7-A). Hinsichtlich des SNP "rs12879906" lagen Daten von insgesamt 261 Patientinnen vor. Diese stellten sich zusammen aus 191 Patientinnen mit chronischer Hepatitis C (CH)

		Allelhäufigkeiten (%)					
			Hepatitis-C-Kollektiv				
SNP ID und Allele		Referenzkollektiv*	Gesamt	CH	SAH	P-Wert	OR (95% CI)
rs12879906	G-C	93,47	91,38	93,98	84,29	0,0005	0,34 (0,18-0,64)
	A-T	6,53	8,62	6,02	15,71		
rs1049371	A-T	83,69	82,51	80,83	87,14	0.0921	0,62 (0,36-1,09)
	G-C	16,31	17,49	19,17	12,86		

Tabelle 28: Allelhäufigkeitsverteilung der untersuchten SNPs innerhalb des untersuchten Hepatitis-C-Kollektivs. Die P-Werte wurden mittels des χ^2-Tests ermittelt, wobei die Allelverteilungen zwischen der CH- und SAH-Gruppe verglichen wurden. CH, Chronische Hepatitis C. SAH, spontan ausgeheilte Hepatitis C. OR, Odds Ratio, wobei CH mit SAH verglichen wurden. CI, Konfidenzinterval.

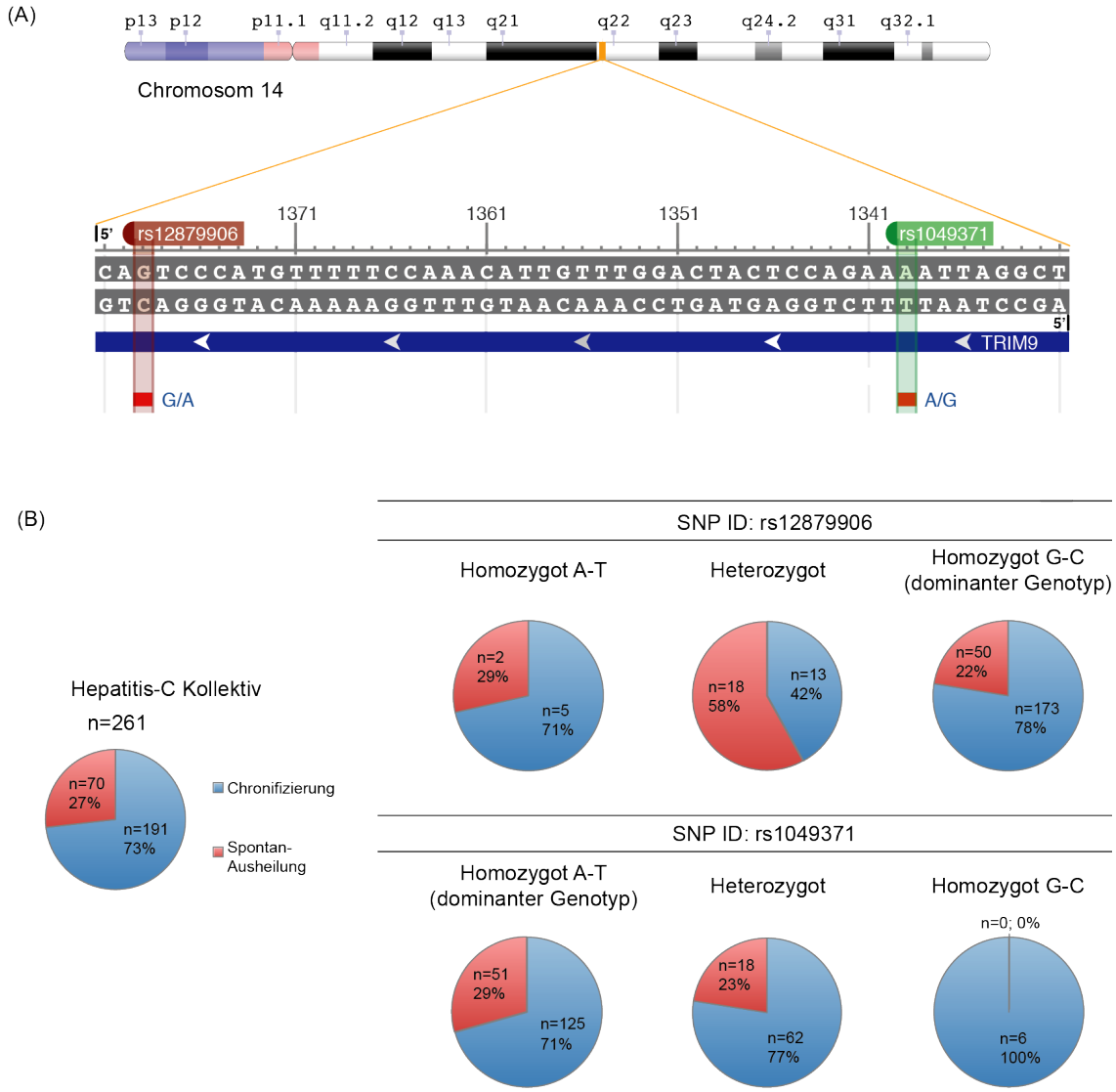


Abbildung 7. Einzelnukleotidpolymorphismen in der TRIM9 3'UTR und deren Einfluss auf den Verlauf von Hepatitis-C Infektionen. (A) Übersicht über die genomische Region 14q22.1 mit einem Ausschnitt aus der TRIM9 3'UTR zwischen Basenposition 1331 und 1382. Die untersuchten SNP werden mit ihrer PubMed-Identifikationsnummer angegeben und befinden sich jeweils in Basenposition 1339 und 1379. **(B)** Genotypische Verteilung hinsichtlich der beiden SNP innerhalb des untersuchten Hepatitis-C-Patientenkollektivs und innerhalb der Patientinnen mit spontan ausgeheilter bzw. chronisch verlaufender Hepatitis-C-Infektion im Vergleich.

und 70 Patientinnen mit spontan ausgeheilter Hepatitis C (SAH). Hinsichtlich des SNP "rs1049371" lagen Daten von insgesamt 263 Patientinnen vor: 70 Patientinnen mit SAH und 193 mit CH. Die Genotypverteilung und die Anteile an CH und SAH innerhalb der jeweiligen Genotypgruppe waren dank Vorarbeiten unserer Kooperationsgruppe an der TUM bereits bekannt (vgl. Abbildung 7-B). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Anzahl an Allelen und die entsprechenden Allelhäufigkeiten in den CH- und SAH-Patientengruppen ausgerechnet und mithilfe des χ^2-Tests gegeneinander verglichen (vgl. Tabelle 28). Dabei wurde ein signifikanter Unterschied in der Allelverteilung

zwischen der CH- und SAH-Patientengruppe hinsichtlich des SNPs “rs12879906” festgestellt, jedoch kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des SNP “rs1049371”. Somit lässt sich anhand der statistisch signifikanten Überrepräsentation des A-T Allels bei rs12879906 in der SAH-Gruppe der Einfluss jenes Polymorphismus auf den Verlauf von Hepatitis-C-Infektionen bestätigen. Diese Aussage kann bezüglich des SNP “rs1049371” jedoch nicht getroffen werden.

Unsere zweite Hypothese stützt sich auf das Wissen über die Beteiligung der 3’UTR an der Regulation der Genexpression (hierzu vgl. auch Abschnitt 4.2.2.1).

Um den Einfluss der SNP in der 3’UTR von TRIM9 auf die TRIM9-Genexpression zu analysieren, verwendeten wir spezielle Reporterplasmide: In diesen folgten die durch Kombination der beiden SNP sich ergebenden vier haplotypischen Varianten der TRIM9 3’UTR auf die für die GLuc kodierende Region (vgl. Abbildung 8-B). Hierbei führte nur die Anwesenheit des Haplotypen “II” – mit der hinsichtlich des SNP “rs1049371” höher prävalenten Basenpaarung und hinsichtlich des SNP “rs12879906” niedrig prävalenten Basenpaarung – zu deutlich gesteigerter Expression des 5’ gelegenen GLuc-Gens (vgl. Abbildung 8-A1). Hingegen führten der Haplotyp “III” – mit der hinsichtlich beider SNP niedrig prävalenten Basenpaarung – ebenso wie der Haplotyp “IV” zu einem Expressionsniveau der GLuc, das dem der natürlichen Verteilung zufolge am höchsten prävalenten Haplotypen “I” glich (vgl. Abbildung 8-A1). Das nicht signifikant-abweichende Expressionsniveau der seAP weist unter allen Bedingungen auf ähnliche Transfektionseffizienzen hin (vgl. Abbildung 8-A2). Zusammenfassend führte die Anwesenheit der niedrig prävalenten Basenpaarung des SNPs “rs12879906” nur bei gleichzeitigem Vorliegen des höher prävalenten A-Allels an SNP “rs1049371“ zu einer gesteigerten Expression des 5’ stromaufwärts gelegenen – und in diesem Experiment für TRIM9 stellvertretenden – GLuc-Gens. Die Unterschiede im Expressionsniveau nivellierten sich, wenn zusätzlich die niedrig prävalente Basenpaarung des SNPs “rs1049371” vorlag, obwohl deren Anwesenheit keinen gegensinnigen Einfluss auf das GLuc-Expressionsniveau hatte.

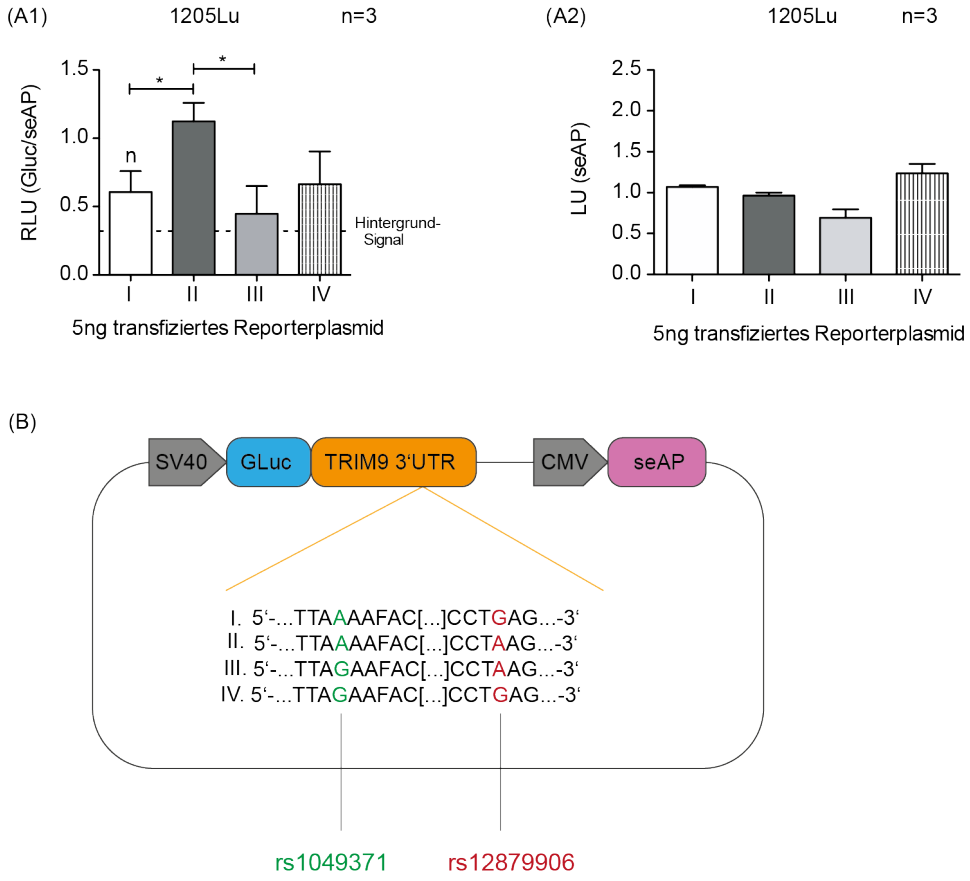


Abbildung 8. Die Einzelnukleotidpolymorphismen in der TRIM9 3'UTR beeinflussen die Expression des 5' stromaufwärts gelegenen Gens der Gauss'schen Luciferase. (A1) Nach Ausplattieren von 30.000 Zellen/Well der 1205Lu Zelllinie wurden am Folgetag 5ng der Reporterplasmide, welche die 3'UTR von TRIM9 mit den unterschiedlichen Haplotyp-Varianten (I, II, III und IV) enthielten, transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Messung der Lumineszenzsignale als Surrogate der Expression der Luciferasegene. Dabei diente die in **(A2)** angegebene Messung des seAP-Lumineszenzsignals als Transfektionskontrolle. Die Werte in (A1) werden als *Relative Light Units* angegeben, d.h. die gemessenen *Light Units* nach Gabe des Substrates für die Gauss'sche Luciferase werden durch die *Light Units,* die nach Zugabe des Substrates für die seAP gemessen werden, geteilt. Den mit „n"markierten Messwerten wurde der Wert 1 zugewiesen und der Messbereich entsprechend normiert. Dargestellt sind die Daten drei unabhängiger Experimente (n=3) als Mittelwert +SEM. Zur statistischen Analyse wurde der Student t-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau ist folgendermaßen angegeben: *=p<0.05.

(B): Abbildung nachgezeichnet und modifiziert nach dem *"pEZX-MT05"*-Vektor der Firma "Genecopoeia". Auf den SV40-Promotor folgt zunächst das Gen der Gauss'schen Luciferase (GLuc) und anschließend die 3' UTR von TRIM9 in vier verschiedenen haplotypischen Varianten (I, II, III und IV) gemäss der vier Kombinationsmöglichkeiten der zwei untersuchten SNPs. Der CMV-Promotor führt zu einer konstanten Expression der seAP, welche als Kontrolle der Experimentierbedingungen dient.

3.3. Etablierung von TRIM9-defizienten Hepatomzellklonen mittels CRISPR-Cas9

Die *in-vitro*-Analyse des Verlaufs von Hepatitis-C-Infektionen in Abhängigkeit des TRIM9-Expressionsniveaus setzt die Verwendung eines geeigneten Zellkulturmodells voraus, das nach Virusinfektion den vollständigen Ablauf des HCV-Lebenszyklus zulässt. Eine diese Anforderung erfüllende Zelllinie ist die im Jahr 2002 von Blight et al. hergestellte und aus der Hepatomzelllinie “Huh-7” abgeleitete “Huh-7.5”-Zelllinie (Blight et al. 2002). Dabei beruht die biologische Permissivität der Huh-7.5-Zellen für HCV unter anderem auf einer mutationsbedingten Inaktivierung der für die HCV-RNA-Erkennung erforderlichen zytosolischen Helikase RIG-I (Blight und Norgard 2006,Sumpter et al. 2005).

In diesem Abschnitt wird die Herstellung TRIM9-defizienter Huh-7.5-Zellen mittels CRISPR-Cas9 beschrieben. Aus Sicherheitsgründen konnten im Rahmen dieser Arbeit keine HCV-Infektionsassays durchgeführt werden. Die generierten Zellen wurden von einer Kooperationsarbeitsgruppe an der Technischen Universität München zu Infektionsexperimenten mit HCV verwendet. Exemplarische Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2.2. präsentiert. Die Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung des Phänotyps von Huh-7.5-*knock-out*-Zellen im Rahmen einer VSV-Infektion werden in Abschnitt 3.5 vorgestellt.

Huh-7.5-Zellen wurden mit einem lentiviralen Vektor, der eine gRNA (vgl. Abbildung 5-A und Tabelle 24) gegen eine im Exon 1 von TRIM9 gelagerte Sequenz, die eCas9-Exonuklease und ein Puromycin-Resistenzgen enthielt, transfiziert. Unter Antibiotikaselektion wurden heranwachsende Einzelzellklone auf Grundlage eines positiven T7-Endonuklease-Verdaus ausgewählt und mittels Immunoblotting auf das Fehlen von TRIM9 untersucht. In Klonen mit fehlenden Banden auf den entsprechenden Höhen wurde die CRISPR-Zielregion sequenziert und hierdurch die Mutationen eindeutig bestimmt (vgl. Abbildung 9). Im Fall des Klons “KO1” war eine eindeutige Mutationsbestimmung aufgrund der Überlagerung der Sequenzen nicht möglich, weshalb anschließend mittels TOPO-TA-Klonierung die Sequenz jedes Allels getrennt voneinander bestimmt wurde (vgl. Abbildung 10-A).

Die mittels Sanger-Sequenzierung festgestellten Mutationen auf jedem einzelnen Allel der drei CRISPR-Klone (vgl. Tabelle 29) bedingten eine Leserasterverschiebung und die Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons. Die CRISPR-Zielregion befindet sich in Position 227-249 auf Exon 1 des Gens von TRIM9. Eine Verschiebung des Leserasters in Exon 1 zieht die Entstehung eines grob veränderten und um mehr als 75 % verkürzten Restproteins nach sich. Da sich kurze und lange Isoform von TRIM9 hinsichtlich des Exons 1 nicht unterscheiden, ist von einer Ausschaltung der Expression beider

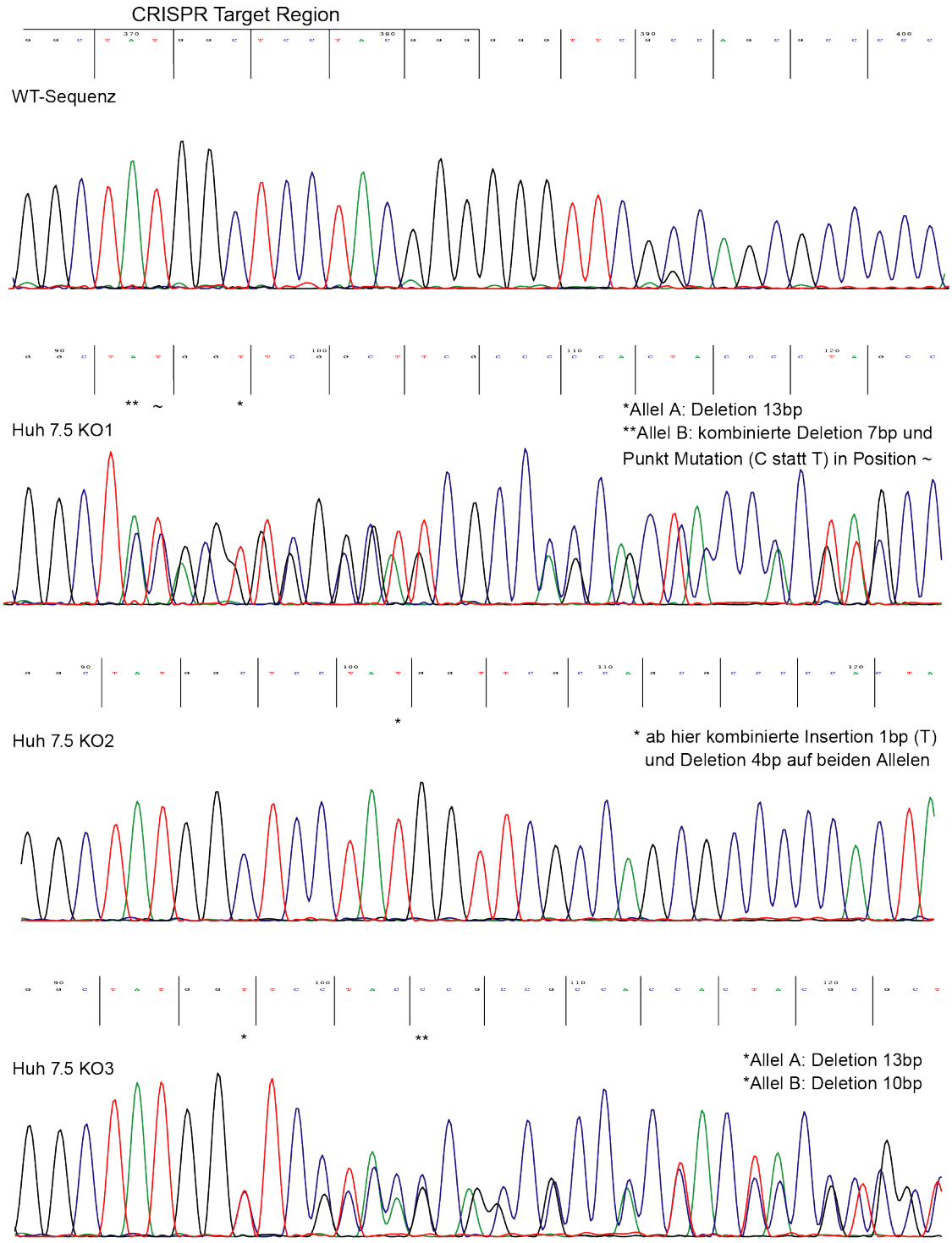


Abbildung 9. Chromatographische Darstellung der durch CRISPR-Cas9 verursachten Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung und damit zu einer Ausschaltung der Expression von TRIM9, führen. Die CRISPR Zielregion wurde mittels PCR amplifiziert. Die über Agarose-Gelelektrophorese darstellbare Bande wurde aus dem Gel extrahiert, die DNA aufbereitet und durch eine externe Firma sequenziert.

TRIM9-Isoformen durch die mutationsbedingte Unterbrechung von Exon 1 auszugehen.

Mittels Immunoblot wurden die einzelnen TRIM9-KO-Klone der Zelllinie Huh-7.5 mit Huh-7.5-WT-Zellen sowie 1205Lu-WT- und -KO-Zelllinien verglichen (vgl. Abbildung 10-B). Beim Huh-7.5-KO1-Klons fehlten die Banden der langen und kurzen Isoform

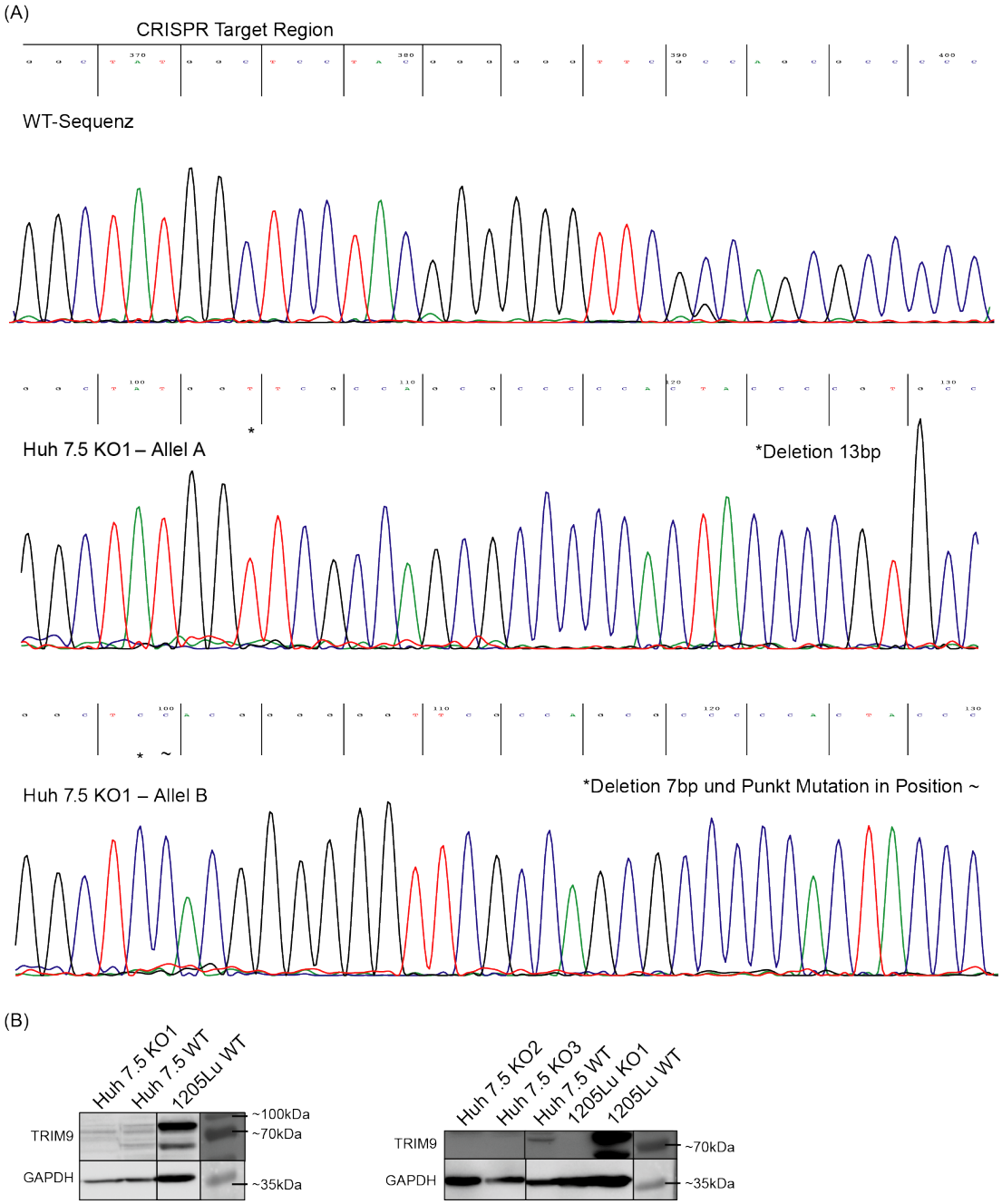


Abbildung 10. (A) Getrennte Betrachtung des Chromatographen jedes einzelnen TRIM9-Allels im Klon KO1. Darstellung der durch CRISPR-Cas9 verursachten Mutationen, die zu einer Leserasterverschiebung, und damit zu einer Ausschaltung der Expression von TRIM9, führen. Die CRISPR Zielregion wurde mittels PCR amplifiziert, und das Amplifikat mittels TOPO-TA-Klonierung in Bakterien überführt. Nach erneuter DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation wurde die Sequenzierung durch eine externe Firma durchgeführt. **(B) Nachweis des Verlusts der TRIM9-Expression auf Proteinebene mittels Western Blot.** Hierbei dienten GAPDH als Ladekontrolle, die Wildtyp-Zelllinien 1205Lu und Huh 7.5 als Negativkontrollen und der 1205Lu KO1-Klon als Positivkontrolle.

von TRIM9 (circa 60 kDa und circa 80-90 kDa). Eine unspezifische Bande bei etwa 70-80 kDa dagegen blieb sowohl im WT als auch im KO sichtbar.

Bei den Huh-7.5-KO2 und -KO3-Klonen ist unter schwächeren Belichtungsbedingungen und bei deutlich weniger Hintergrundsignal ein Fehlen beider Banden zu beobachten (vgl. Abbildung 10-B). Die Bande auf ca. 90 kDA ist im Huh-7.5-WT zu detektieren und fehlt eindeutig in den beiden KO-Klonen. Angesichts der Mutationen auf Genomebene und der eindeutigen Ausschaltung der Expression der langen Isoform ist von einem kompletten Knock-Out beider Isoformen auszugehen.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse ist von einer erfolgreichen stabilen Ausschaltung der Expression beider TRIM9-Isoformen auf Proteinebene auszugehen.

CRISPR-Zielsequenz 5‘→3‘ Basenpositionen 227-249 in TRIM9 Exon 1:			5‘-GCGGCTATGGCTCCTACGGGGGG-3‘
Huh-7.5 Klone		Mutationen	Genotypen
KO #1	Allel 1	Deletion bp 237-250	5‘-GCGGCTATGG----------3‘
	Allel 2	Kombinierte Deletion bp 237-250 und Punktmutation (C gegen T) in bp 234	5‘-GCGGCTACGG----------3‘
KO #2	Beide Allele	Indel-Mutation: Deletion bp 243-247 Insertion 1b (T) in Position 243	5‘-GCGGCTATGGCTCT---------GGGGG-3‘
KO #3	Allel 1	Deletion bp 237-250	5‘-GCGGCTATGG----------3‘
	Allel 2	Deletion bp 244-254	5‘-GCGGCTATGGCTCCTAC----------(...)3‘

Tabelle 29: Übersicht über die stattgefundenen Mutationen und die resultierenden Genotypen der einzelnenTRIM9-KO-Klone der Huh-7.5-Zelllinie.

3.4. Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Stimulation zytoplasmatischer und endosomaler Mustererkennungsrezeptoren.

Als Grundlage folgender Experimente diente einerseits die vorbeschriebene TRIM9-vermittelte Inhibition der Aktivierung des NF-κB-Signalweges (Shi et al. 2014) und andererseits Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu den Auswirkungen des TRIM9-Expressionsniveaus auf die Induktion proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone nach Stimulation von Mustererkennungsrezeptoren der antiviralen Immunität (vgl. Abschnitt 1.4.2) (Rückel 2018). Anlehnend an Shi et al. wurde die Hypothese aufgestellt, TRIM9 habe als negativ regulierendes Protein von NF-κB einen hemmenden Einfluss auf die Sekretion NF-κB-abhängiger Zytokine und Chemokine. Stellvertretend für die Gruppe der proinflammatorischen Zytokine wurde IL-6 gemessen und stellvertretend für die Induktion von ISG wurde IP-10 gemessen (Shi et al. 2014). Die nachfolgenden Experimente wurden *ex vivo* mit primären Zellen von TRIM9-KO und -WT-Mäusen durchgeführt.

Die Stimulation der unten genannten Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems mit entsprechenden synthetischen Liganden führt über einige Zwischenschritte (vgl. Abschnitt 1.2.3.3) zur Aktivierung von IRF-3 und NF-κB.

3.4.1. Zwischen primären Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen zeigt sich kein Unterschied in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach intrazellulärer Stimulation von RLR-, STING und TLR-9.

Um einen möglichen Einfluss von TRIM9 auf die RLR-, STING- und TLR-vermittelte Induktion von IL-6 und IP-10 zu überprüfen, wurden in *loss-of-function*-Experimenten mit Zellen aus TRIM9-KO-Mäusen die Signalwege mit folgenden Stimulanzien aktiviert und die Zytokinproduktion in An- und Abwesenheit von TRIM9 gemessen:

- p(I:C) als MDA5-Ligand. Hierbei wurde p(I:C) komplexiert mit Lipofectamine nach zweistündiger Vorstimulation der Zellen mit Chloroquin (Chlq) zur Blockade des TLR-3-Rezeptors eingesetzt.
- Mittels *in-vitro*-Transkription hergestellte pppRNA als RIG-I Ligand.
- 2'3'-cGAMP als second messenger STING Ligand.
- Murine Oligonukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven (mCpG-B) als TLR-9 Liganden.
- Poly(dA:dT) als indirekter RIG-I Agonist.

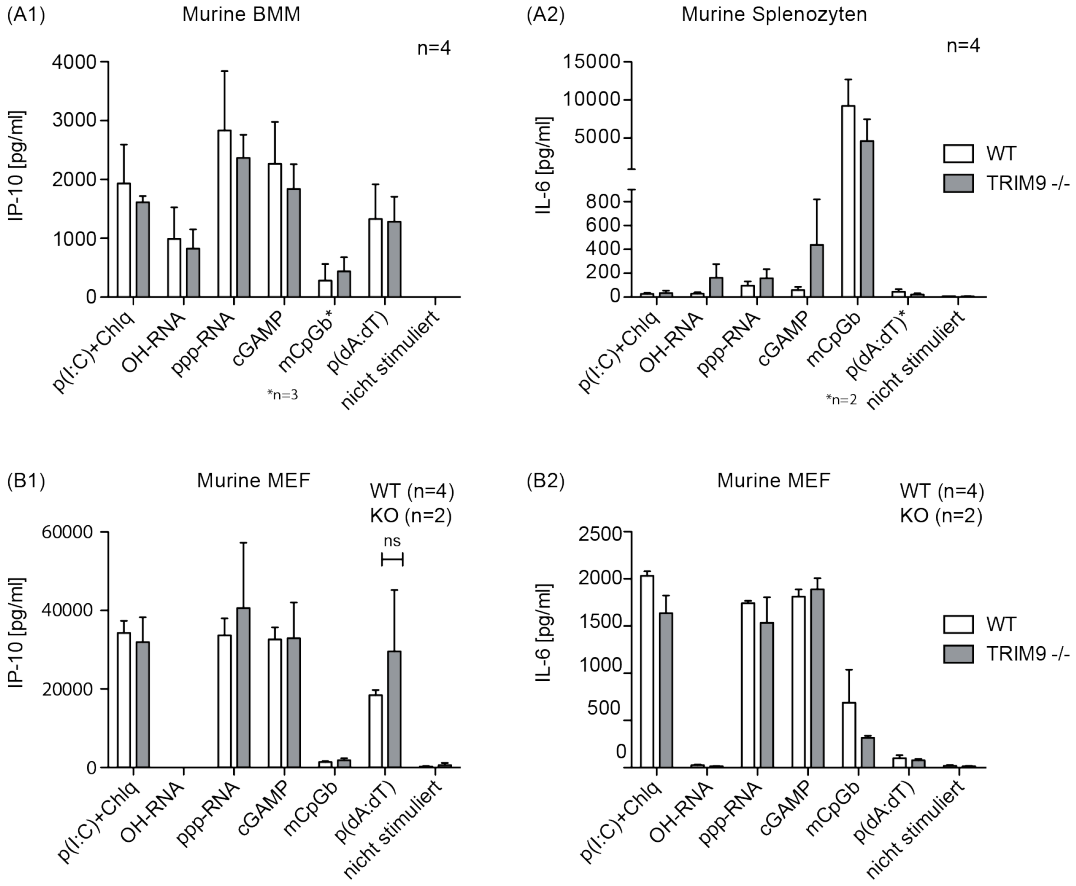


Abbildung 11. Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Stimulation zytoplasmatischer Mustererkennungsrezeptoren. Je nach Ursprungsgewebe wurden unterschiedliche Zellzahlen (s.u.) ausplattiert, ggf. vorbehandelt und bei folgenden Konzentrationen transfiziert: 100ng/ml p(I:C) nach zweistündiger Vorbehandlung mit 25 µM Chlq, 1000 ng/ml ppp-RNA, 4000 ng/ml cGAMP, 10 µg/ml mCpG und 100 ng/ml pdA:dT wobei OH-RNA als Tranfektionskontrolle diente. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Abnahme der Zellüberstände. Die Zytokinkonzentrationen im Überstand wurden mittels ELISA gemessen. **(A1)** Nach Ausplattieren von 350.000 Knochenmarkzellen pro Well im 48-Well Format und 7-tägiger Differenzierung zu BMM wurden die Zellen entsprechend der o.g. Bedingungen transfiziert. **(A2)** Nach Ausplattieren von 100.000 Splenozyten pro Well im 96-Well-Format wurden am Folgetag entsprechend der o.g. Konzentrationen die Zellen transfiziert. **(B1)** und **(B2)** Nach Ausplattieren von 30.000 MEF pro Well im 48-Well-Format wurden am Folgetag entsprechend der o.g. Konzentrationen die Zellen transfiziert. Bei **(A1) und (A2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf die Zahl verwendeter WT- und KO-Mäusen. Bei **(B1) und (B2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf unabhängige Experimente mit MEF, welche von jeweils einer WT- und KO-Maus isoliert worden waren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der Student's t-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau ist folgendermaßen angegeben: nicht signifikant (ns) = $p>0.05$.

Als Negativkontrollen der Experimente dienten eine nicht-immunstimulatorische OH-RNA ohne freies 5'-Triphosphatende und eine Bedingung ohne jegliche Stimulation der Zellen („nicht stimuliert"). Die sehr schwache bzw. ausbleibende Reaktion der Zellen

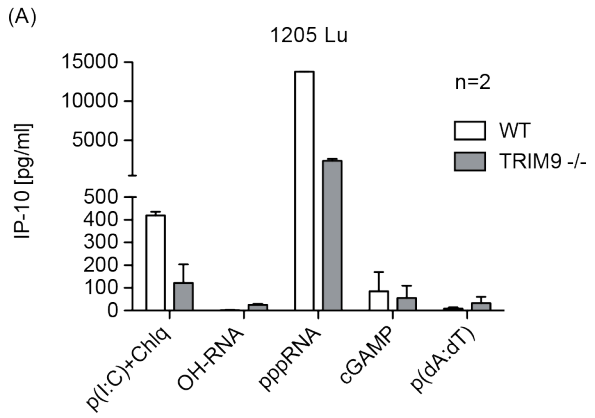


Abbildung 12. TRIM9-defiziente Zellen der Zelllinie 1205 Lu weisen eine reduzierte Sekretion von IP-10 nach Stimulation von intrazellulären PRRs auf. Es wurden 15.000 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausplattiert und nach 24 Stunden bei folgenden Bedingungen mit Stimulanzien tranfiziert: 100 ng/ml p(I:C) nach zweistündiger Vorbehandlung mit 25 µM Chloroquin, 1000 ng/ml ppp-RNA, 4000 ng/ml cGAMP und 100 ng/ml pdA:dT wobei OH-RNA als Transfektionskontrolle diente. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Abnahme der Zellüberstände und die Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA. Die angegebene n-Zahl bezieht sich auf unabhängige Experimente. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt.

auf OH-RNA-Stimulation und auf nicht-Stimulation weist auf eine technisch gelungene Durchführung des Experiments hin.

In diesen Experimenten konnten unter keiner der untersuchten Stimulationsbedingungen signifikante Unterschiede zwischen WT- und TRIM9-KO-Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11-A und -B). Lediglich die Reaktion auf die einzelnen Liganden und die Quantität an produzierten Zytokinen unterschieden sich deutlich von einem Zelltyp zum anderen. Diese Unterschiede reflektieren die verschiedenartige Ausstattung der verwendeten Zelltypen mit Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems und die abweichenden experimentellen Bedingungen zwischen den einzelnen Zelltypen (vgl. Legende von Abbildung 11). Der Knock-Out von TRIM9 auf genomischer Ebene hatte jedoch keinen wesentlichen Einfluss auf die produzierten Zytokinmengen.

Im Gegensatz zu den primären Mauszellen wiesen Zellen der humanen Melanomzelllinie “1205Lu” Unterschiede zwischen WT und TRIM9-KO auf. Hierbei zeigte sich in zwei unabhängigen Versuchen eine reduzierte IP-10-Sekretion in TRIM9-KO-Zellen nach Stimulation von MDA5 und RIG-I (vgl. Abbildung 12). Die intrazelluläre STING- bzw. TLR-9-Stimulation gelang nicht, da diese Zelllinie diese Rezeptoren nicht exprimiert.

3.4.2. Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach endosomaler Stimulation von TLR-3, -7, -8 und -9 auf.

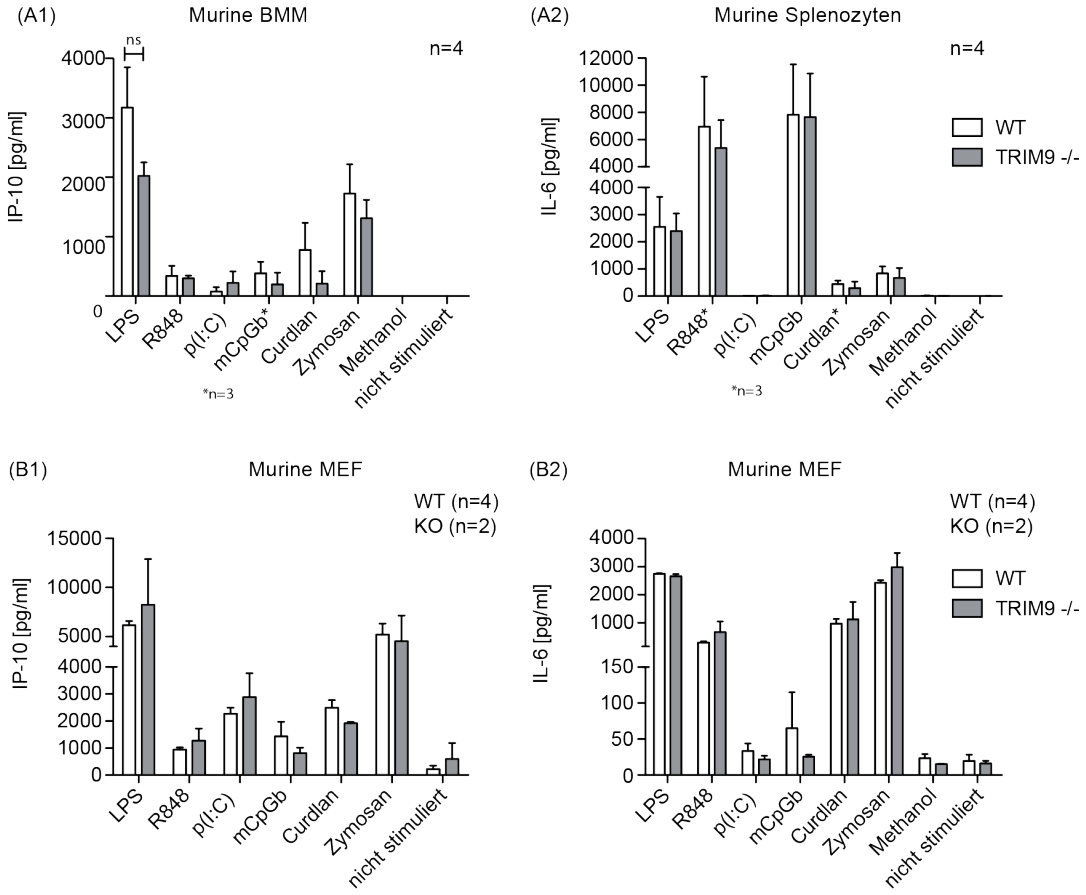


Abbildung 13. Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Stimulation membranständiger Mustererkennungsrezeptoren. Je nach Ursprungsgewebe wurden unterschiedliche Zellzahlen ausplattiert, ggf. vorbehandelt und mit Stimulanzien in folgenden Konzentrationen stimuliert: 250ng/ml LPS, 5µg/ml R848, 400ng/ml p(I:C) ohne Vorbehandlung, 2000 ng/ml mCpG, 50µg/ml Curdlan und 10µg/ml Zymosan. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte die Abnahme der Zellüberstände. Die Zytokinkonzentrationen im Überstand wurden mittels ELISA gemessen. **(A1)** Nach Ausplattieren von 350.000 Knochenmarkzellen pro Well im 48-Well Format und 7-tägiger Differenzierung zu BMM wurden die Zellen entsprechend der o.g. Bedingungen transfiziert. **(A2)** Nach Ausplattieren von 100.000 Splenozyten pro Well im 96-Well-Format wurden am Folgetag entsprechend der o.g. Konzentrationen die Zellen transfiziert. **(B1) und (B2)** Nach Ausplattieren von 30.000 MEF pro Well im 48-Well-Format wurden am Folgetag entsprechend der o.g. Konzentrationen die Zellen transfiziert. Bei **(A1) und (A2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf die Zahl der verwendeten WT- und KO-Mäuse. Bei **(B1) und (B2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf unabhängige Experimente mit MEF, welche von jeweils einer WT- und KO-Maus isoliert worden waren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt.

In diesem Abschnitt wird der Einfluss des TRIM9 Knock-Outs auf die TLR-3,-7,-8,-9 vermittelte Sekretion von IL-6 und IP-10 untersucht. Hierzu wurden folgende Stimulanzien verwendet:

- Polyinosin-Polycytosin-Säure (pI:C) als TLR-3 Agonist. Es wurde hierbei keine Vorbehandlung mit Chloroquin durchgeführt und kein Transfektionagens benutzt. Ziel dieses Vorgehens ist es, eine vorrangige Stimulation membranständiger TLR-3 Rezeptoren zu erreichen und keine Aktivierung von RLRs.
- Resiquimod (R848) als TLR-7 und -8 Agonist.
- Murine Oligonukleotide mit unmethylierten CpG-Motiven (mCpG-B) als TLR-9 Liganden.
- Lipopolysaccharid (LPS) als TLR-4 Agonist aktiviert einen Signalweg der antibakteriellen Immunität. Es dient an dieser Stelle der Kontrolle der experimentellen Methodik.
- Die zwei Glucosepolymere Curdlan (1,3)-β-glucan und Zymosan wurden als Dectin-1 bzw. Dectin-1 und TLR-2 Agonisten eingesetzt. Jene Liganden simulieren eine Pilzinfektion.
- Als Negativkontrollen dienten eine Methanol-haltige PBS-Kontrolle, da R848 in Methanol gelöst vorlag, und eine Bedingung ohne jegliche Stimulation der Zellen.

Analog zu 3.4.1. konnten unter keiner einzelnen Stimulationsbedingung signifikante Unterschiede zwischen WT- und TRIM9-KO Zellen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 13-A und -B). In diesem Fall wirkt sich entsprechend 3.4.1. die unterschiedliche Ausstattung der einzelnen Zelltypen mit Mustererkennungsrezeptoren auf die Reaktion

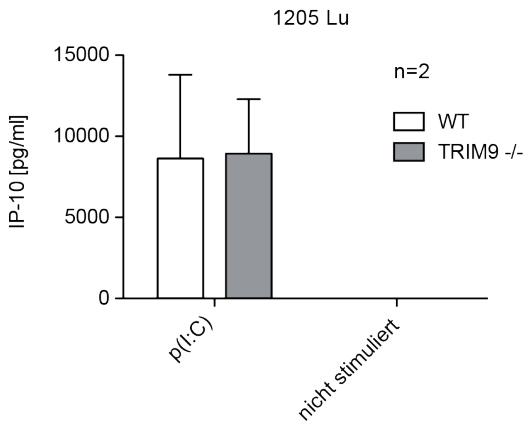


Abbildung 14. TRIM9-defiziente Zellen der Zelllinie 1205 Lu weisen keine reduzierten Sekretion von IP-10 nach Stimulation des membranständigen TLR-3 Rezeptors auf. Es wurden 15.000 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausplattiert und nach 24 Stunden unter folgenden Bedingungen tranfiziert: 400 ng/ml p(I:C) ohne Vorbehandlung mit Chloroquin und ohne Nutzung eines Transfektionsreagenzes. 24 Stunden nach Stimulation erfolgte die Abnahme der Zellüberstände und die Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA. Die angegebene n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl unabhängiger Experimente. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt.

nach Stimulation aus. Der Knock-Out von TRIM9 auf genomischer Ebene hatte keinen Einfluss auf die produzierten Zytokinmengen. In humanen 1205Lu-Zellen ergab die TLR-3-Stimulation mit p(I:C) keine Unterschiede zwischen WT- und TRIM9-KO-Zellen (vgl. Abbildung 14).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass murine TRIM9-KO-Zellen keinen von Wildtypzellen abweichenden Phänotyp hinsichtlich der durch Mustererkennungs-rezeptoren vermittelten Sekretion von IL-6 und IP-10 aufweisen.

3.5. Die TRIM9-Defizienz fördert in humanen Melanomzellen, jedoch nicht in primären murinen Zellen, die Virus-induzierte Zytokinsekretion und Replikation von RNA-Viren.

Analog zu 3.4 wird in diesem Abschnitt der Frage nachgegangen, ob TRIM9 einen Einfluss auf die NF-κB- und IRF-3-abhängige Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone im Rahmen von Infektionen mit Einzelstrang-RNA-Viren hat. Anteile der genomischen Einzelstrang-RNA sowie manche RNA-Intermediärprodukte der Replikation der verwendeten Viren werden von Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt und lösen eine Immunantwort aus. Diese wurde über die Sekretion von Zytokinen wie IP-10 und IL-6 quantifiziert. Die Virusreplikation wurde entweder mittels Endpunktverdünnungsassay oder mittels Durchflusszytometrie gemessen.

3.5.1. Infektionen mit Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse von Infektionsexperimenten mit VSV- und Sendai-Viren vorgestellt. Die Erkennung des VSV-Viruses über RIG-I ist essenziell für die Auslösung einer Immunantwort (Kato et al. 2006). Die im Zuge des VSV-Lebenszyklus' produzierten RNA-Moleküle besitzen ein freies 5' Triphosphatende und fungieren als RIG-I-Liganden. Das VSV-Wildtyp-(wt)-Virus kann mithilfe seines M-Proteins die Typ-I-Interferon-Antwort der Wirtszelle eindämmen (Maclachlan et al. 2017). Bei Infektionen mit der M51R-Mutante des VSV-Virus wird aufgrund einer Mutation im M-Protein seine eindämmende Wirkung auf die Interferonantwort des Wirtes aufgehoben.

Das Sendai-Virus wird nach heutigem Verständnis primär von RIG-I aber sekundär auch von MDA-5 und TLR-7 erkannt (Ohman et al. 2015).

Zunächst werden die Ergebnisse von *ex-vivo* Experimenten mit primären murinen Zellen präsentiert. Anschließend werden diese mit Experimenten in humanen Tumorzelllinien verglichen.

3.5.1.1. Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit Einzelstrang-RNA-Viren negativer Polarität auf.

Es wurden die gleichen Zellsysteme verwendet wie in Abschnitt 3.4. In den verschiedenen Zelltypen kam es zu erheblichen Unterschieden hinsichtlich der Quantität der produzierten Zytokine. Zellen, welche mit der VSV-Mutante "VSV-M51R" infiziert wurden, zeigten erwartungsgemäß eine verstärkte Sekretion von IP-10 und IL-6 im Vergleich zu VSV-wt-infizierten Zellen (vgl. Abbildung 15-A und -B). Zwischen WT- und

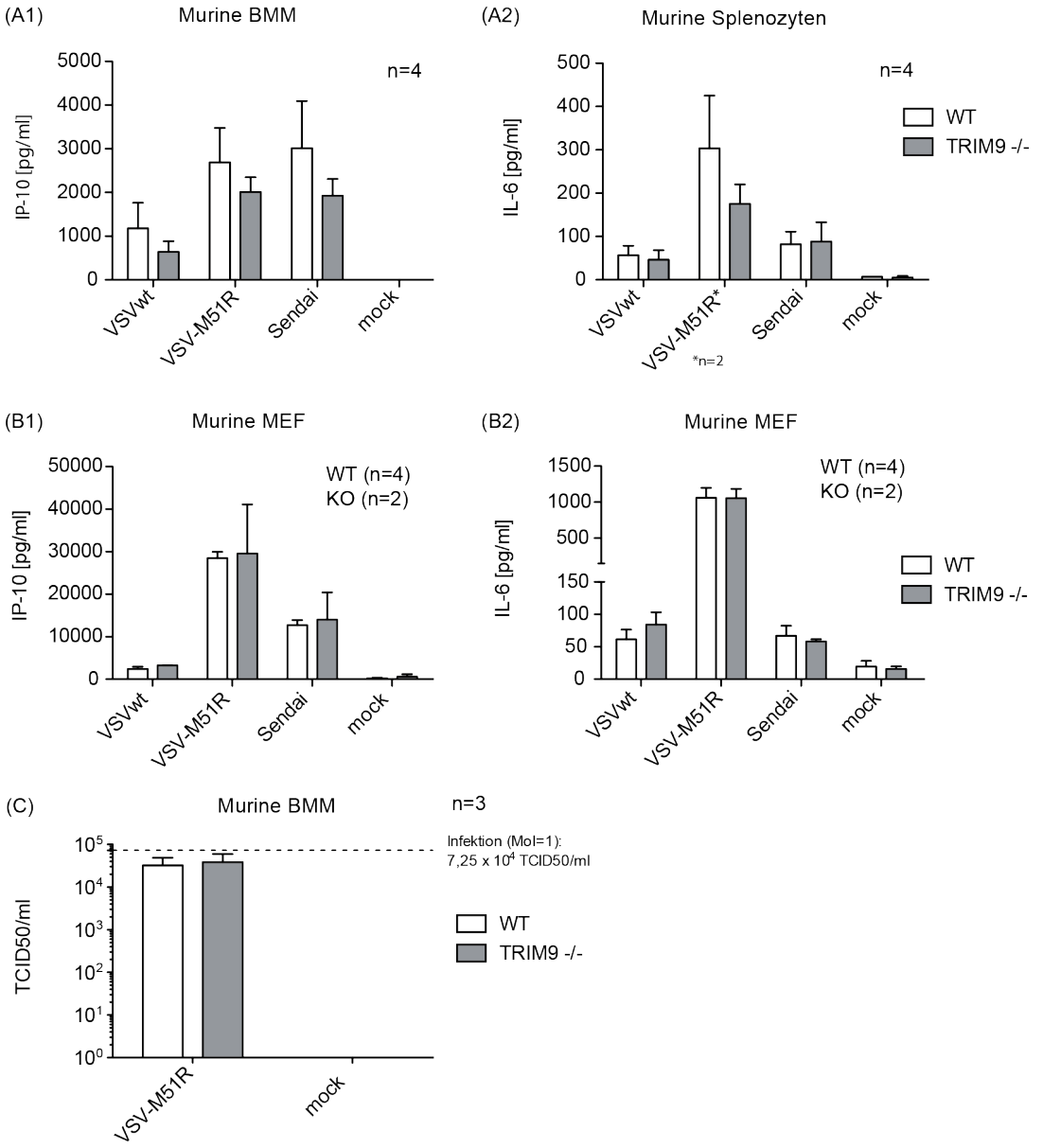


Abbildung 15. Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit (-)ssRNA-Viren (A/B) sowie auf die Replikation von VSV-M51R (C). Je nach Ursprungsgewebe wurden unterschiedliche Zellzahlen ausplattiert und in folgenden Zahlenverhältnissen bzw. in folgender Konzentration mit Viruspartikeln infiziert: VSVwt MoI=1, VSV-M51R MoI=1 und Sendai 20 U/ml. 24 Stunden nach Infektion wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA gemessen bzw. der Virustiter mittels Endpunktverdünnung bestimmt. **(A1/C)** Nach Ausplattieren von 350.000 Knochenmarkzellen pro Well im 48-Well Format und 7-tägiger Differenzierung zu BMM erfolgte anschließend die Infektion. **(A2)** Nach Ausplattieren von 100.000 Splenozyten pro Well im 96-Well-Format erfolgte am Folgetag die Infektion. **(B1)** und **(B2)** Nach Ausplattieren von 30.000 MEF pro Well im 48-Well-Format erfolgte am Folgetag die Infektion. Bei **(A1), (A2) und (C)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf die Zahl verwendeter WT- und KO-Mäuse. Bei **(B1) und (B2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf unabhängige Experimente mit MEF, welche von jeweils einer WT- und KO-Maus isoliert worden waren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt.

TRIM9-KO-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede in der virusinduzierten Sekretion von IP-10 und IL-6 festgestellt werden. Es konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen WT und KO-Zellen hinsichtlich der VSV-M51R-Virusreplikation im Endpunktverdünnungsassay festgestellt werden (vgl. Abbildung 15-C).

3.5.1.2. VSV repliziert in TRIM9-defizienten humanen 1205Lu- und Huh-7.5.-Zellen schlechter und induziert geringere Mengen an IP-10 als in WT-Zellen.

Die Ergebnisse in Tumorzelllinien humanen Ursprungs boten dagegen ein anderes Bild. WT- und TRIM9-KO-Zellen der Zelllinie 1205Lu wurden mit grünfluoreszierendem GFP-markiertem VSV infiziert. Als Maß der Virusreplikationsrate wurde postinfektiös der Anteil grünfluoreszierender Zellen gemessen. Hierbei wurde zur Festlegung des FACS-Gates mit einer Probe nicht-infizierter Zellen verglichen (vgl. Abbildung 16-A). Auf Basis der 1205Lu-Zelllinie konnte in TRIM9-KO-Zellen ein signifikant reduzierter Anteil grünfluoreszierender Zellen nach Infektion mit VSV-GFP nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 16-B). Dies weist auf eine wirkungsvolle Suppression der Virusreplikation in TRIM9-KO-Zellen hin. Ebenfalls supprimiert zeigte sich die IP-10 Sekretion nach Virusinfektion, allerdings ohne statistische Signifikanz (vgl. Abbildung 16-C).

Die simultan verminderte Virusreplikation und verminderte Immunantwort in TRIM9-KO-Zellen geht vermutlich auf die reduzierte Entstehung von RNA-Zwischenprodukten während der Virusreplikation zurück. Demnach führt die verminderte Virusreplikation in TRIM9-KO-Zellen zur Entstehung einer geringeren Anzahl von viralen Replikationszwischenprodukten und somit auch zu einer reduzierten Menge von funktionellen RLH- und TLR-Liganden. Bei dieser Erklärungshypothese führt die im Vergleich zu WT-Zellen reduzierte Anzahl an PRR-Liganden in KO-Zellen führt zu weniger Immunstimulation in KO-Zellen und somit zu weniger IP-10-Sekretion.

Auf Basis der Huh-7.5-Zelllinie wurde im Rahmen dieser Arbeit lediglich ein Versuch zur Bestimmung des Verlaufs von VSV-Infektionen in Abhängigkeit der Zeit durchgeführt (Abbildung 17). Huh-7.5-TRIM9-KO-Zellen wiesen in Übereinstimmung mit dem beobachteten Phänotyp von 1205Lu-TRIM9-KO-Zellen eine Tendenz zur Suppression der Virusreplikation auf. Aufgrund der lediglich einmaligen Durchführung wurden die Ergebnisse dieses Versuchs statistisch nicht analysiert.

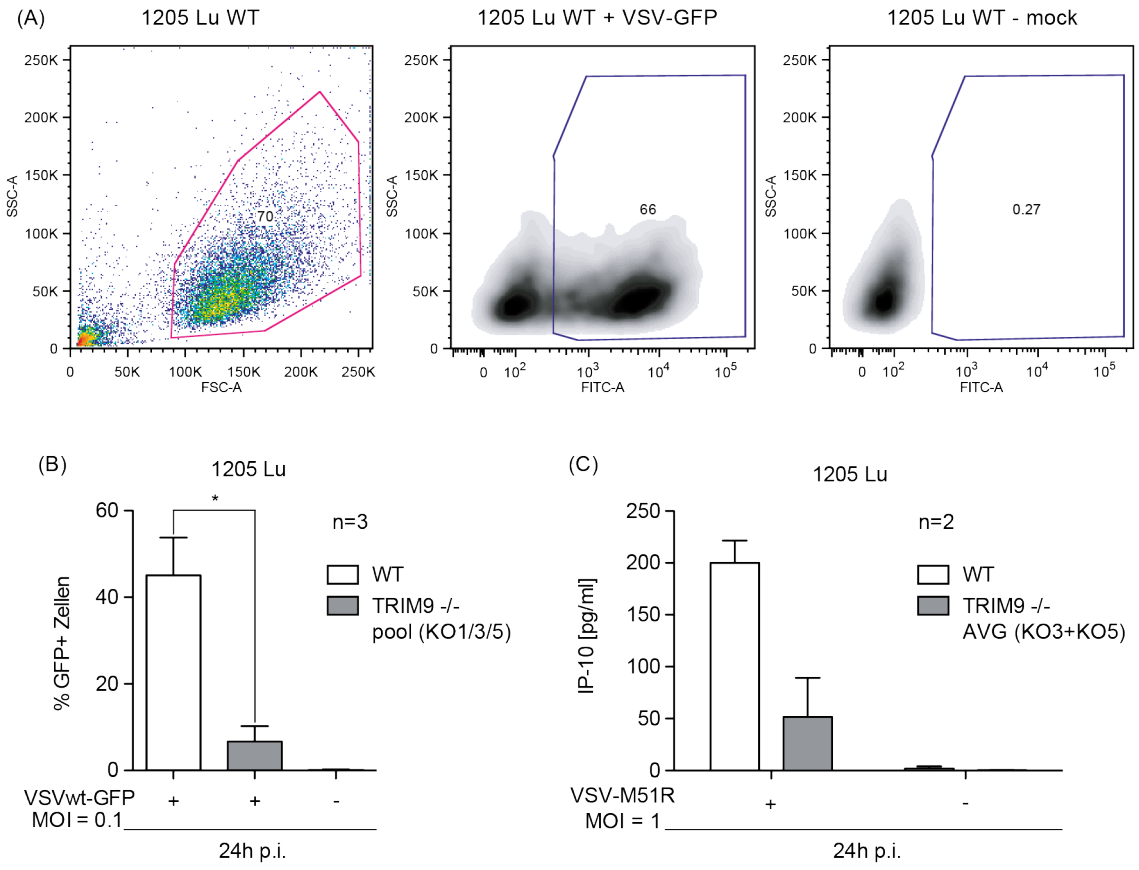


Abbildung 16: VSV repliziert in TRIM9-defizienten 1205Lu-Zellen schlechter und induziert geringere Mengen an IP-10 als in WT-Zellen. (A) Repräsentative Gating-Strategie anhand des durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenzsignal nach einer Infektion mit VSV-GFP. **(B)** Es wurden 60.000 1205Lu-Zellen pro Well im 24-Well-Format ausplattiert. Dabei wurden die Zellen von drei unterschiedlichen KO-Klonen in einem Verhältnis von 1:1:1 zusammengemischt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit VSVwt (MOI=0,1). 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Emission eines GFP-Signals untersucht. **(C)** Es wurden 15.000 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausplattiert. Dabei wurden die TRIM9-KO-Klone, KO3 und KO5, in zwei parallelen Ansätzen behandelt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit VSV-M51R (MoI=1). 24 Stunden nach Infektion erfolgte die Abnahme der Zellkulturüberstände zur Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA. Die Ergebnisse für die Klone KO3 und KO5 wurden zusammengefasst und als Mittelwert (AVG) präsentiert. Die angegebene n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl unabhängiger Experimente. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt. Zur statistischen Analyse wurde der Student's t-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau ist folgendermaßen angegeben *=p<0.05**.**

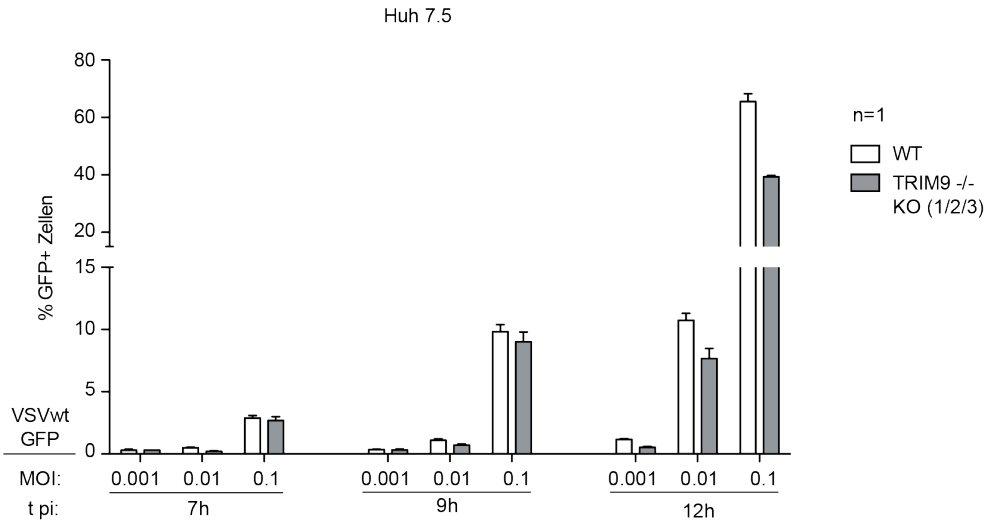


Abbildung 17: VSV repliziert in TRIM9-defizienten Huh-7.5-Zellen schlechter als in WT-Zellen. Es wurden 60.000 Huh-7.5-Zellen pro Well im 24-Well-Format ausplattiert. Dabei wurden die Zellen von drei unterschiedlichen KO-Klonen (KO1/2/3) in einem Verhältnis von 1:1:1 zusammengemischt. Nach 24 Stunden erfolgte die Infektion mit VSVwt in steigenden MOIs. Nach 7, 9 bzw. 12 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Emission eines GFP-Signals untersucht. Das Experiment wurde einmal durchgeführt (n=1). Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt. Der SEM ist als methodischer Fehler entsprechend des in technischen Duplikaten durchgeführten Experiments dargestellt.

3.5.2. Infektionen mit Einzelstrang-RNA-Viren positiver Polarität

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse von *ex-vivo*-Infektionsassays unter Verwendung folgender ss(+)RNA-Viren vorgestellt: EMCV, SFV, Mengo-Virus und Gelbfieber-Virus. Nach heutigem Verständnis werden Replikationszwischenprodukte von EMCV und Mengo-Virus hautsächlich von MDA5 erkannt (Jensen und Thomsen 2012,Kato et al. 2006,Zhu et al. 2018). An der Erkennung von SFV ist RIG-I zwar beteiligt, allerdings scheinen MDA5 und die Proteinkinase-R (PKR) die entscheidenden Rezeptoren zu sein (Schulz et al. 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Gelbfieber Impfvirus YF-17D (abgekürzt YFV) für Infektionsexperimente verwendet. YF-17D kann auf dendritischen Zellen mehrere verschiedene TLR-Rezeptoren aktivieren (Querec et al. 2006). Außerdem geht man von einer Erkennung des Impfvirus über RIG-I und MDA5 aus, welche mit der Aktivierung nachgeschalteter Signalwege einhergeht (Querec et al. 2009).

3.5.2.1. Primäre Zellen von WT- und TRIM9-KO-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit Einzelstrang-RNA-Viren positiver Polarität auf.

Folgende Zelltypen wurden aus Mäusen isoliert bzw. aus primären murinen Zellen generiert und anschließend einer Infektion mit ss(+)RNA-Viren ausgesetzt: Aus Knochenmarkszellen differenzierte Makrophagen (BMM), unbehandelte Mausmilzzellen (murine Splenozyten) und murine embryonale Fibroblasten (MEF). Die einzelnen Zelltypen reagierten mit höchst unterschiedlichen Zytokinmengen auf die Infektion. Das Mengo-Virus führte zur höchsten Zytokinausschüttung in BMM und MEF (vgl. Abbildung 18-A1, -B1 und -B2). Die Zytokinantwort nach Infektion mit dem Mengo-Virus zeigte sich in TRIM9-defizienten MEF tendenziell abgeschwächt im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (vgl. Abbildung 18-B1 und -B2) – jedoch ohne statistische Signifikanz. Das EMCV-Virus führte zu keiner Zytokinsekretion in MEF (vgl. Abbildung 18- B1 und -B2). Das SFV- und das Mengo-Virus erwiesen sich als replikationsinkompetent in BMM-Zellen (vgl. Abbildung 18-C). Das EMCV-Virus erwies sich hingegen als replikationskompetent (vgl. Abbildung 18-C). In der Summe wurden zwischen WT- und TRIM9-KO-Zellen statistisch signifikante Unterschiede weder hinsichtlich der virusinduzierten IP-10- und IL-6-Sekretion (vgl. Abbildung 18-A und -B) noch hinsichtlich der Virusreplikation im Endpunktverdünnungsassay (vgl. Abbildung 18C) festgestellt. Der Knock-Out von TRIM9 scheint in den verwendeten murinen Zellmodellen keinen Einfluss auf die Immunantwort in Reaktion auf ss(+)RNA-Virusinfektionen und auf die Virusreplikation zu haben.

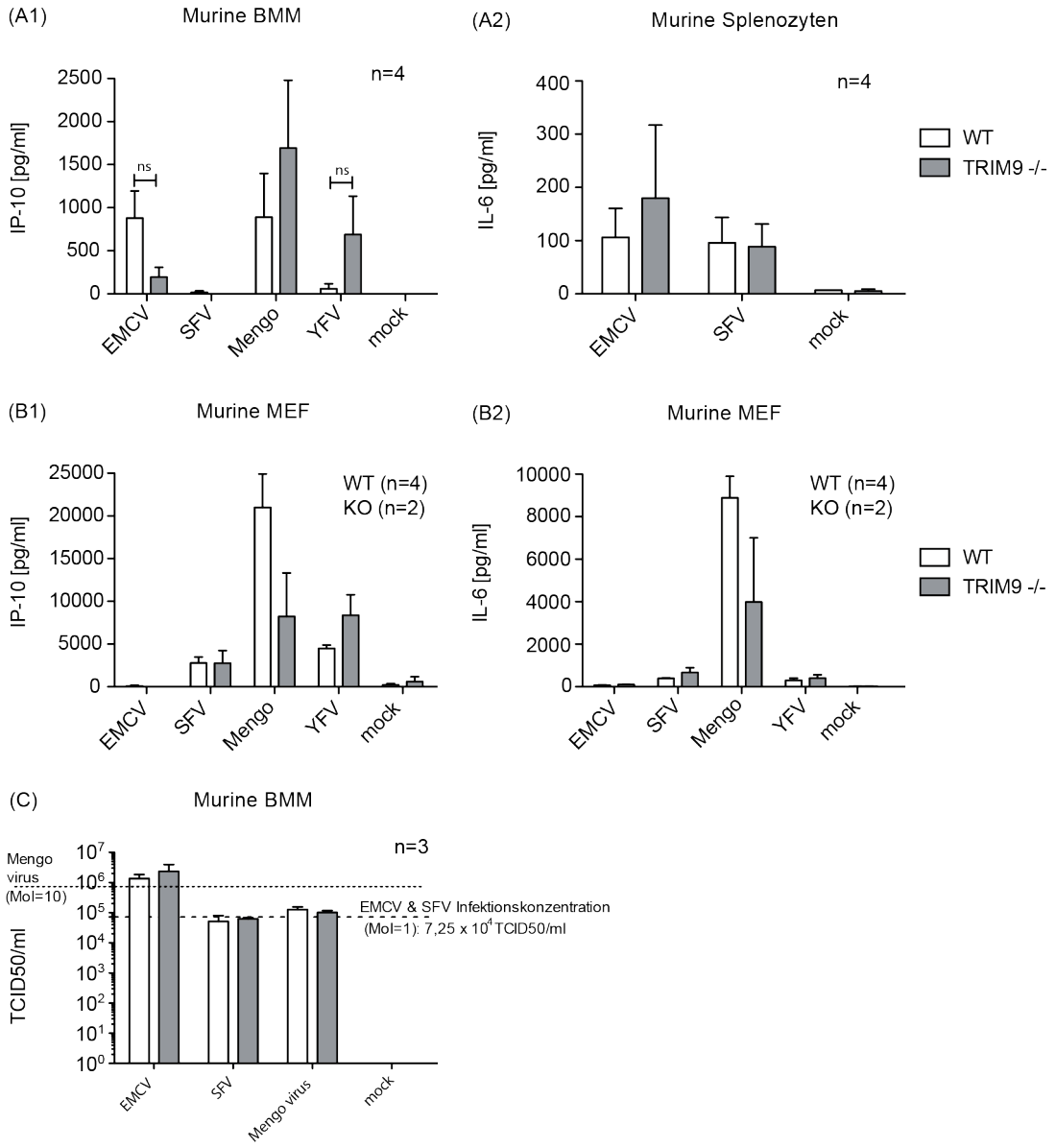


Abbildung 18: Die TRIM9-Defizienz in primären murinen Zellen hat keinen signifikanten Einfluss auf die Sekretion von IP-10 und IL-6 nach Infektion mit (+)ssRNA-Viren (A/B) sowie auf die Replikation von (+)ssRNA-Viren (C). Je nach Ursprungsgewebe wurden unterschiedliche Zellzahlen ausplattiert und in folgenden Zahlenverhältnissen mit Viruspartikeln infiziert: EMCV MoI=1, SFV MoI=1 und YFV MoI=25. 24 Stunden nach Infektion wurde die Zytokinkonzentration im Überstand mittels ELISA gemessen bzw. der Virustiter mittels Endpunktverdünnung bestimmt.**(A1/C)** Nach Ausplattieren von 350.000 Knochenmarkzellen pro Well im 48-Well Format und 7-tägiger Differenzierung zu BMM erfolgte anschließend die Infektion. **(A2)** Nach Ausplattieren von 100.000 Splenozyten pro Well im 96-Well-Format erfolgte am Folgetag die Infektion. **(B1)** und **(B2)** Nach Ausplattieren von 30.000 MEF pro Well im 48-Well-Format erfolgte am Folgetag die Infektion. Bei **(A1), (A2) und (C)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf die Zahl verwendeter WT- und KO-Mäuse. Bei **(B1) und (B2)** bezieht sich die angegebene n-Zahl auf unabhängige Experimente mit MEF, welche von jeweils einer WT- und KO-Maus isoliert worden waren. Die Daten sind als Mittelwerte +SEM dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde mit dem Student's t-Test bestimmt und ist folgendermaßen angegeben: nicht signifikant (ns) = $p>0.05$**.**

3.5.2.2. SFV induziert in TRIM9-defizienten humanen 1205Lu-Zellen eine höhere Menge an IP-10 im Vergleich zu WT-Zellen.

Lediglich das SFV-Virus wurde aus der Gruppe der ss(+)RNA-Viren zur Infektion von 1205Lu-Zellen verwendet. In zwei unabhängigen Experimenten konnte eine Tendenz zur erhöhten Sekretion von IP-10 in TRIM9-KO-Zellen beobachtet werden (vgl. Abbildung 19). Die geringe Anzahl der Wiederholungen des Experiments erlaubte keine Aussage über statistische Signifikanz. Allerdings stimmte die Richtung des Effekts mit Ergebnissen von Vorarbeiten der Gruppe (vgl. Abschnitt 1.4.2) (Rückel 2018) sowie mit Ergebnissen von HCV-Infektionsassays unserer Kooperationsgruppe an der TU München überein (vgl. Abschnitt 4.2.2.2 und Abbildung 23).

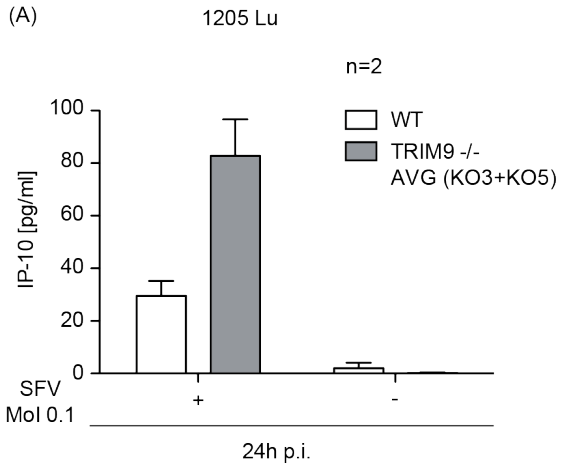


Abbildung 19: TRIM9-defiziente Zellen der Zelllinie 1205 Lu weisen eine Tendenz zur erhöhten Sekretion von IP-10 nach Infektion mit (+)ssRNA-Viren. Es wurden 15.000 Zellen pro Well im 96-Well-Format ausplattiert. Dabei wurden die TRIM9-KO-Klone, KO3 und KO5, in zwei parallelen Ansätzen behandelt. Am nächsten Tag erfolgte die Infektion mit SFV (MoI=1). 24 Stunden nach Infektion wurden die Zellüberstände zur Messung der Zytokinkonzentration mittels ELISA abgenommen. Die Ergebnisse für die Klone KO3 und KO5 wurden zusammengefasst und als Mittelwert präsentiert. Die angegebene n-Zahl bezieht sich auf die Anzahl unabhängiger Experimente.

3.6. Der Einsatz von siRNA zur gezielten Ausschaltung der Expression einzelner TRIM9-Isoformen hat eine unspezifische und vom Expressionsniveau unabhängige Wirkung auf die Replikation von VSV.

Im Jahr 2016 beschrieben Qin et al. einen verstärkenden Effekt der kurzen – aber nicht der langen – Isoform von TRIM9 (TRIM9s) auf die Typ-I-IFN-Antwort ebenso wie einen hemmenden Effekt von TRIM9s auf die Virusreplikation im Rahmen von Infektionen mit RNA-Viren (vgl. Abschnitt 1.3.2.2) (Qin et al. 2016). Die Schlussfolgerungen der erwähnten Publikation basierten teilweise auf Daten, welche mittels siRNA-Knockdown

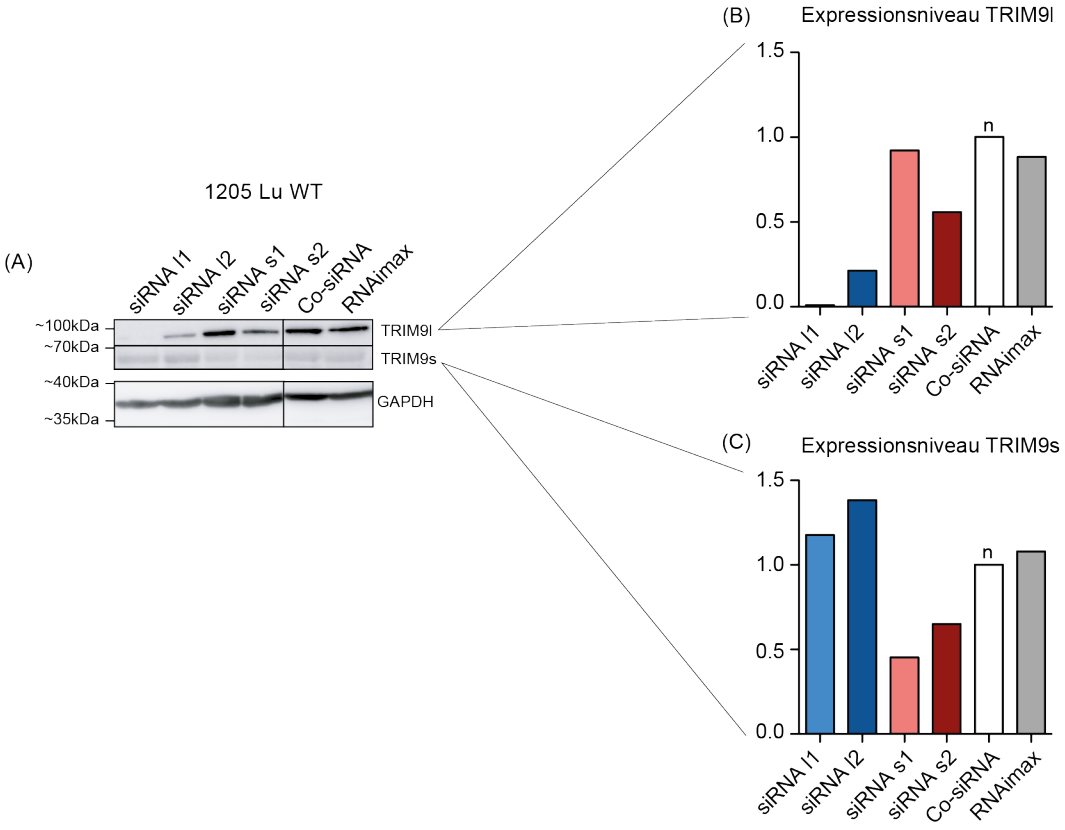


Abbildung 20: Der Einsatz spezifisch gegen die kurze bzw. lange TRIM9-Isoform gerichteter siRNAs bewirkt eine Reduktion der Expression der entsprechenden TRIM9-Isoform. (A) Der Immunoblot illustriert die Knockdown-Effektivität auf die Proteinmenge der langen und kurzen TRIM9-Isoform nach Behandlung mit isoform-spezifischer siRNA. 60.000 1205Lu-WT-Zellen wurden im 24-Well-Format ausplattiert und simultan mit 20nM der angegebenen siRNAs invers transfiziert. 18 Stunden später wurden die Zellen lysiert, wobei die Lysate von technischen Duplikaten vermischt wurden sowie mit Hilfe von PAGE und Western blot aufgetrennt und mit einem beide TRIM9-Isoformen delektierenden Antikörper gefärbt wurden. **(B/C)** Mithilfe der Software *Image Studio Lite* wurden die Signalintensitäten der TRIM9l- [(in (B) aufgeführt] und TRIM9s-Banden [in (C) aufgeführt] der Banden aus den Originalbildern quantifiziert. Anschließend wurde den mit „n“markierten Messwerten der Wert 1 zugewiesen und der Messbereich entsprechend normiert. Dargestellt sind die Daten eines Experiments (n=1).

der einzelnen TRIM9-Isoformen erarbeitet wurden. Um die Spezifität der von Qin et al. eingesetzten siRNAs gegen die kurze (s1 und s2) und lange (l1 und l2) Isoform von TRIM9 zu überprüfen, wurde versucht, die Experimente von Qin et al. nach demselben Protokoll in einer Zelllinie mit stabilem Knock-Out der Expression von TRIM9 zu reproduzieren. Anstatt der in der erwähnten Publikation verwendeten A549-Zelllinie wurde die 1205Lu-Zelllinie verwendet.

Um die Wirkung der siRNA-Behandlung auf die Expression beider TRIM9-Isoformen zu überprüfen, wurde zunächst im Rahmen eines Kontrollexperiments in 1205Lu-WT-Zellen die Knockdown-Effektivität der eingesetzten siRNA überprüft. Dabei bewirkte der Einsatz von siRNA l1 und siRNA l2 gegen die lange TRIM9-Isoform eine annähernd hundertprozentige bzw. mehr als fünfundsiebzigprozentige Reduktion des TRIM9l-Expressionsniveaus (vgl. Abbildung 20-A und -B). Durch Einsatz der siRNA s1 gegen die kurze TRIM9-Isoform konnte eine Reduktion der TRIM9s-Expression um ca. 50% erreicht werden (vgl. Abbildung 20-A und -C). Der Einsatz der siRNA s2 gegen die kurze Isoform von TRIM9 bewirkte keine relevante Reduktion des TRIM9s-Expressionsniveaus (vgl. Abbildung 20-A und -C).

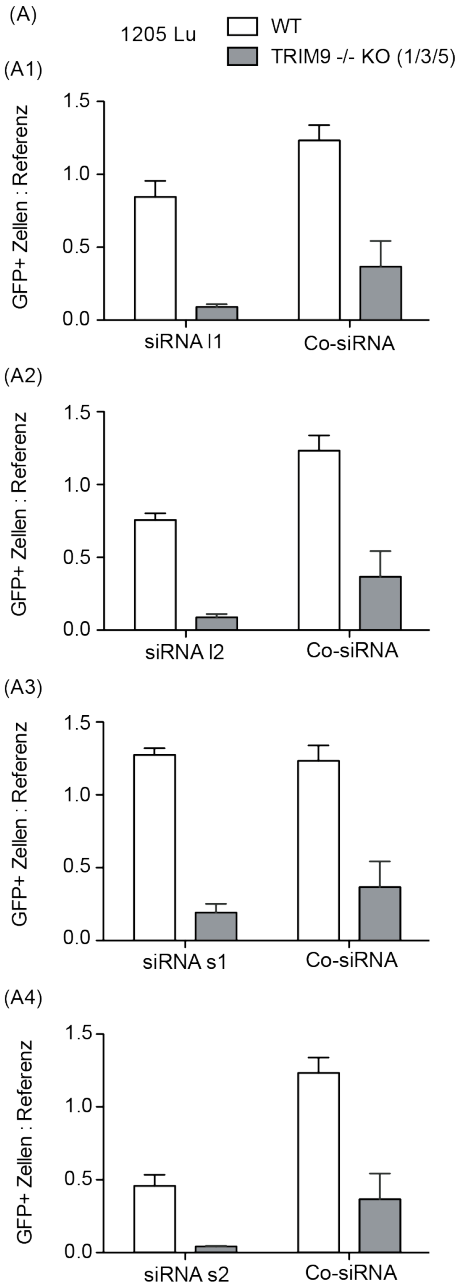
In einem nächsten Schritt wurden sowohl WT- als auch KO-Zellen mit den o.g. siRNA transfiziert. Im Rahmen dieses Experiments wäre kein Einfluss der applizierten siRNA auf die VSV-Virusreplikation in 1205Lu-KO-Zellen zu erwarten, da TRIM9 bereits deletiert sein sollte.

In 1205Lu-WT-Zellen bewirkte der Einsatz der siRNAs gegen die lange Isoform von TRIM9 (siRNA l1 & l2), anders als nach Qin et al. zu erwarten, eine signifikante Inhibition der Virusreplikation im Vergleich zur Applikation einer *non-silencing* Kontroll-RNA (Co-siRNA) (vgl. Abbildung 21-A1, -A2, -B1 und -B2). Der Einsatz von siRNA s1 gegen die kurze Isoform in 1205Lu-WT-Zellen bewirkte keinen Unterschied zur Kontroll-RNA (vgl. Abbildung 21-A3 und -B3), während die Verwendung der siRNA s2 zu einer signifikanten Inhibition der Virusreplikation führte (vgl. .Abbildung 21-A4 und -B4).

Bei Betrachtung der 1205Lu-WT- und TRIM9-KO-Zellen im Vergleich zeigte sich erwartungsgemäß (vgl. Abschnitt 3.5.1.2) unter jeder einzelnen siRNA-Behandlungsbedingung die Virusreplikation in KO-Zellen supprimiert (vgl. Abbildung 21-A und -B). In TRIM9-KO-Zellen zeigten sich in einem kleineren Maßstab ähnliche Effekte auf die Virusreplikation wie in 1205Lu-WT-Zellen (zur Übersicht vgl. Abbildung 22).

Um den Einfluss der zwei unabhängigen Variablen (TRIM9-Expressionsniveau und siRNA-Behandlung) auf die Zielgröße der Virusreplikation sowie auf ihre Interaktion hin statistisch zu überprüfen, wurde der 2-Way-ANOVA-Test durchgeführt. In Anbetracht der Ergebnisse des statistischen Tests (vgl. Abbildung 21-B) können folgende drei Aussagen getroffen werden:

- Das TRIM9-Expressionsniveau (WT vs. KO) beeinflusst signifikant die Virusreplikation.



(B)

Ergebnisse des 2-way-ANOVA-Tests

(B1)

Variationsquellen	P-Wert
TRIM9-Expressionsniveau (WT vs. KO)	0.0001 (***)
siRNA-Behandlung	0.0219 (*)
Interaktion	0.6504 (ns)

(B2)

Variationsquellen	P-Wert
TRIM9-Expressionsniveau (WT vs. KO)	<0.0001 (***)
siRNA-Behandlung	0.0075 (**)
Interaktion	0.3798 (ns)

(B3)

Variationsquellen	P-Wert
TRIM9-Expressionsniveau (WT vs. KO)	<0.0001 (***)
siRNA-Behandlung	0.5595 (ns)
Interaktion	0.3509 (ns)

(B4)

Variationsquellen	P-Wert
TRIM9-Expressionsniveau (WT vs. KO)	0.0004 (***)
siRNA-Behandlung	0.0010 (*)
Interaktion	0.0747 (ns)

Abbildung 21: Die Wirkungen der siRNA-Behandlung auf die VSVwt-Virusreplikation in 1205Lu-Wildtypzellen sind in TRIM9-defizienten Zellen ebenfalls zu beobachten und infolgedessen als ein von dem TRIM9-knockdown unabhängiger Effekt zu interpretieren. (A) Es wurden 60.000 1205Lu-Zellen pro Well im 24-Well-Format ausplattiert. Dabei wurden die Zellen von drei unterschiedlichen KO-Klonen (KO1/2/3) in einem Verhältnis von 1:1:1 zusammengemischt. Während des Ausplattierens wurden die Zellen mit 20 nM siRNA transfiziert, wobei die Co4-RNA als Transfektionskontrolle diente. 24 Stunden später wurden die Zellen mit VSVwt-eGFP (MOI=0,1) infiziert. 18 Stunden nach Infektion wurde der Prozentsatz infizierter Zellen durchflusszytometrisch auf Basis des emittierten GFP-Signals bestimmt. Aufgrund starker Schwankungen des GFP-Signals zwischen den einzelnen Versuchen wurde der Messbereich normiert, indem der RNAimax Messwert (vgl. Abbildung 22) der einzelnen Experimentdurchläufe als baseline definiert und durch den Wert 1 substituiert wurde. Die weiteren Messwerte werden in Relation zur baseline angegeben. **(B)** Die Ergebnisse wurden statistisch mittels des 2-way-ANOVA Tests analysiert, wobei als Einflussgrößen das TRIM9-Expressionsniveau und die siRNA-Behandlung galten. Dargestellt sind die Daten dreier unabhängiger Experimente (n=3) als Mittelwert +SEM.

- Die siRNA-Behandlung mit siRNA-l1, -l2 und -s2 beeinflusst signifikant die Virusreplikation.
- Die Interaktion zwischen TRIM9-Expressionsniveau und siRNA-Behandlung hat keinen signifikanten Einfluss auf die Virusreplikation. Somit hängt die Wirkung der siRNA-Behandlung auf die Virusreplikation nicht von der Ausprägung des TRIM9-Expressionsniveaus ab.

Dieser Zusammenhang ist mit der Hypothese einer unspezifischen Wirkung der TRIM9-siRNAs auf die Virusreplikation zu vereinbaren. Auf Basis des unspezifischen Effekts der siRNA-Behandlung und der fehlenden Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von Qin et al. in der 1205Lu-Zelllinie lassen sich Zweifel an den auf siRNA-Knockdown basierenden Daten der Publikation erheben (vgl. Abschnitt 4.2.3.1).

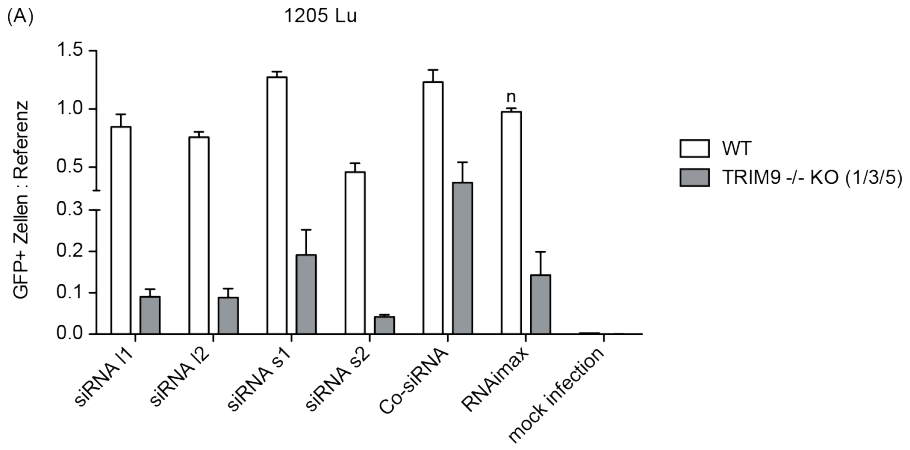


Abbildung 22: Die Wirkungen der siRNA-Behandlung auf die VSVwt-Virusreplikation in 1205Lu-Wildtypzellen sind in TRIM9-defizienten Zellen ebenfalls zu beobachten und infolgedessen als ein von dem TRIM9-knockdown unabhängiger Effekt zu interpretieren. Übersicht über die in Abbildung 21-(A) einzeln aufgeführten Versuchsbedingungen. Neben der Co4-RNA als Transfektionskontrolle diente die Behandlung mit RNAimax als weitere Negativkontrolle. Diesem Messwert (mit „n“markiert) wurde der Wert 1 zugewiesen und der Messbereich entsprechend normiert. Dargestellt sind die Daten dreier unabhängiger Experimente (n=3) als Mittelwert +SEM.

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit knüpft an Vorergebnisse von Johannes Rückel aus der Arbeitsgruppe zu den Funktionen von TRIM9 in der antiviralen Immunabwehr an (Rückel 2018). Dabei wird insbesondere nach Verbindungen zwischen den *in-vitro*-gemachten Beobachtungen zur Funktion von TRIM9 im Rahmen viraler Infektionen und dem Einfluss genetischer Polymorphismen auf das Outcome von Hepatitis-C-Virusinfektionen gesucht.

Die bei Beginn der experimentellen Arbeit vorliegenden Daten basierten größtenteils auf *in-vitro*-Experimenten mit humanen Melanom- und Lungenkarzinomzelllinien. Um die Relevanz der Daten im Hinblick auf einen möglichen Einfluss von TRIM9 auf den Verlauf einer Hepatitis-C-Infektion besser zu beurteilen, wurde sowohl in murinen als auch in humanen Geweben nach einer Expression von TRIM9 in der Leber gesucht. Dabei scheint in der Maus die Expression von TRIM9 im Wesentlichen auf das ZNS beschränkt zu sein, wohingegen beim Menschen eine Expression von TRIM9 auf mRNA-Ebene auch außerhalb des ZNS in primären Gewebelysaten der Leber sowie auf Proteinebene in humanen Hepatom- und Melanomzelllinien detektierbar war.

Innerhalb eines Hepatitis-C-Kollektivs wurden die Allelhäufigkeiten zweier SNP (PubMed-Referenznummern: rs1049371 und rs12879906) in der 3'UTR des TRIM9-Gens auf eine signifikant divergierende Verteilung bei chronisch Infizierten und spontan Ausgeheilten untersucht. Dabei stellten sich deutliche Unterschiede der Allelhäufigkeitsverteilung hinsichtlich des SNP "rs12879906" zwischen der Gruppe der spontan Ausgeheilten und der Gruppe der Patienten mit chronischem Verlauf heraus. Gleiches ließ sich jedoch für den SNP "rs1049371" nicht feststellen. Dennoch wurden beide SNP und die sich aus den vier Kombinationsmöglichkeiten ergebenden haplotypischen Varianten hinsichtlich eines möglichen Einflusses der 3'UTR auf das TRIM9 Expressionsniveau mit einem Luciferasereportersystem untersucht. Dabei führte, wie von Rückel 2018 vorbeschrieben, das niedrig prävalente A/T-Allel des SNP "rs12879906" zu einer gesteigerten Expression des 5' stromaufwärts gelegenen Reportergens. Die Analyse der Haplotypkombinationen zeigte, dass dies jedoch nur der Fall ist, solange an der SNP-"rs1049371"-Position das in der europäischen Population häufigere A/T-Allel vorliegt. Die übrigen drei Kombinationen führen zu einer auf dem gleichen, etwas niedrigeren Niveau liegenden Expression. Der SNP-Einfluss dieser SNP-Variationen in der 3'UTR von TRIM9 auf die Expression des Reportergens lässt sich mutmaßlich auf die Expression des TRIM9-Gens übertragen.

Um die Funktion von TRIM9 *in vitro* im Zuge einer Hepatitis-C-Virusinfektion zu untersuchen, wurden TRIM9-KO-Klone der Hepatomzelllinie Huh-7.5 mittels CRISPR-Cas9

generiert. Die Zelllinie wurde von einer Kooperationsgruppe[4] zur Durchführung von Infektionsassays mit HCV verwendet. Ein Ausschnitt der von unserer Kooperationsgruppe generierten Ergebnisse wird in Abschnitt 4.2.2. und Abbildung 21 vorgestellt.

Um die Ergebnisse von Shi et al. (Shi et al. 2014) und die Ergebnisse von *in-vitro* Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe (Rückel 2018) in einem anderen experimentellen System zu überprüfen, wurde der Einfluss des Expressionsverlustes von TRIM9 auf die Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Typ-I-Interferone nach Stimulation mit PRR-Liganden sowie nach viraler Infektion in verschiedenen murinen Zellsystemen untersucht. Es zeigten sich dabei keine signifikanten Unterschiede in der Induktion von IP-10 und IL-6 nach Stimulation mit RLR-, TLR- und Dectin-Liganden in Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen, in Splenozyten und embryonalen Fibroblasten aus TRIM9-WT- und TRIM9-defizienten Mäusen. Hinsichtlich der viralen Replikation von Negativ- und Positivstrang-RNA-Viren waren in diesen murinen Zelltypen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und TRIM9-KO zu messen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den humanen Melanomzellen der 1205Lu-Zelllinie und ansatzweise auch den Hepatozyten der Huh-7.5-Zelllinie eine ausgeprägte Suppression der Replikation von (-)ssRNA-Viren in TRIM9-defizienten Zellen. Dies war bei Infektion mit VSV in TRIM9-defizienten Zellen mit einer verminderten IP-10-Sekretion verbunden, während die Infektion mit dem Positivstrang-RNA-Virus *Semliki forest* in 1205-Lu-Melanozyten zu einer gesteigerten IP-10-Produktion führte.

Auf Grundlage des von Qin et al. vorgestellten Modells (vgl. Abbildung 24) der Inhibition der DNA- und RNA-Virusreplikation durch TRIM9s wurde mittels siRNA-Knockdown versucht, die Funktion der beiden TRIM9-Isoformen hinsichtlich der Virusreplikation getrennt voneinander zu betrachten und die Ergebnisse von Qin et al. zu replizieren (Qin et al. 2016). Durch das Kontrollexperiment, dieselben gegen TRIM9 gerichteten siRNAs auch in Zellen zu verwenden, in denen die Expression des TRIM9-Gens bereits mittels CRIPSR-Cas9 Geneditierung stabil deletiert worden war, stellte sich ein von TRIM9 unabhängiger unspezifischer Effekt der siRNA-Behandlung auf die Virusreplikation heraus. Ein deutlicher Unterschied in der (-)ssRNA-Virusreplikation war nach wie vor zwischen TRIM9-WT- und KO-Zellen zu messen, der alleinige Knockdown der kurzen Isoform von TRIM9 führte jedoch zu keiner gesteigerten Virusreplikation. Die Ergebnisse stellen somit das von Qin et al. vorgestellte Modell teilweise in Frage.

[4] Bei der Kooperationsgruppe handelt es sich um die Arbeitsgruppe von Prof. Protzer an der Technischen Universität München. Die Experimente wurden dort von Hanaa Gaber durchgeführt.

4.2. Diskussion der Ergebnisse mit Bezug auf die Literatur

4.2.1. Gibt es speziestypische Unterschiede im Expressionsmuster von TRIM9?

Seit mehr als fünfzehn Jahren wird TRIM9 in der Literatur als gehirnspezifische Ubiquitin-Ligase beschrieben. Die Expression wurde in Neuronen des zerebralen Kortexes von Menschen und Nagetieren nachgewiesen (Berti et al. 2002,Tanji et al. 2010). Im Rahmen weiterer Arbeiten konnte TRIM9 jedoch zusätzlich in humanen mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC), in Makrophagen sowie in humanem Lungen-, Milz- und Lebergewebe detektiert werden (Carthagena et al. 2009,Qin et al. 2016). Vorarbeiten demonstrierten die Expression zweier TRIM9-Isoformen (TRIM9l und TRIM9s) auf Proteinebene, welche in humanen sowie in murinen Geweben zu finden sind (Qin et al. 2016,Tanji et al. 2010).

Trotz der o.g. neuen Erkenntnisse bezüglich der Funktion und Expression von TRIM9 im Menschen ist nach wie vor wenig zum Expressionsmuster von TRIM9 außerhalb des ZNS in der Maus bekannt. Rajsbaum et al. wiesen zum ersten Mal im Jahr 2008 auf eine Expression von TRIM9 in Immunzellen außerhalb des ZNS hin (Rajsbaum et al. 2008). Ausgehend von der Hypothese, TRIM9 könnte in Geweben außerhalb des Gehirns, insbesondere in der Leber, exprimiert sein, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine systematische Expressionsanalyse muriner Organe durchgeführt. Dabei konnte auf mRNA-Ebene, wenn auch nicht auf Proteinebene, in einigen murinen Geweben außerhalb des ZNS TRIM9 detektiert werden, allerdings auf deutlich (bis zu 1000-fach) niedrigerem Niveau als in Neuronen. Dieses Ergebnis war vor dem Hintergrund des humanen Expressionsmusters von TRIM9 überraschend und wirft die Frage auf, wie sich Unterschiede im Expressionsmuster von TRIM9 zwischen Menschen und Nagetieren erklären lassen. Im murinen Gehirn reguliert TRIM9 morphologische Veränderungen von Neuronen im Rahmen der axonalen Wegfindung (Menon et al. 2015,Plooster et al. 2017,Winkle et al. 2014). Außerdem wurde TRIM9 in Mäusen eine anti-inflammatorische neuroprotektive Rolle nach ischämisch-bedingtem Gewebeschaden zugeschrieben (Zeng et al. 2019). Als paraloges Molekül von TRIM9 mit sehr ähnlichen Funktionen und einer Vielzahl gemeinsamer Interaktionspartner in murinen Neuronen wird TRIM67 beschrieben (Menon et al. 2021,Short und Cox 2006). Als mögliche Erklärung für den Unterschied im Expressionsmuster ist es denkbar, dass in Mäusen in Geweben außerhalb des Gehirns TRIM67 Funktionen übernimmt, welche in Menschen TRIM9-spezifisch sind.

Ebenfalls unerwartet zeigte sich eine Diskrepanz im TRIM9-Expressionsniveau in humanen Lebergewebeproben auf mRNA- und Proteinebene: Mittels qRT-PCR konnten deutliche Mengen an mRNA-Transkript in humanen Leberproben detektiert werden (etwa halb so viel wie in Gehirnproben). Die Detektion von TRIM9 in Leberlysaten mit-

tels Immunoblot gelang jedoch nicht. Neben methodischen (vgl. Abschnitt 4.2.4.1) können ebenso biologische Faktoren dieser Beobachtung zugrunde liegen. So ist denkbar, dass die TRIM9-Expression ähnlich wie die anderer in Immunsignalwegen involvierter TRIM-Moleküle posttranslational reguliert wird. Die strenge posttranslationale Regulation von Immunsignalwegen ist im Sinne einer Rückkehr zur Immunhomöostase nach Infektion zu verstehen und wird mechanistisch maßgeblich über Ubiqutinylierungen vollzogen (Heaton et al. 2016). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass der aus zwei E3-Ligasen bestehende “linear ubiquitin assembly complex” (LUBAC) mit TRIM25 interagieren und mittels Ubiqutinylierung seine proteasomale Degradation induzieren kann (Inn et al. 2011). In Anbetracht der Fähigkeit vieler TRIM-Proteine, als E3-Ligasen Ubiquitinmoleküle auf andere Proteine und sich selbst zu übertragen, erscheint es durchaus möglich, dass Translation zwar stattfindet, das synthetisierte TRIM9-Protein aber rasch wieder proteasomal degradiert wird.

Eine weitere Frage, die unbeantwortet bleibt, ist ob TRIM9 in Reaktion auf eine virale Infektion induziert wird. Carthagena et al. zeigten, dass die TRIM9-Expression in Lymphozyten des peripheren Blutes von Menschen in Reaktion auf Typ-II-Interferon induziert werden kann (Carthagena et al. 2009). Rajsbaum et al. konnten keine Hochregulation von TRIM9 in murinen Makrophagen, myeloiden und plasmazytoiden dendritischen Zellen nach Infektion mit dem Influenza-A-Virus bzw. nach Stimulation mit CpG feststellen (Rajsbaum et al. 2008). Interessanterweise konnten Versteeg et al. eine Hochregulation auf mRNA-Ebene drei Stunden nach einer Sendaivirusinfektion in A549-Zellen (Ursprung: Lunge; epitheliales Gewebe), jedoch nicht in THP-1-Zellen (Ursprung: Monozyten; myeloides Gewebe) feststellen (Versteeg et al. 2013). Die auf Basis von humanen Zelllinien generierten Daten unserer Arbeitsgruppe deuten auf eine schwache Suppression der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene nach Vorbehandlung mit dem dsRNA-Virusimitat p(I:C) bzw. mit Interferon-β (einem Typ-I-Interferon) hin (Rückel 2018). Auf Proteinebene schien die Expression von TRIM9 in humanen A549-Zellen und PBMC jedoch weder hoch- noch herunterreguliert zu sein (Qin et al. 2016). Zusammenfassend scheint also das TRIM9-Expressionsniveau zumindest in Zellen des angeborenen Immunsystems durch Interferoneinfluss bzw. Virusinfektion am ehesten unbeeinflusst oder sogar leicht supprimiert zu sein. Somit handelt es sich vermutlich bei TRIM9 nicht um einen klassischen, durch Interferon stimulierbaren viralen Restriktionsfaktor wie TRIM5 oder TRIM22 (Carthagena et al. 2009).

4.2.2. TRIM9 und Hepatitis C

4.2.2.1. SNP “rs12879906” als potenzieller Modulator des Expressionsniveaus von TRIM9

Auf Grundlage der vorbekannten Assoziation zwischen einem SNP in der 3’UTR von TRIM9 und einer veränderten Chronifizierungsrate von Hepatitis-C-Infektionen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Hypothese aufgestellt, die 3’UTR von TRIM9 übe einen regulatorischen Einfluss auf die Expression von TRIM9 aus. Dabei konnte gezeigt werden, dass die in der europäischen Population niedrig prävalente Variante des SNPs “rs12879906” zu einem erhöhten Expressionsniveau des 5’ gelegenen Reportergens führt. In diesem Zusammenhang stellen sich zwei grundlegende Fragen:

1. Über welchen Mechanismus reguliert die TRIM9 3’UTR das Expressionsniveau des von ihr aus 5’ stromaufwärts positionierten Gens?
2. Weshalb führt die mit einem vorteilhaften Hepatitis-C-Outcome assoziierte TRIM9 3’UTR Variante zu einer Hochregulation der Genexpression, wenn TRIM9 in vitro eine eher replikationsfördernde Rolle aufweist?

Einer der Hauptmechanismen, über den die 3’UTR zur Regulation der Genexpression beiträgt, ist die Interaktion der mRNA mit microRNAs (miRNA) (Mayr 2017). Diese kurzen RNA-Fragmente sind imstande, einen Abschnitt der in der mRNA enthaltenen 3’UTR aufgrund ihrer komplementären Sequenz im Sinne einer *antisense* RNA-RNA Interaktion zu binden. Die Bindung führt über Mechanismen, die kollektiv als RNA-Interferenz bekannt sind, zur Destabilisierung, zum Abbau oder zur Hemmung der Translation der mRNA (Bartel 2009). Eine bioinformatische Analyse der TRIM9 3’UTR hinsichtlich des SNPs “rs12879906” mithilfe der Software “MicroSNiPer” sagt die Bindung 10 unterschiedlicher miRNAs an die TRIM9 3’UTR bei Anwesenheit der niedrigprävalenten Basenpaarung vorher (Barenboim et al. 2010). Allerdings wurde keine der vorhergesagten miRNAs bisher mit TRIM9 oder dem Verlauf einer Hepatitis C in der Literatur assoziiert. Somit käme eine Regulation über miRNA als Mechanismus in Frage, doch die Rolle von miRNAs in der Regulation der TRIM9-Expression wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Weitere denkbare Regulationsmechanismen der Genexpression durch die 3’UTR wären zum Beispiel die RNA-Methylierung oder die Kontrolle der mRNA-Stabilität durch Interaktionen von RNA-bindenden Proteinen mit der 3’UTR (Bae und Miura 2020).

Um sich der Beantwortung der zweiten Frage anzunähern, kann man die aus der Literatur bekannten biologischen Einflussfaktoren auf die Spontanausheilung von Hepatitis C heranziehen. Eine in diesem Zusammenhang interessante Beobachtung ist, dass symptomatische Patienten im Rahmen einer akuten Hepatitis C eine deutlich höhere Wahrscheinlichkeit für eine Spontanausheilung der HCV-Infektion als asymptomatische Patienten aufweisen (Gerlach et al. 2003). Dabei liegt der symptomatischen Infektion

eine robustere, auf das Virus abzielende Immunantwort zugrunde (Westbrook und Dusheiko 2014). Man könnte also annehmen, dass TRIM9 in der akuten Phase der Infektion eine gesteigerte HCV-Replikation zulässt, welche zu einer potenteren Immunantwort und somit zu einer verbesserten Ausheilung der Infektion führt. In dieser Arbeit zeigte sich die IP-10-Antwort auf eine VSV-Infektion (einem (-)ssRNA-Virus) in Anwesenheit von TRIM9 tendenziell erhöht. Dagegen stellte sich die IP-10-Antwort im Zuge einer SFV-Infektion (einem (+)ssRNA-Virus) tendenziell erniedrigt dar. Beides konnte auf Basis humaner Zelllinien in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe ebenfalls demonstriert werden (vgl. Abschnitt 1.4.1) (Rückel 2018). Die virusinduzierte angeborene Immunantwort auf eine HCV-Infektion in TRIM9-KO-Zellen wurde von unserer Kooperationsgruppe *in vitro* untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.2.2 und Abbildung 23). Dabei schien die Immunantwort wie in vorherigen Experimenten mit (+)ssRNA-Viren in Anwesenheit von TRIM9 supprimiert zu sein. Die simultane Expression beider Isoformen scheint also im Falle von (+)ssRNA-Viren *in vitro* die Virusreplikation zu fördern und die virusinduzierte Interferonantwort zu supprimieren. Was geschieht aber, wenn man die Einflüsse der einzelnen Isoformen auf die angeborene Immunantwort und die Virusreplikation getrennt voneinander analysiert?

Qin et al. untersuchten die VSV- und HSV-provozierte Induktion von Zytokinen in Abhängigkeit von TRIM9s, der kurzen Isoform von TRIM9, und in Abhängigkeit des Transkriptionsfaktors NF-κB bzw. IRF-3, welcher für die Induktion der jeweiligen Zytokine hauptsächlich verantwortlich ist (Qin et al. 2016). Dabei zeigte sich die Expression der in erster Linie von IRF-3-getriebenen Zytokine IFNα- und -β sowie ISG-54 in Anwesenheit von TRIM9s erhöht, während die Induktion der größtenteils NF-κB getriebenen Zytokine von TRIM9s supprimiert wurde.

Es stellt sich heraus, dass die Balance zwischen Verstärkung und Hemmung der angeborenen Immunantwort durch das Expressionsniveau von TRIM9 schon *in vitro* abhängig von der Viruspolarität, der Expression der einzelnen Isoformen und der spezifischen Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren ist. Wenn man versucht, die *in-vitro*-Ergebnisse auf die Immunantwort *in vivo* zu übertragen, müssen zusätzliche Faktoren berücksichtigt werden, die weitere Fragen aufwerfen: Welchen Beitrag leisten zum Beispiel die T- und B-Zellen im Zuge einer akuten Hepatitis C zur Immunantwort, und welche Rolle könnte an dieser Stelle TRIM9 spielen? Ist eine robuste Immunantwort gegenüber HCV dauerhaft überhaupt von Vorteil für den Wirt? Unter diesen Gesichtspunkten wird deutlich, dass die *in vitro* erarbeiteten pro- und antiviralen Aspekte von TRIM9 noch keine ausreichende Erklärung für den Mechanismus bieten, über den das erhöhte Expressionsniveau der vorteilhaften Variante des SNP den Verlauf einer Hepatitis-C-Infektion beeinflusst. Weitere Untersuchungen werden nötig sein, um dieser Frage auf den Grund zu gehen.

4.2.2.2. Der Phänotyp von TRIM9-KO-Zellen im Zuge einer Hepatitis C Infektion

TRIM9-defiziente durch HCV infizierbare Huh-7.5-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt mit der Absicht, die Funktion von TRIM9 im Zuge einer HCV-Infektion näher zu charakterisieren. Aus Sicherheitsgründen wurden die HCV-Infektionsassays an der TUM in dem Labor unserer Kooperationsgruppe durchgeführt. Zur Infektion wurde das JC-1 HCV-Virus (Genotyp 2A) verwendet. Nach der Infektion der TRIM9-exprimierenden bzw. -defizienten Huh-7.5-Zellen wurden einerseits die HCV-Replikation und andererseits die virusinduzierte Immunantwort gemessen (vgl. Abbildung 23-A, -B und -C).

Die HCV-Replikation stellte sich dabei in TRIM9-KO-Zellen im Rahmen verschiedener methodischer Ansätze supprimiert dar (vgl. Abbildung 23-A und -B). Die HCV-induzierte angeborene TNF-α-Antwort war dagegen in Abwesenheit von TRIM9 verstärkt (vgl. Abbildung 23-C). TNF-α ist als klassisches proinflammatorisches Zytokin stark von der

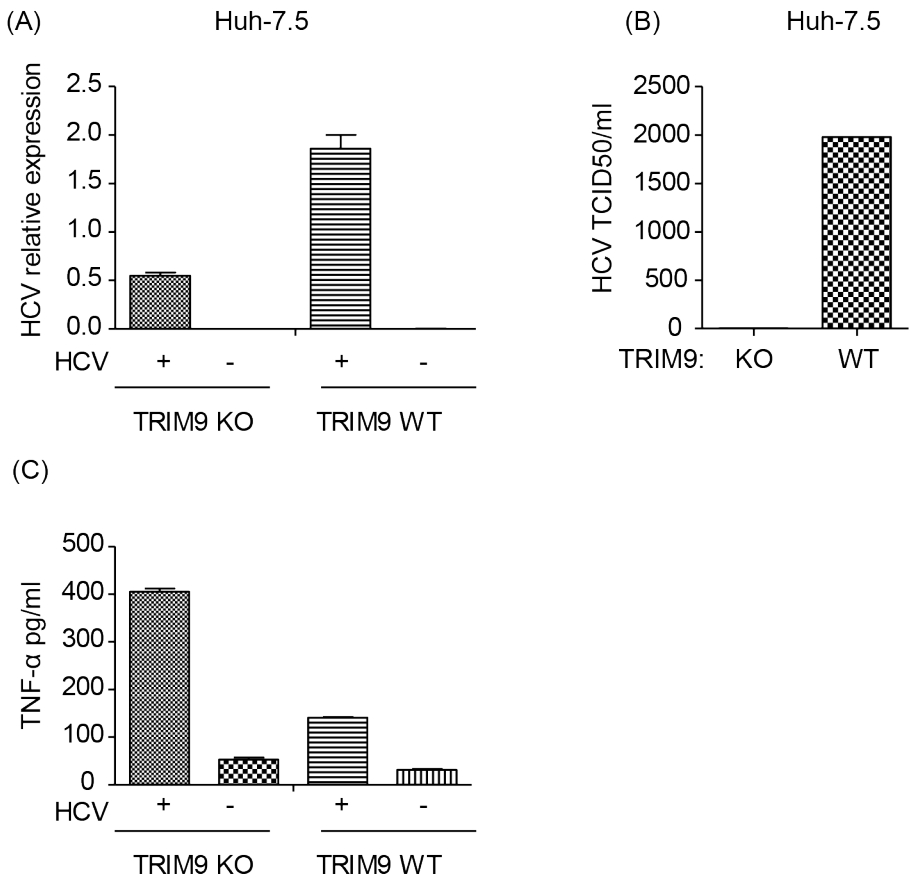


Abbildung 23: Vorläufige Ergebnisse von HCV-Infektionsexperimenten in Huh-7.5-WT- und TRIM9-KO-Zellen. Huh-7.5-Zellen mit und ohne TRIM9 wurden bei einer MoI = 0.1 mit HCV-Genotyp 2a (JC-1) infiziert. 48 Stunden später folgte: **(A)** Die RNA Isolation zur Quantifizierung der genomischen Virus-RNA mittels qRT-PCR und **(B)** die Einsammlung des Zellkulturüberstandes zur Messung des TCID50-Wertes mittels Endpunktverdünnung. **(C)** 48h p.i. wurde im Zellkulturüberstand mittels ELISA auch die Konzentration von TNF-α bestimmt. *Die Experimente wurden von Hanaa Gaber in der Arbeitsgruppe von Prof. Protzer an der Technischen Universität München durchgeführt.*

NF-κB-Aktivierung abhängig. Die Inhibition seiner Ausschüttung in Zellen, in denen TRIM9 exprimiert wird, stimmt mit der vorbeschriebenen Rolle von TRIM9 als Negativregulator von NF-κB überein (Shi et al. 2014). Die Inhibition der Virusreplikation in TRIM9-defizienten Zellen ist vereinbar mit den Ergebnissen dieser Arbeit und mit Vorarbeiten der Arbeitsgruppe auf Basis von (+) und (-)ssRNA-Virusinfektionen in TRIM9-kompetenten und -defizienten Varianten der 1205Lu-Melanomzelllinie (vgl. Abschnitte 3.5 und 4.1). Dabei blieb bisher ungeklärt, wie sich die gezielte Deletion einzelner Isoformen auf die HCV-Infektion, auf die Infektion mit anderen RNA-Viren und insbesondere auf die angeborene Immunantwort auswirken würde. Ein Versuch, diese Fragen zu beantworten, wird im nächsten Abschnitt unternommen.

4.2.3. TRIM9 Isoformen und molekularer Mechanismus der antiviralen Funktion

4.2.3.1. Infragestellung der Ergebnisse der siRNA-vermittelten Ausschaltung der Expression einzelner TRIM9-Isoformen von Qin et al., Cell Research 2016:

Als Ausgangspunkt der in Abschnitt 3.6 vorgestellten Versuchsergebnisse diente das von Qin et al. neu beschriebene Erklärungsmodell (vgl. Abbildung 24) zur antiviralen Funktion der kurzen TRIM9-Isoform (TRIM9s). Demzufolge greift TRIM9s als antivirales Protein gezielt in die Regulation des Gleichgewichts zwischen NF-κB-getriebener Produktion proinflammatorischer Zytokine und hauptsächlich IRF-3-getriebener Produktion von Typ-I-IFN ein. Die Aufstellung des neuen Modells stützt sich teilweise auf Daten, die mittels siRNA-Knockdown der einzelnen TRIM9-Isoformen in A549-WT-Zellen erarbeitet wurden. Exogen zugeführte siRNA besitzt in Abhängigkeit von der RNA-Länge, der Nukleotidsequenz und der Modifikationen des RNA-Grundgerüsts das Potenzial zur Aktivierung des angeborenen Immunsystems (Sioud 2010,Whitehead et al. 2011). So ist denkbar, dass die Einführung von siRNA immunstimulatorisch auf die Zelle wirken kann und dabei die zu messende Virusreplikation von einer in Reaktion auf die siRNA ausgelösten Immunantwort beeinflusst wird, wodurch die Messung verfälscht werden kann. Auf Grundlage dieser Vorstellung wurden die Daten von Qin et al. mit den in Abschnitt 3.6 vorgestellten Versuchen in Frage gestellt. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen konnte demonstriert werden, dass die siRNA-Behandlung in 1205Lu-WT- und TRIM-KO-Zellen eine unspezifische Wirkung auf die Virusreplikation ausübt, die unabhängig von dem Knock-down der kurzen bzw. langen Isoform von TRIM9 ist. Dennoch kann die Aussage aufgrund von methodischen Limitationen nur als eingeschränkt gültig betrachtet werden (vgl. Abschnitt 4.2.4.2). Schließlich ist es mit den vorliegenden Daten nicht möglich, das gesamte Erklärungsmodell (vgl. Abbildung 22) in Frage zu stellen, da es nicht ausschließlich auf den Ergebnissen von siRNA-Versuchen beruht, sondern durch Experimente mit isoformspezifischen KO-Zel-

len und Zelllinien mit stabil rekonstituierten induzierbaren TRIM9-Isoformen ergänzt wird. Im nächsten Abschnitt wird jenes Erklärungsmodell mit Bezug auf die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe kritisch diskutiert.

4.2.3.2. Diskussion des von Qin et al., Cell Research 2016[5] vorgestellten Erklärungsmodells vor dem Hintergrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit

Yunfei Qin und Kollegen konzentrieren sich bei ihren Untersuchungen auf die von den zytoplasmatischen Hauptsensoren für virale RNA bzw. DNA ausgehenden Signalwege: Den RLR- und den cGAS-STING-Signalweg (vgl. Einleitung, Abschnitt 1.2.3). In beiden Signalkaskaden nimmt die Kinase TBK-1 eine zentrale Stellung ein, indem sie die Aktivierung des für die Induktion antiviraler Typ-I-Interferone entscheidenden Transkriptionsfaktors IRF-3 vermittelt (Fitzgerald et al. 2003). Eine essenzielle Rolle in der Aktivierung des für die allgemeine Entzündungsreaktion bedeutenden Transkriptionsfaktors NF-κB – sowohl über den kanonischen als auch über den nicht-kanonischen Signalweg – spielt der E3-Ubiquitinligase-Komplex SCF-(*SKP1-CUL1-F-box protein*)-β-TrCP (Shi et al. 2014). Dem aktuellen Erklärungsmodell zufolge führt TRIM9s zur einer Akzentuierung der Typ-I-IFN-Komponente der virusinduzierten Immunantwort, indem es die Ubiquitinylierung von TBK-1 mithilfe von GSK-3β unterstützt und gleichzeitig, wie von Shi et al. beschrieben, die NF-κB-Aktivierung über die Interaktion mit β-TrCP hemmt (vgl. Einleitung 1.3.2.2) (Shi et al. 2014). In der Summe wird somit der kurzen Isoform von TRIM9 eine antivirale, replikationshemmende Funktion zugesprochen, die mit einer verstärkten IRF-3-abhängigen und abgeschwächten NF-κB-abhängigen Zytokinantwort einhergeht. Die Bedeutung von TRIM9l rückt den Autoren zufolge eher in den Hintergrund, da TRIM9l ausschließlich bei sehr hoher Überexpression die Virusreplikation inhibieren konnte und außerdem die entscheidende Fähigkeit zur Rekrutierung von GSK-3β nicht besaß (Qin et al. 2016).

Interessanterweise weisen unsere Ergebnisse in der Summe auf eine provirale, replikationsfördernde Rolle von TRIM9 unter der Voraussetzung, dass beide Isoformen in der Zelle exprimiert werden (vgl. Abschnitte 3.5, 4.1 und 4.2.2.2). Dabei wurde sowohl die Induktion der IRF-3- und Typ-I-IFN-abhängigen Zytokine (z.B. IP-10) als auch der überwiegend NF-κB-abhängigen Zytokine (z.B. TNF-α) durch TRIM9 abgeschwächt. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und die vorläufigen Ergebnisse unserer Kooperationsgruppe legen nahe, dass die Funktion von TRIM9l möglicherweise doch von Bedeutung ist und in einem Erklärungsmodell nicht außer Acht gelassen werden darf.

Der entscheidende strukturelle Unterschied zwischen TRIM9l und TRIM9s ist die der kurzen Isoform fehlende C-terminale PRY-SRPY-Domäne (vgl. Abbildung 4), welche

[5] Die Arbeit von Qin, Y. et al. wurde im Februar 2016 veröffentlicht. Die dieser Dissertation zugrunde liegende experimentelle Arbeit wurde zwischen Mai 2015 und Juli 2016 durchgeführt. Mit Ausnahme der Ergebnisse des Abschnitts 3.6 blieb der übrige Teil dieser Arbeit von der Publikation unbeeinflusst.

bei anderen TRIM-Proteinen für die Interaktion mit Viren bzw. für die Beteiligung an angeborenen Immunsignalwegen unabdingbar ist. So ist zum Beispiel die PRY-SRPY-Domäne von TRIM5α für die Interaktion mit dem HIV-1 Kapsid und für die davon abhängige effektive Restriktion von HIV-1 verantwortlich (Battivelli et al. 2011). In einer rezenteren Publikation wurde außerdem die direkte Interaktion zwischen der SPRY-Domäne von TRIM14 und dem nicht strukturellen HCV-Protein-5A (NS5A) beschrieben, welche die TRIM14-vermittelte Degradation von NS5A zur Folge hatte (Wang et al. 2016). Für TRIM25 konnte gezeigt werden, dass seine RNA-bindende Funktion von der PRY-SRPY-Domäne abhängt; dabei vermuten die Autoren eine ähnliche Funktion auch in anderen, diese Domäne aufweisenden TRIM-Proteinen (Choudhury et al. 2017). Vor diesem Hintergrund ist es denkbar, dass sich TRIM9l dank seiner PRY-SRPY-Domäne zusätzlich an anderen Signalwegen der angeborenen Immunität beteiligt bzw. sogar durch direkte Interaktion mit viralen Proteinen auf die virale Replikation

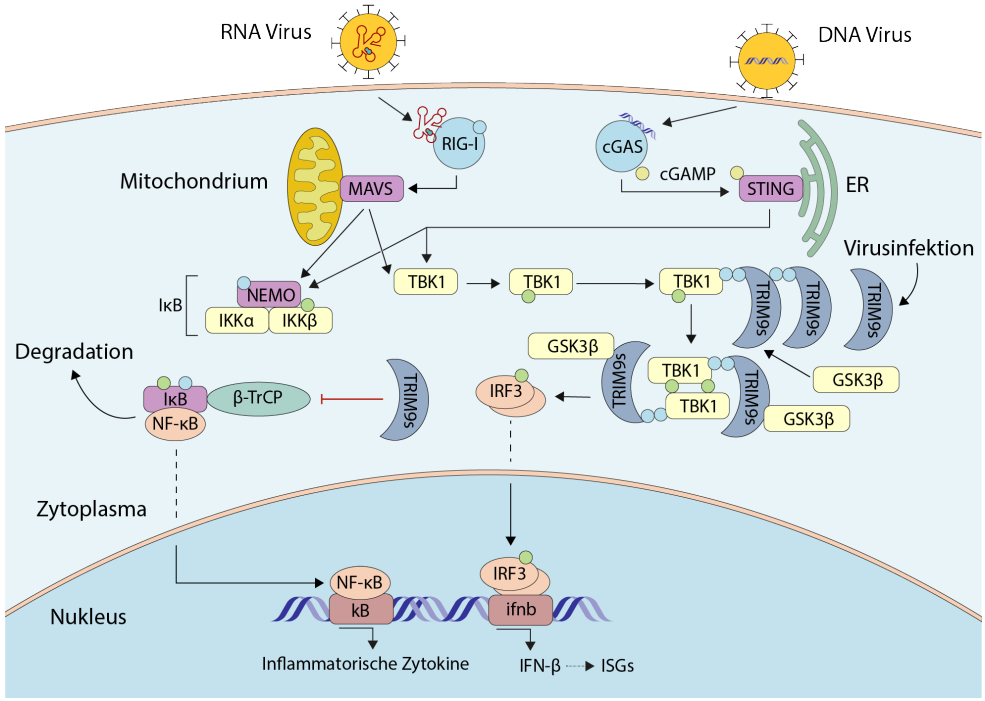


Abbildung 24: Zusammenfassung der bisherigen Erkenntnisse zur Beteiligung von TRIM9s an der Regulation der NF-κB- und IRF-3-Aktivierung im Zuge einer RNA- bzw. DNA-Virusinfektion. Die Infektion mit RNA- und DNA-Viren führt einerseits über die Aktivierung des Adapterproteins TBK1 zur IRF-3-Phosphorylierung und zur Induktion von Typ-I-IFN und andererseits über die Aktivierung des IKK-Komplexes (IκB) zur Nukleustranslokation von NF-κB und somit zur Induktion inflammatorischer Zytokine. Qin et al. zufolge entstehen einerseits im Zuge einer Virusinfektion K63-autoubiquitinylierte TRIM9s-Oligomere, welche als Plattformen die Interaktion von TBK1 mit GSK-3β vermitteln, und somit die Oligomerisation und Autophosphorylierung von TBK1 fördern. Andererseits verhindert TRIM9s Shi et al. und Qin et al. zufolge die Degradation von IκB, indem über die Interaktion mit β-TrCP dessen Abbau inhibiert wird. Dem Erklärungsmodell zufolge führt TRIM9s somit zur einer Akzentuierung der Typ-I-IFN-Antwort und unterbindet gleichzeitig die NF-κB-getriebene Bildung inflammatorischer Zytokine. Abbildung anlehnend an Qin et al. 2016 nachgezeichnet.

der von uns untersuchten Positivstrang-RNA-Viren wirkt, indem es in den Lebenszyklus des Virus' eingreift. Somit könnte die PRY-SRPY-Domäne der entscheidende Faktor sein, der den Unterschied zwischen unseren auf eine eher provirale Rolle von TRIM9 hinweisenden Beobachtungen und den eine eher antivirale Rolle nahelegenden Ergebnissen von Qin et al. erklärt.

4.2.4. Limitationen der Methodik

4.2.4.1. TRIM9 Expressionsanalyse humaner Gewebeproben

In Abschnitt 3.1 werden die Ergebnisse der TRIM9-Expressionsanalyse in verschiedenen humanen und murinen Gewebeproben präsentiert. Was die humanen Leberproben anbelangt, ist ein Widerspruch zu beobachten: Ein verhältnismäßig hohes TRIM9-Expressionsniveau kann auf mRNA-Ebene gemessen werden, während die Detektion des Proteins in humanen Leberlysaten nicht gelingt. Biologische Faktoren, die potenziell zu diesem Unterschied beitragen, werden in Abschnitt 4.2.1 diskutiert.

Zu dieser Diskrepanz können aber auch methodische Unterschiede bedingt durch die Beschaffenheit der Proben und die Sensitivität der einzelnen Methoden beitragen. Proteinlysate humaner Gewebeproben enthalten, im Gegensatz zu Proteinlysaten von Zelllinien, einen erheblichen Anteil an Proteinen der Extrazellulärmatrix (EZM). Dementsprechend ist ein deutlich reduzierter Anteil an TRIM9 in einem von EZM-kontaminierten Gewebelysat im Vergleich zu dem homogenen Lysat einer Zelllinie zu erwarten. Im Falle des humanen Leberlysats liegt die Konzentration von TRIM9 vermutlich unter der Nachweisgrenze des Immunoblots und kann somit durch diese Methode nicht detektiert werden. Die RNA-Lysate enthalten im Gegensatz zu den Proteinlysaten aufgereinigte nukleäre und zytoplasmatische RNA. Demnach ist von vergleichbaren Anteilen an TRIM9-mRNA zwischen Gewebe- und Zelllinien-Lysaten auszugehen. Die qRT-PCR gilt außerdem als besonders sensitive Methode und kann geringste Mengen an mRNA-Transkripten aufspüren.

In Anbetracht der o.g. Überlegungen zur Methodik und der von Qin et al. bereits nachgewiesenen Expression von TRIM9 in humanem Lebergewebe gehen wir von einer potentiell funktionell relevanter Menge von TRIM9-Protein in menschlichem Lebergewebe aus (Qin et al. 2016). Die Expression von TRIM9 in humaner Leber wird in nachfolgenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zu TRIM9 weiter untersucht.[6]

[6] Die Fragestellung ist Teil der Promotion von Hanna Nowotny.

4.2.4.2. siRNA-Knockdown und durchflusszytometrische Messung der Virusreplikation

Eine weitere methodische Limitation dieser Arbeit betrifft die in Abschnitt 3.6 vorgestellten Versuchsergebnisse. Im Rahmen dieser Experimente wurde versucht, die Expression einzelner TRIM9-Isoformen mittels siRNA-Knockdown auszuschalten. Unter den verwendeten experimentellen Bedingungen gelang eine erfolgreiche Ausschaltung der Expression von TRIM9l (vgl. Abbildung 20-B). Allerdings kam es nur zu einem inkompletten Knockdown der TRIM9s-Isoform auf Proteinebene (vgl. Abbildung 20-C). Das Expressionsniveau auf mRNA-Ebene wurde nicht gemessen. Außerdem gab es eine nicht unerhebliche Varianz zwischen den einzelnen Wiederholungen des Versuchs. Aus diesem Grund wurde der Messbereich in Abhängigkeit einer Kontrollbedingung, bei der keine Transfektion von RNA stattfand, normiert.

4.3. Beurteilung der klinischen Relevanz

Mit der Diagnose einer Hepatitis C waren noch vor etwa zehn Jahren niedrige Therapieerfolgsraten sowie ausgeprägte, für Patienten belastende Nebenwirkungen der Therapie assoziiert. Seit Einführung der ersten “direkten antiviralen Agenzien” (DAAs) im Jahr 2011 hat sich der Therapiestandard für chronische Hepatitis C grundlegend verändert, sodass heutzutage dank DAA Heilungsraten von >90% nicht unüblich sind. Dennoch werden die neuen Behandlungsmöglichkeiten von hohen Kosten, eingeschränkter Verfügbarkeit in vielen Ländern und potenzieller Resistenzbildung überschattet (Gauthiez et al. 2017). Aus diesen Gründen ist nach wie vor die Identifikation von neuartigen pharmakologischen Zielstrukturen und Biomarkern von hoher Bedeutung. In dieser Arbeit wird Evidenz zur Beteiligung von TRIM9 an dem Verlauf von Hepatitis-C-Infektionen sowohl auf genetischer als auch auf immunologischer Ebene präsentiert.

Im Falle von Hepatitis C wurde der Einfluss genetischer Polymorphismen auf den natürlichen Verlauf der Infektion besonders gründlich untersucht (vgl. Einleitung 1.1.3.1). Zusätzlich zu den vorbeschriebenen SNPs in immunologisch relevanten Genen wie IL-28B (Ge et al. 2009,Thomas et al. 2009), MDA5 (Hoffmann et al. 2015) oder OASL (Su et al. 2008) beleuchtet diese Arbeit einen weiteren SNP im Gen von TRIM9, der den Verlauf einer Hepatitis C Infektion beeinflussen kann. Vor dem Hintergrund eines künftig zunehmenden Einzugs von Sequenzierungsmethoden in den klinischen Alltag ist die Verwendung genetischer Polymorphismen als Biomarker zur Prognosebestimmung, Einschätzung des Therapieansprechens und ggf. zur Risikostratifizierung von Patienten bei eingeschränkter Verfügbarkeit von DAAs durchaus denkbar.

Die hohe Wirksamkeit und das nebenwirkungsarme Profil der DAAs sind dem gezielten Eingriff dieser Pharmaka in den Lebenszyklus von HCV geschuldet. In dieser Arbeit wird eine zuvor nicht beschriebene Beteiligung von TRIM9 an Mechanismen der antiviralen Immunität gegen HCV vorgestellt. Außerdem wurden Unterschiede im Expressionsmuster und der immunologischen Funktion von TRIM9 zwischen Maus und Menschen aufgezeigt. Diese Ergebnisse können als Orientierung für künftige wissenschaftliche Untersuchungen dienen und damit die Entwicklung neuartiger Therapien vorbereiten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Einführung direkter antiviraler Therapeutika haben die Therapie der chronischen Hepatitis C in den letzten Jahren grundlegend verändert und ermöglichen mit Interferon-freien Therapieregimen Heilungsraten von >90%. Aufgrund von hohen Kosten, eingeschränkter Verfügbarkeit in vielen Ländern und potenzieller Resistenzbildung ist die Identifikation von neuartigen pharmakologischen Zielstrukturen und Biomarkern jedoch weiterhin von hoher Bedeutung. Im Rahmen einer bisher unpublizierten GWAS-Studie eines Kollaborationspartners konnten zwei SNPs in der 3' untranslatierten Region (UTR) des *tripartite motif-containing* Proteins 9 (TRIM9) identifiziert werden, die mit der Wahrscheinlichkeit, eine Hepatitis-C-Infektion spontan auszuheilen, assoziieren. Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten in *loss-of-function*-Experimenten zeigen, dass das bisher vor allem im Kontext der Funktion von Neuronen beschriebene TRIM9 in nicht-neuronalen humanen Zelllinien die virale Replikation von Modellviren und die Aktivierung der zellintrinsischen antiviralen Signalwege modifiziert.

Die vorliegende Arbeit führte diese Vorarbeiten fort und untersuchte die Expression und Funktion von TRIM9 sowohl in Geweben und Zellen aus TRIM9-*Knockout*-Mäusen als auch vergleichend in humanen Geweben und Varianten humaner Zelllinien mit und ohne Expression von TRIM9. Dabei zeigten sich deutliche Speziesunterschiede, wobei in der Maus die Expression von TRIM9 im Wesentlichen auf das ZNS beschränkt zu sein scheint mit nur geringer Expression in anderen Organen. Beim Menschen hingegen war eine Expression von TRIM9 auf mRNA-Ebene auch außerhalb des ZNS in primären Gewebelysaten der Leber sowie auf Proteinebene in humanen Hepatom- und Melanomzelllinien detektierbar. Funktionell dazu passend konnte im Rahmen von *ex-vivo*-Experimenten mit primären Knochenmarks- und Milzzellen der Maus kein wesentlicher Einfluss von TRIM9 auf den Verlauf viraler Infektionen bzw. auf die Immunantwort nach Stimulation von Signalwegen des angeborenen Immunsystems in Mauszellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten die im Rahmen dieser Arbeit mittels CRISPR-Cas9 Geneditierung erstellten TRIM9-defizienten Varianten der humanen Hepatomzelllinie Huh-7.5 in mit einer Kooperationsgruppe durchgeführten Experimenten eine deutlich gehemmte Replikation von HCV bei gleichzeitig erhöhter Induktion des inflammatorischen Zytokins TNF-α. Ein ähnlicher Phänotyp fand sich für andere Positivstrang-RNA-Viren in TRIM9-defizienten Varianten der Melanomzelllinie 1205Lu. Untersuchungen zu Funktionen der langen und kurzen Isoform von TRIM9 mittels Isoform-spezifischer siRNAs konnten bisher publizierte Ergebnisse dazu als vermutliche Fehlinterpretationen demaskieren und zeigen auf, dass es für diese Untersuchungen anderer experimenteller Ansätze bedarf, die nicht auf siRNAs beruhen.

Eine funktionelle Analyse der beiden das Projekt startenden SNPs in der 3' UTR von TRIM9 mit Hilfe eines Luciferase-Reporterassays zeigte, dass das niedrig prävalente A/T-Allel des SNPs "rs12879906" zu einer gesteigerten Expression des 5' stromauf-

wärts gelegenen Reportergens führt, wenn an der zweiten SNP Position “rs1049371”, gleichzeitig das in der europäischen Population häufigere A/T Allel vorliegt. Die übrigen drei anderen möglichen Kombinationen der beiden SNPs führten zu einer zur gleichen, niedriger liegenden Expression. Dies Ergebnisse lassen einen direkten Einfluss dieser SNPs auf die Höhe der Expression von TRIM9 vermuten.

Weiterführende Untersuchungen sind nötig um die Rolle von TRIM9 und seiner Isoformen innerhalb der angeborenen antiviralen Immunität mechanistisch im Detail zu verstehen. Weitere Erkenntnisse zu TRIM9 und seiner immunologischen Funktion werden aber möglicherweise im Hinblick auf neuartige Therapieansätze gegen virale Infektionen wie Hepatitis C von Nutzen sein.

6. Literaturverzeichnis

Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Rohl I, Hopfner KP, Ludwig J, Hornung V. cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature* 2013; 498:380-4.

Azad AK, Sadee W, Schlesinger LS. Innate immune gene polymorphisms in tuberculosis. *Infect Immun* 2012; 80:3343-59.

Bae B, Miura P. Emerging Roles for 3' UTRs in Neurons. *Int J Mol Sci* 2020; 21.

Baize S, Pannetier D, Oestereich L et al. Emergence of Zaire Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med* 2014; 371:1418-25.

Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970; 226:1209-11.

Baltimore D. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol Rev* 1971; 35:235-41.

Barenboim M, Zoltick BJ, Guo Y, Weinberger DR. MicroSNiPer: a web tool for prediction of SNP effects on putative microRNA targets. *Hum Mutat* 2010; 31:1223-32.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136:215-33.

Battivelli E, Migraine J, Lecossier D, Matsuoka S, Perez-Bercoff D, Saragosti S, Clavel F, Hance AJ. Modulation of TRIM5alpha activity in human cells by alternatively spliced TRIM5 isoforms. *J Virol* 2011; 85:7828-35.

Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. Selection-driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol* 2003; 20:1650-8.

Berti C, Messali S, Ballabio A, Reymond A, Meroni G. TRIM9 is specifically expressed in the embryonic and adult nervous system. *Mech Dev* 2002; 113:159-62.

Bieniasz PD. Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack. *Nat Immunol* 2004; 5:1109-15.

Blight KJ, McKeating JA, Rice CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002; 76:13001-14.

Blight KJ, Norgard EA. HCV Replicon Systems. In: Tan SL, ed. Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology. Norfolk (UK)2006.

Bolen CR, Ding S, Robek MD, Kleinstein SH. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression. *Hepatology* 2014; 59:1262-72.

Bruns AM, Horvath CM. Antiviral RNA recognition and assembly by RLR family innate immune sensors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2014; 25:507-12.

Bruns AM, Horvath CM. LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling. *Cytokine* 2015; 74:198-206.

Burdette DL, Vance RE. STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol. *Nat Immunol* 2013; 14:19-26.

Carrasco-Hernandez R, Jacome R, Lopez Vidal Y, Ponce de Leon S. Are RNA Viruses Candidate Agents for the Next Global Pandemic? A Review. *ILAR J* 2017; 58:343-58.

Carroll L. Through the looking glass: And what Alice found there: Rand, McNally; 1917.

Carthagena L, Bergamaschi A, Luna JM, David A, Uchil PD, Margottin-Goguet F, Mothes W, Hazan U, Transy C, Pancino G, Nisole S. Human TRIM gene expression in response to interferons. *PLoS One* 2009; 4:e4894.

Casanova JL. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112:E7118-27.

Casanova JL, Abel L. The genetic theory of infectious diseases: a brief history and selected illustrations. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2013; 14:215-43.

Chan YK, Gack MU. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14:360-73.

Chen M, Meng Q, Qin Y, Liang P, Tan P, He L, Zhou Y, Chen Y, Huang J, Wang RF, Cui J. TRIM14 Inhibits cGAS Degradation Mediated by Selective Autophagy Receptor p62 to Promote Innate Immune Responses. *Mol Cell* 2016; 64:105-19.

Chiang C, Gack MU. Post-translational Control of Intracellular Pathogen Sensing Pathways. *Trends Immunol* 2017; 38:39-52.

Choudhury NR, Heikel G, Trubitsyna M, Kubik P, Nowak JS, Webb S, Granneman S, Spanos C, Rappsilber J, Castello A, Michlewski G. RNA-binding activity of TRIM25 is mediated by its PRY/SPRY domain and is required for ubiquitination. *BMC Biol* 2017; 15:105.

Clark PJ, Thompson AJ. Host genomics and HCV treatment response. *J Gastroenterol Hepatol* 2012; 27:212-22.

Colonna M. TLR pathways and IFN-regulatory factors: to each its own. *Eur J Immunol* 2007; 37:306-9.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339:819-23.

Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity. *Nat Rev Genet* 2016; 17:422-33.

Fitzgerald KA, McWhirter SM, Faia KL, Rowe DC, Latz E, Golenbock DT, Coyle AJ, Liao SM, Maniatis T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:491-6.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 2007; 446:916-20.

Garten RJ, Davis CT, Russell CA et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 2009; 325:197-201.

Gauthiez E, Habfast-Robertson I, Rueger S, Kutalik Z, Aubert V, Berg T, Cerny A, Gorgievski M, George J, Heim MH, Malinverni R, Moradpour D, Mullhaupt B, Negro F, Semela D, Semmo N, Villard J, Bibert S, Bochud PY, Swiss Hepatitis CCS. A systematic review and meta-analysis of HCV clearance. *Liver Int* 2017; 37:1431-45.

Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB. Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature* 2009; 461:399-401.

Genomes Project C, Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA, Abecasis GR. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015; 526:68-74.

Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, Schraut WW, Schirren CA, Waechtler M, Backmund M, Pape GR. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125:80-8.

Ghezzi S, Galli L, Kajaste-Rudnitski A, Turrini F, Marelli S, Toniolo D, Casoli C, Riva A, Poli G, Castagna A, Vicenzi E. Identification of TRIM22 single nucleotide polymorphisms associated with loss of inhibition of HIV-1 transcription and advanced HIV-1 disease. *AIDS* 2013; 27:2335-44.

Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:8459-64.

Goubau D, Deddouche S, Reis e Sousa C. Cytosolic sensing of viruses. *Immunity* 2013; 38:855-69.

Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014; 514:372-5.

Hatakeyama S. TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci* 2017; 42:297-311.

Hatziioannou T, Perez-Caballero D, Yang A, Cowan S, Bieniasz PD. Retrovirus resistance factors Ref1 and Lv1 are species-specific variants of TRIM5alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10774-9.

Heaton SM, Borg NA, Dixit VM. Ubiquitin in the activation and attenuation of innate antiviral immunity. *J Exp Med* 2016; 213:1-13.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408:740-5.

Hierholzer J, Killington R. Virus isolation and quantitation. Virology methods manual: Elsevier; 1996:25-46.

Hoffmann FS, Schmidt A, Dittmann Chevillotte M, Wisskirchen C, Hellmuth J, Willms S, Gilmore RH, Glas J, Folwaczny M, Muller T, Berg T, Spengler U, Fitzmaurice K, Kelleher D, Reisch N, Rice CM, Endres S, Rothenfusser S. Polymorphisms in melanoma differentiation-associated gene 5 link protein function to clearance of hepatitis C virus. *Hepatology* 2015; 61:460-70.

Holmes EC. The evolutionary genetics of emerging viruses. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 2009; 40:353-72.

Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 2006; 314:994-7.

Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* 2010; 327:167-70.

Hou F, Sun L, Zheng H, Skaug B, Jiang QX, Chen ZJ. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. *Cell* 2011; 146:448-61.

Hu MM, Xie XQ, Yang Q, Liao CY, Ye W, Lin H, Shu HB. TRIM38 Negatively Regulates TLR3/4-Mediated Innate Immune and Inflammatory Responses by Two Sequential and Distinct Mechanisms. *J Immunol* 2015; 195:4415-25.

Inn KS, Gack MU, Tokunaga F, Shi M, Wong LY, Iwai K, Jung JU. Linear ubiquitin assembly complex negatively regulates RIG-I- and TRIM25-mediated type I interferon induction. *Mol Cell* 2011; 41:354-65.

Isaacs A, Cox RA, Rotem Z. Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon. *Lancet* 1963; 2:113-6.

Jensen S, Thomsen AR. Sensing of RNA viruses: a review of innate immune receptors involved in recognizing RNA virus invasion. *J Virol* 2012; 86:2900-10.

Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012; 337:816-21.

Jinek M, East A, Cheng A, Lin S, Ma E, Doudna J. RNA-programmed genome editing in human cells. *Elife* 2013; 2:e00471.

Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000; 102:549-52.

Kato H, Takahasi K, Fujita T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. *Immunol Rev* 2011; 243:91-8.

Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, Uematsu S, Jung A, Kawai T, Ishii KJ, Yamaguchi O, Otsu K, Tsujimura T, Koh CS, Reis e Sousa C, Matsuura Y, Fujita T, Akira S. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441:101-5.

Keckesova Z, Ylinen LM, Towers GJ. The human and African green monkey TRIM5alpha genes encode Ref1 and Lv1 retroviral restriction factor activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:10780-5.

Kelly JN, Woods MW, Xhiku S, Barr SD. Ancient and recent adaptive evolution in the antiviral TRIM22 gene: identification of a single-nucleotide polymorphism that impacts TRIM22 function. *Hum Mutat* 2014; 35:1072-81.

King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses: Elsevier Science; 2011.

Koonin EV, Starokadomskyy P. Are viruses alive? The replicator paradigm sheds decisive light on an old but misguided question. *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 2016; 59:125-34.

Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium Escherichia coli as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109:E2774-83.

Lingala S, Ghany MG. Natural History of Hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am* 2015; 44:717-34.

Liu S, Chen J, Cai X, Wu J, Chen X, Wu YT, Sun L, Chen ZJ. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. *Elife* 2013; 2:e00785.

Maclachlan NJ, Dubovi EJ, Barthold SW, Swayne DE, Winton JR. Fenner's veterinary virology. Fifth edition. ed. Amsterdam: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier; 2017.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339:823-6.

Manocha GD, Mishra R, Sharma N, Kumawat KL, Basu A, Singh SK. Regulatory role of TRIM21 in the type-I interferon pathway in Japanese encephalitis virus-infected human microglial cells. *J Neuroinflammation* 2014; 11:24.

Mayr C. Regulation by 3'-Untranslated Regions. *Annu Rev Genet* 2017; 51:171-94.

McLaren PJ, Carrington M. The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. *Nat Immunol* 2015; 16:577-83.

Medrano LM, Rallon N, Berenguer J, Jimenez-Sousa MA, Soriano V, Aldamiz-Echevarria T, Fernandez-Rodriguez A, Garcia M, Tejerina F, Martinez I, Benito JM, Resino S. Relationship of TRIM5 and TRIM22 polymorphisms with liver disease and HCV clearance after antiviral therapy in HIV/HCV coinfected patients. *J Transl Med* 2016; 14:257.

Melchjorsen J, Jensen SB, Malmgaard L, Rasmussen SB, Weber F, Bowie AG, Matikainen S, Paludan SR. Activation of innate defense against a paramyxovirus is mediated by RIG-I and TLR7 and TLR8 in a cell-type-specific manner. *J Virol* 2005; 79:12944-51.

Menon S, Boyer NP, Winkle CC, McClain LM, Hanlin CC, Pandey D, Rothenfusser S, Taylor AM, Gupton SL. The E3 Ubiquitin Ligase TRIM9 Is a Filopodia Off Switch Required for Netrin-Dependent Axon Guidance. *Dev Cell* 2015; 35:698-712.

Menon S, Goldfarb D, Ho CT, Cloer EW, Boyer NP, Hardie C, Bock AJ, Johnson EC, Anil J, Major MB, Gupton SL. The TRIM9/TRIM67 neuronal interactome reveals novel activators of morphogenesis. *Mol Biol Cell* 2021; 32:314-30.

Mobasheri S, Irani N, Sepahi AA, Sakhaee F, Jamnani FR, Vaziri F, Siadat SD, Fateh A. Evaluation of TRIM5 and TRIM22 polymorphisms on treatment responses in Iranian patients with chronic hepatitis C virus infection. *Gene* 2018; 676:95-100.

Modrow S, Falke D, Truyen U, Schätzl H. Molekulare virologie: Springer-Verlag; 2010.

Morreale FE, Walden H. Types of Ubiquitin Ligases. *Cell* 2016; 165:248- e1.

Murphy K, Weaver C. Die induzierten Reaktionen der angeborenen Immunität. Janeway Immunologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2018:95-173.

Nisole S, Maroui MA, Mascle XH, Aubry M, Chelbi-Alix MK. Differential Roles of PML Isoforms. *Front Oncol* 2013; 3:125.

Nisole S, Stoye JP, Saib A. TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3:799-808.

Nomaguchi M, Doi N, Kamada K, Adachi A. Species barrier of HIV-1 and its jumping by virus engineering. *Rev Med Virol* 2008; 18:261-75.

Ohman T, Soderholm S, Paidikondala M, Lietzen N, Matikainen S, Nyman TA. Phosphoproteome characterization reveals that Sendai virus infection activates mTOR signaling in human epithelial cells. *Proteomics* 2015; 15:2087-97.

Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC, 3rd. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:849-60.

Paludan SR, Reinert LS, Hornung V. DNA-stimulated cell death: implications for host defence, inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol* 2019; 19:141-53.

Plooster M, Menon S, Winkle CC, Urbina FL, Monkiewicz C, Phend KD, Weinberg RJ, Gupton SL. TRIM9-dependent ubiquitination of DCC constrains kinase signaling, exocytosis, and axon branching. *Mol Biol Cell* 2017; 28:2374-85.

Qin Y, Liu Q, Tian S, Xie W, Cui J, Wang RF. TRIM9 short isoform preferentially promotes DNA and RNA virus-induced production of type I interferon by recruiting GSK3-beta to TBK1. *Cell Res* 2016; 26:613-28.

Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 2006; 203:413-24.

Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, Pirani A, Gernert K, Deng J, Marzolf B, Kennedy K, Wu H, Bennouna S, Oluoch H, Miller J, Vencio RZ, Mulligan M, Aderem A, Ahmed R, Pulendran B. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009; 10:116-25.

Rajsbaum R, Garcia-Sastre A, Versteeg GA. TRIMmunity: the roles of the TRIM E3-ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity. *J Mol Biol* 2014; 426:1265-84.

Rajsbaum R, Stoye JP, O'Garra A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells. *Eur J Immunol* 2008; 38:619-30.

Rajsbaum R, Versteeg GA, Schmid S, Maestre AM, Belicha-Villanueva A, Martinez-Romero C, Patel JR, Morrison J, Pisanelli G, Miorin L, Laurent-Rolle M, Moulton HM, Stein DA, Fernandez-Sesma A, tenOever BR, Garcia-Sastre A. Unanchored K48-linked polyubiquitin synthesized by the E3-ubiquitin ligase TRIM6 stimulates the interferon-IKKepsilon kinase-mediated antiviral response. *Immunity* 2014; 40:880-95.

Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010; 376:2018-31.

Reymond A, Meroni G, Fantozzi A, Merla G, Cairo S, Luzi L, Riganelli D, Zanaria E, Messali S, Cainarca S, Guffanti A, Minucci S, Pelicci PG, Ballabio A. The tripartite motif family identifies cell compartments. *EMBO J* 2001; 20:2140-51.

Rios FJ, Touyz RM, Montezano AC. Isolation and Differentiation of Murine Macrophages. *Methods Mol Biol* 2017; 1527:297-309.

Rodriguez KR, Bruns AM, Horvath CM. MDA5 and LGP2: accomplices and antagonists of antiviral signal transduction. *J Virol* 2014; 88:8194-200.

Rothenfusser S, Goutagny N, DiPerna G, Gong M, Monks BG, Schoenemeyer A, Yamamoto M, Akira S, Fitzgerald KA. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-indepen-

dent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. *J Immunol* 2005; 175:5260-8.

Rückel J. Tripartite Motif Family Protein 9: Das genetisch determinierte Expressionsniveau moduliert die angeborene antivirale Immunität und Virusreplikation. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät. [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians Universität München; 2018.

Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 2014; 11:783-4.

Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 2009; 31:25-34.

Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:513-45.

Schulz O, Pichlmair A, Rehwinkel J, Rogers NC, Scheuner D, Kato H, Takeuchi O, Akira S, Kaufman RJ, Reis e Sousa C. Protein kinase R contributes to immunity against specific viruses by regulating interferon mRNA integrity. *Cell Host Microbe* 2010; 7:354-61.

Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelson T, Heckl D, Ebert BL, Root DE, Doench JG, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343:84-7.

Shi M, Cho H, Inn KS, Yang A, Zhao Z, Liang Q, Versteeg GA, Amini-Bavil-Olyaee S, Wong LY, Zlokovic BV, Park HS, Garcia-Sastre A, Jung JU. Negative regulation of NF-kappaB activity by brain-specific TRIpartite Motif protein 9. *Nat Commun* 2014; 5:4820.

Short KM, Cox TC. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding. *J Biol Chem* 2006; 281:8970-80.

Siddle KJ, Quintana-Murci L. The Red Queen's long race: human adaptation to pathogen pressure. *Curr Opin Genet Dev* 2014; 29:31-8.

Sioud M. Advances in RNA sensing by the immune system: separation of siRNA unwanted effects from RNA interference. *Methods Mol Biol* 2010; 629:33-52.

Sparrer KMJ, Gack MU. TRIM proteins: New players in virus-induced autophagy. *PLoS Pathog* 2018; 14:e1006787.

Stetson DB, Medzhitov R. Type I interferons in host defense. *Immunity* 2006; 25:373-81.

Su X, Yee LJ, Im K, Rhodes SL, Tang Y, Tong X, Howell C, Ramcharran D, Rosen HR, Taylor MW, Liang TJ, Yang H, Virahep CSG. Association of single nucleotide poly-

morphisms in interferon signaling pathway genes and interferon-stimulated genes with the response to interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2008; 49:184-91.

Sumpter R, Jr., Loo YM, Foy E, Li K, Yoneyama M, Fujita T, Lemon SM, Gale M, Jr. Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. *J Virol* 2005; 79:2689-99.

Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science* 2013; 339:786-91.

Tanji K, Kamitani T, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. *Neurobiol Dis* 2010; 38:210-8.

Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226:1211-3.

Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M. Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature* 2009; 461:798-801.

UniProt C. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res* 2019; 47:D506-D15.

van Gent M, Sparrer KMJ, Gack MU. TRIM Proteins and Their Roles in Antiviral Host Defenses. *Annu Rev Virol* 2018; 5:385-405.

van Tol S, Hage A, Giraldo MI, Bharaj P, Rajsbaum R. The TRIMendous Role of TRIMs in Virus-Host Interactions. *Vaccines (Basel)* 2017; 5.

Van Valen L. A new evolutionary law. *Evol Theory* 1973; 1:1-30.

Versteeg GA, Rajsbaum R, Sanchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, Inn KS, Fernandez-Sesma A, Jung J, Garcia-Sastre A. The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors. *Immunity* 2013; 38:384-98.

Wang C, Chen T, Zhang J, Yang M, Li N, Xu X, Cao X. The E3 ubiquitin ligase Nrdp1 'preferentially' promotes TLR-mediated production of type I interferon. *Nat Immunol* 2009; 10:744-52.

Wang S, Chen Y, Li C, Wu Y, Guo L, Peng C, Huang Y, Cheng G, Qin FX. TRIM14 inhibits hepatitis C virus infection by SPRY domain-dependent targeted degradation of the viral NS5A protein. *Sci Rep* 2016; 6:32336.

Westbrook RH, Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol* 2014; 61:S58-68.

Whitehead KA, Dahlman JE, Langer RS, Anderson DG. Silencing or stimulation? siRNA delivery and the immune system. *Annu Rev Chem Biomol Eng* 2011; 2:77-96.

Winkle CC, McClain LM, Valtschanoff JG, Park CS, Maglione C, Gupton SL. A novel Netrin-1-sensitive mechanism promotes local SNARE-mediated exocytosis during axon branching. *J Cell Biol* 2014; 205:217-32.

Wu B, Peisley A, Richards C, Yao H, Zeng X, Lin C, Chu F, Walz T, Hur S. Structural basis for dsRNA recognition, filament formation, and antiviral signal activation by MDA5. *Cell* 2013; 152:276-89.

Wu J, Chen ZJ. Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids. *Annu Rev Immunol* 2014; 32:461-88.

Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science* 2013; 339:826-30.

Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr Protoc Mol Biol* 2005; Chapter 28:Unit 28 1.

Yap MW, Nisole S, Stoye JP. A single amino acid change in the SPRY domain of human Trim5alpha leads to HIV-1 restriction. *Curr Biol* 2005; 15:73-8.

Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2015; 32:48-53.

Zeng J, Wang Y, Luo Z, Chang LC, Yoo JS, Yan H, Choi Y, Xie X, Deverman BE, Gradinaru V, Gupton SL, Zlokovic BV, Zhao Z, Jung JU. TRIM9-Mediated Resolution of Neuroinflammation Confers Neuroprotection upon Ischemic Stroke in Mice. *Cell Rep* 2019; 27:549-60 e6.

Zhang Z, Bao M, Lu N, Weng L, Yuan B, Liu YJ. The E3 ubiquitin ligase TRIM21 negatively regulates the innate immune response to intracellular double-stranded DNA. *Nat Immunol* 2013; 14:172-8.

Zhu Q, Tan P, Li Y, Lin M, Li C, Mao J, Cui J, Zhao W, Wang HY, Wang RF. DHX29 functions as an RNA co-sensor for MDA5-mediated EMCV-specific antiviral immunity. *PLoS Pathog* 2018; 14:e1006886.

7. Abkürzungsverzeichnis

β-TrCP	*Beta-tranducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*
AA	Aminosäure (engl. *amino acid*)
ANOVA	*Analysis of variance*
AIM2	*Absent in Melanoma 2*
AP-1	*Activator protein 1*
AR	*Acid-rich region*
ARF	*ADP-ribosylation factor*
AVG	Mittelwert (engl. *Average*)
bp	Basenpaaren
BHK	*Baby hamster kidney*
BMM	*Bone marrow derived macrophages*
BROMO	*Bromodomain*
CC(D)	*Coiled-coil*
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGAS	*Cyclic guanosinmonophosphat-adenosinmonophosphat synthase*
CH	Chronische Hepatitis C
Chlq	Chloroquin
CI	Konfidenzintervall (engl. *confidence interval*)
Co-siRNA	*Control silencing RNA*
Cos	*C-terminal subgroup one signature*
COVID-19	*Coronavirus disease 2019*
CpG	*Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin Oligonukleotid*
CRISPR	*Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
CT	*Threshold cycle*
DAAs	Direkte antivirale Agenzien
DAPI	4’,6-Diamidin-2-phenylindol
DDX41	*DEAD-Box Helicase 41*
DMEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
ds (+)/(-)	Doppelsträngig positiver bzw. negativer Polarität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFS	*Elongation factor alpha short*
ELISA	*Enzyme-linked immunosorbent assay*
EMCV	Enzephalomyokarditits-Virus
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	*Fluorescensce-activated cell sorting*
FCS	Fötales Kälberserum (enlg. *fetal calf serum*)
FN3	*Fibronectin type 3*
FSC	*Forward scatter*
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GFP	Grünfluoreszierendes Protein
GLuc	Gauss'sche Luciferase
GSK-3β	*Glykogen synthase kinase 3-beta*
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)]-Ethansulfonsäure
HEK	*Human embryonic kidney*
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSV	Herpes-simplex-Virus
IAV	Influenza-Alpha-Virus
IFNAR	Interferon-Alpha-Rezeptor
IL	Interleukin
IκBα	*Inhibitor of kappa B*
IKK	IκBα-Kinase-Komplex
IPS-1	*Interferon-beta promoter stimulator-1 (alias MAVS)*
IRAK	Interleukin-1-assoziierte Kinase
IRF	*Interferon regulatory factor*
IFN	*Interferon*
ISGF	*Interferon stimulator gene factor 3*
ISG	Interferon-stimulated genes
ISRE	*Interferon-sensitive response elements*
JAK	Janus-Kinase
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
kDA	Kilodalton
KLD	*Kinase Ligase DpnI*
KO, -/-	*Knock Out*
LB	*Lisogeny broth* bzw. Luria-Bertani-Medium
LGP-2	*Laboratory of genetics and physiology 2*
LPS	Lipopolysaccharid
LUBAC	*Linear ubiquitin assembly complex*
NEB	New England Biolabs
NS3, NS5	Nicht-strukturelles Protein 3 bzw. 5
ns	Statistisch nicht signifikant
MATH	*Meprin and tumor necrosis factor receptor-associated homology domain*
MAVS	*Mitochondrial antiviral-signaling protein* (alias *IPS-1*)
M-CSF	*Macrophage colony stimulating factor*
mCpG	Murine Desoxycytidin-Phosphorsäure-Desoxyguanosin Oligonukleotide
MDA-5	*Melanoma differentiation associated protein 5*
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
min	Minuten
miRNA	Micro Ribonukleinsäure
MoI	Multiplizität der Infektion
mRNA	*Messenger RNA*
MyD88	*Myeloid differentiation primary response 88*
NEMO	*Nuclear factor -kappa B essential modulator*

NF-κB	*Nuclear factor -kappa B*
NHL	*Filamin domain, NHL repeat*
Nrdp-1	*Neuregulin receptor degradation protein-1*
nsSNP	N*on synonymous single nucleotide polymorphism*
OASL	*Oligoadenylate synthase-like protein*
OR	*Odds ratio*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	*Pathogen-associated molecular pattern*
PBMC	Humane mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. *Phosphate buffered saline*)
PCR	Polymerasenkettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	*Plaque forming units*
PHD	*Plant homeodomain*
p.i.	Postinfektiös
Poly(dA:dT)	Poly(deoxyadelyl-deoxythymidyl) Natriumsalz
poly(I:C)	Poly(inosin-cytosin)-Säure
pppRNA	5'-Triphosphat-RNA
PRR	*Pattern recognition receptor*
PRY	*SPRY-associated*
PVDF	Polyvinylidenfluoridmembran
qRT-PCR	*Quantitative Real-time-PCR*
R848	Resiquimod
RIG-I	*Retinoic acid inducible gene 1*
RING	*Really interesting new gene*
RIPA	*Radioimmunoprecipitation assay buffer*
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RLR	RIG-I-*like*-Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.	Siehe
SAH	Spontanausheilung
SARS-CoV2	*Severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*
SCF	*SKP1-CUL1-F-box protein*
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. s*odium dodecyl sulfate*)
seAP	Sezernierte alkalische Phosphatase
SEM	Standardfelher des Mittelwerts (engl. *standard error of the mean)*
SFV	Semliki-Forest-Virus
sgRNA	*Small guide RNA*
siRNA	*Small interfering RNA*
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
STING	*Stimulator of interferon genes*
SOC	*Super optimal broth*
sog.	Sogenannt-
SPRY	*SPIa and ryanodine receptor domain*

SSC	*Sideward scatter*
ss (+)/(-)	Einzelsträngig (engl. *single stranded*) positiver bzw. negativer Polarität
STAT	*Signal tranducer and activator of transcription*
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TANK	*TRAF family member-associated NF-κB activator*
TBK-1	*TANK-binding kinase 1*
TBST	*TRIS-buffered saline with Tween-20*
TCID50	*Tissue culture infective dose 50*
TIR	*Toll/interleukin-1 receptor homology domain*
TIRAP	*TIR containing-adaptor protein*
TLR	Toll-*like*-Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRAF-6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	*TRIF related adaptor molecule*
TRIF	*TIR domain-containing adaptor-inducing IFN-β*
TRIM	*Tripartite motif containing*
TRIM9l	*TRIM9 long isoform*
TRIM9s	*TRIM9 short isoform*
TRIS	Tromethamin
u.a.	Unter anderem, unter anderen
UniProt	*Universal protein database*
UPL	*Universal probe library*
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
vgl.	Vergleiche
VSV	*Vesicular stomatitis*-Virus
VSV-M51R	*Vesicular stomatitis*-Virus, M-Protein-Mutante
WT, wt	Wildtyp
YFV	Gelbfiebervirus (engl. *yellow fever virus*)
YF-17D	Gelbfieberimpfvirus
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Danksagung

Mein herzlicher Dank geht zunächst an meinen Doktorvater Prof. Simon Rothenfußer, für die Möglichkeit unter der Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Neben der engagierten Betreuung, der Anleitung zum wissenschaftlichen Denken und der Unterstützung über die Dissertation hinaus habe ich seine Zugänglichkeit als Mentor und seinen hohen Anspruch an Gründlichkeit in der Wissenschaft hoch geschätzt und bewundert.

Bei Prof. Stefan Endres möchte ich mich herzlich für die Möglichkeit bedanken, unter seiner Direktion meine Dissertation in Assoziation an das internationale Doktorandenkolleg “i-target” in der Abteilung für Klinische Pharmakologie abzulegen. Die für einen Medizinstudenten außerordentlichen Möglichkeiten, in einer solchen Umgebung zu lernen und sich zu entwickeln, sowie die einzigartige Arbeitsatmosphäre in der KlinPharm wären in meinen Augen ohne die Leitung durch Professor Endres unvorstellbar. Bei Prof. Ulrike Protzer und Hanaa Gaber an der TUM München möchte ich mich für die wertvolle und gelungene Kooperation bedanken.

Der gesamten AG Rothenfußer vom Zeitraum 2015/16 gilt mein Dank für das angenehme Arbeitsklima und die anregenden Diskussionen bei Lab Meetings. Für seine geduldige Unterstützung und seine methodische Anleitung im Labor möchte ich mich bei Dr. Dharmendra Pandey bedanken. Seine Begeisterung für Wissenschaft war inspirierend. Mein herzlicher Dank geht auch an Johannes Rückel für seine Zugänglichkeit bei Fragen und für seine Vorbildfunktion. Mein Dank geht außerdem an Christine Heuer für ihren tatkräftigen Einsatz, um mich in den ersten Monaten im Labor einzuarbeiten. Bei Hanna Nowotny möchte ich mich, für ihren festen Glauben an TRIM9 und ihre unermüdliche Arbeit an der Fortsetzung des Projekts bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei Daniel Böhmer und Philipp Metzger herzlich bedanken. Ihr Enthusiasmus für Wissenschaft und Immunologie waren ansteckend, und ihre Unterstützung bei der experimentellen Arbeit sowie bei der Verfassung der Dissertation unschätzbar wertvoll. An dieser Stelle möchte ich mich ebenso bei der gesamten Abteilung für Klinische Pharmakologie für die Freundschaft, die gegenseitige Unterstützung und für die prägende und unvergessliche Zeit bedanken.

Schließlich danke ich meinen Eltern, Corinna und Lazaros, für ihre bedingungslose Unterstützung über das gesamte Studium hinweg, ihren Glauben an mich und ihre Gabe, mich immer wieder auf den Boden der Tatsachen zurückzuholen. Meinen Geschwistern, meiner gesamten Familie und allen meinen Freunden möchte ich für die private Unterstützung ebenfalls herzlich danken.

9. Veröffentlichungen

Konferenzposter

Nowotny H., Pandey D., **Tossounidis J.**, Rueckel J., Protzer U., Endres S., Rothenfusser S., TRIM9 expression influences replication of positive- and negative-stranded RNA viruses. *Immunotrain 2016, International Symposium: Innate immunity meets tumor immunology.*

Tossounidis J., Rueckel J., Pandey D., Gaaber H., Anton S., Willms S., Protzer U., Endres S., Rothenfusser S., TRIM9: A modulator of antiviral immunity to RNA viruses. *TOLL 2015, Targeting Innate Immunity, Marbella, Spanien*

Vorträge

Tossounidis J., TRIM9 & Hepatitis C: TRIM9 regulates immunity against ssRNA-Viruses in a species-, cell type- and isoform-dependent manner, *i-target Seminar 28.11.2016, München*

Tossounidis J., TRIM9 & Hepatitis C: Reguliert TRIM9 (isoform- und zelltypabhängig) die Immunität gegen Einzelsträngige RNA-Viren?, *FöFoLe-Retreat 07.05.2016 Herrsching am Ammersee*