

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Stefan Endres

***TRIM9 – dichotome Funktionen in der angeborenen
Immunität***



Dissertation

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

vorgelegt von

Hanna Franziska Nowotny

aus Dortmund

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Rothenfuß

Mitberichterstatter: PD Dr. Reinhard Obst
PD Dr. Dr. Fabian Hauck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Dharmendra Pandey

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 01.12.2022

In Widmung an meine Eltern und meine Oma

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Angeborene Immunität	1
1.1.1 Abwehrmechanismen gegen invasive Pathogene	1
1.1.2 Antivirale Abwehrmechanismen	1
1.1.2.1 Mustererkennungsrezeptoren	2
1.1.2.2 RIG-I- und MAVS-gekoppelte Signalkaskade	3
1.2 TRIM Proteine	4
1.2.1 Die Familie der TRIM Proteine	4
1.2.2 Erkenntnisse über TRIM9 aus publizierter Literatur	5
1.2.3 Erkenntnisse über TRIM9 aus Vorarbeiten der AG Rothenfußer	9
1.3 Hypothese und Fragestellung	13
Material und Methoden	15
2.1 Materialien	15
2.1.1 Geräte und Allgemeine Verbrauchsmittel	15
2.1.1.1 Geräte	15
2.1.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2 Extraktions- und Analysekits	16
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Puffer und Medien	21
2.1.5 Antikörper	24
2.1.6 PCR-Primer	24
2.1.7 Plasmide	26
2.1.8 siRNAs	27
2.1.9 Stimulantien	27
2.1.9 Viren	27
2.1.10 Zelllinien	29
2.1.11 Software	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zelluläre Methoden	30
2.2.1.1 Zellkultur	30
2.2.1.2 Transfektion von Zellen	30
2.2.1.3 Infektion von Zellen	31
2.2.1.4 Isolation von humanen PBMCs und Monozyten	31
2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot	31

2.2.1.6 Immunopräzipitation.....	33
2.2.1.7 ELISA.....	34
2.2.1.8 TCID 50 (Tissue Culture Infective Dose)	34
2.2.1.9 Dualer Luciferase Assay	35
2.2.1.10 Konfokale Mikroskopie.....	36
2.2.1.11 Durchflusszytometrie (FACS)	38
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion.....	38
2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	39
2.2.2.3 Klonierung und lentivirale Transfektion.....	40
2.2.2.4 Etablierung eines stabilen Überexpressionsmodells von TRIM9	44
2.2.2.4 CRISPR/Cas9-Geneditierung: Herstellung stabiler TRIM-9 Knock-out Zelllinien	48
2.2.2.5 Mutationsscreening: T7-Endonuklease-Assay und Sequenzierung ..	52
2.2.2.6 Entwicklung und Verifizierung neuer 1205Lu und A549 TRIM9 Knockout- Zellen.....	55
2.2.2.6 Statistische Analyse.....	58
Ergebnisse	59
3.1 Nachweis von TRIM9 in murinen Hirn- und Leberpräparaten sowie humanen Leberpräparaten, 1205Lu Zellen und Monozyten.....	59
3.1.1 TRIM9 lässt sich mittels Immunhistochemie im Hirngewebe der Maus und sowohl murinen als auch humanen Leberschnitten nachweisen und zeigt dabei ein zytoplasmatisches Expressionsmuster.....	59
3.1.2 Trim9 kommt in der humanen Melanomzelllinie 1205Lu in zwei Isoformen TRIM9l und TRIM9s vor und wird in CD14-positiven primären humanen Monozyten exprimiert.....	62
3.2 Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Melanomzellen und A549 Bronchialepithelzellen hemmt sowohl die Replikation des negativ-Strang RNA Virus VSV als auch der positiv-Strang RNA Viren YFV17D, EMCV und Mengo Virus.....	65
3.3 Beide, sowohl die lange als auch die kurze Isoform von TRIM9 sind erforderlich, um Virusreplikation zu erleichtern.....	69
3.4 Die kurze Isoform von TRIM9 hat eine kürzere Halbwertszeit als die lange Isoform und wird über proteasomale Degradation abgebaut.....	71
3.5 Die Isoformen von TRIM9 bilden vom Zellzyklus-unabhängig tubuläre oder punktuell-aggregierende Strukturen im Zytoplasma aus	75
3.5.1 Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen von TRIM9	75

3.5.2 Die Funktion von TRIM9 während der Zellteilung.....	75
Diskussion	78
4.1 Ergebnisüberblick	78
4.2 Ergebnisdiskussion.....	81
4.2.1 Gewebsexpression von TRIM9.....	81
4.2.2 Provirale Funktion von TRIM9 und Bedeutung der kurzen und langen Isoform	82
4.2.3 Kritische Beurteilung der gewählten Methodik.....	84
4.3 Ausblick und Relevanz	85
Zusammenfassung	86
Summary	88
Literaturverzeichnis	90
Anhang	95
7.1 Abkürzungsverzeichnis.....	95
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	100
7.3 Danksagungen.....	102
7.4 Affidavit.....	103

Einleitung

1.1 Angeborene Immunität

1.1.1 Abwehrmechanismen gegen invasive Pathogene

Trotz tagtäglichem Kontakt zu pathogenen Mikroorganismen, führen diese nur in seltenen Fällen zu Infektionen. Dies ist den Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers zu danken. Sowohl das angeborene als auch das erworbene Immunsystem können auf unterschiedliche Art und Weise zwischen körpereigenen und körperfremden Substanzen unterscheiden. Ein wichtiger Unterschied zwischen diesen zwei Mechanismen basiert auf der Anzahl und Diversität der Rezeptoren und Proteine, die in den Prozess der Erkennung von Pathogenen eingebunden sind. Die angeborene Immunität nutzt eine sehr limitierte Anzahl an keimbahnkodierten Rezeptoren und Proteinen, während die erworbene Immunität durch somatische Rekombination über eine enorme Vielzahl an Antigenrezeptoren verfügt. Für die Aktivierung des körpereigenen Immunsystems spielen sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) eine große Rolle. PAMPs sind hoch konservierte charakteristische Moleküle von Krankheitserregern, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglykane, mannosereiche Oligosaccharide oder nicht methylierte CpG- Desoxyribonukleinsäure (DNA). Diese werden durch Zellen des angeborenen Immunsystems erkannt und aktivieren Mechanismen wie Lyse und Phagozytose durch antimikrobielle Enzyme und Peptide sowie das Komplementsystem und Zellen der Erstantwort, um die potentiell infektiösen Partikel zu eliminieren. Nur wenn diese erste Barriere der Immunität überwunden werden konnte, werden Mechanismen der adaptiven Immunität eingeleitet (Lazar 2002, Zumla 2010).

1.1.2 Antivirale Abwehrmechanismen

Virale Infektionen können in der Regel durch körpereigene angeborene und erworbene Abwehrmechanismen verhindert werden. Die initiale antivirale Immunantwort wird dabei wesentlich durch angeborene Mechanismen des Organismus gesteuert. Nach erfolgreicher Detektion des eindringenden Virus durch Rezeptoren des Immunsystems, werden dabei verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die die Synthese von Typ-I-Interferonen wie Interferon alpha (IFN- α) und Interferon beta (IFN- β) initiieren.

Diese Markerzytokine der antiviralen Immunität steuern eine Vielzahl an antiviralen, antiproliferativen und immunmodulatorischen Funktionen und bewirken damit eine Hemmung der viralen Vermehrung in infizierten Zellen, schützen weitere Zellen vor Infektion und steuern die Aktivierung der adaptiven Immunität (Honda K 2005).

1.1.2.1 Mustererkennungsrezeptoren

Für Prozesse der initialen Immunabwehr spielen Mustererkennungsrezeptoren, auch *pattern recognition receptors* (PRRs) genannt, eine bedeutende Rolle. Diese werden auch auf Epithel- und Endothelzellen sowie Fibroblasten vorgefunden, sodass auch diese, neben den spezialisierten Zellen der angeborenen Immunantwort wie Makrophagen und dendritische Zellen, einen wichtigen Beitrag zur Immunabwehr leisten. PRRs können die in Mikroben konservierten PAMPs sowie von verletzten Zellen freigesetzte endogene *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) erkennen (Tang, et al. 2012). Beispiele von DAMPs sind extrazelluläre Nukleotide, Hitzeschockproteine, Harnsäurekristalle oder das *High-Mobility Group Box 1* Protein (Said-Sadier and Ojcius 2012). Die Familie der PRRs kann in vier große Unterfamilien eingeteilt werden: *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) und Typ-C-Lektin-Rezeptoren (CLRs), die als Transmembranproteine fungieren sowie zytoplasmatische (RIG)-*I-like*-Rezeptoren (RLRs) und NOD-like-Rezeptoren (NLRs). Ziel der Molekülerkennung in der antiviralen Abwehr ist die Aktivierung eines antiviralen Genprogramms, das eine gesteigerte Transkription von entzündungsfördernden Genen umfasst. Zu diesen gehören proinflammatorische Zytokine, Typ-I-IFN, Chemokine, antimikrobielle Proteine sowie eine Vielzahl weiterer Proteine (Takeuchi O, 2010).

Für die Erkennung von Virusinfektionen spielen vor allem die Nukleinsäure erkennenden TLRs und die RLRs eine große Rolle. Zur Gruppe der zytoplasmatischen RLRs gehören *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *Melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) und *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2). Die Aufgabe der RLRs ist es, virale RNA von abundanter körpereigener RNA unterscheiden zu können. RIG-I wird dabei durch kurze bis zu ein Kilobasenpaar (kbp) lange doppelsträngige RNA (dsRNA) mit einer Tri- oder Diphosphat-Modifikation am 5' Ende aktiviert und löst dadurch eine Signalkette aus, die zur Produktion von Typ-I-IFN führt (Abb. 1). Die nachgeschaltete Signaltransduktion wird dabei unter anderem durch Interaktionen zwischen den *Caspase Recruitment Domains* (CARDs) der RLRs vermittelt (Goubau, et al. 2014, Hornung V 2006, Rehwinkel and Gack 2020).

Im Gegensatz zu RIG-I erkennt MDA5 lange (über zwei kbp) dsRNA und auch das synthetische dsRNA Analogon *polyinosinic:polycytidylic acid* (poly I:C), welches in vielen experimentellen Systemen als Immunstimulator eingesetzt wird. Das dritte Mitglied dieser Rezeptorfamilie LGP2 weist keine CARD Domäne auf, und es wird ihm eine modulierende Funktion in der RIG-I- und MDA5-gekoppelten Viruserkennung zugeschrieben (Yoneyama M 2005).

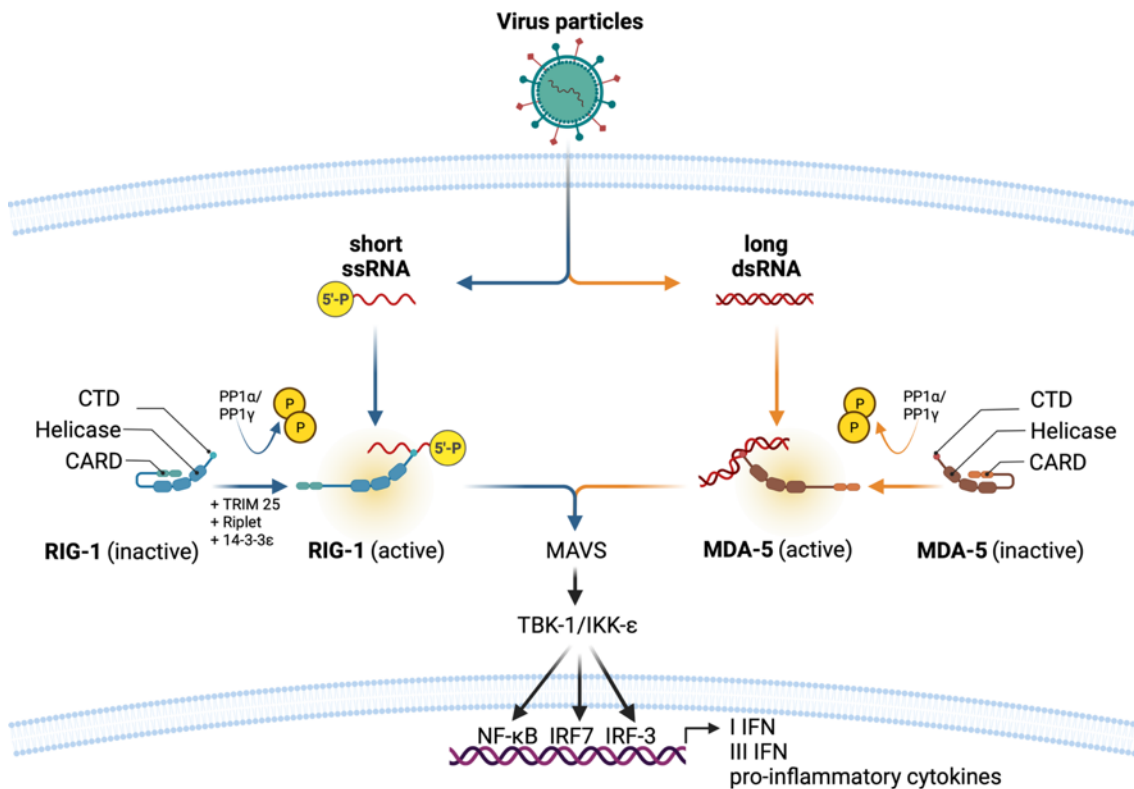


Abbildung 1: RIG-I- und MAVS-gekoppelte Signalkaskade (modifiziert nach: Chan YK, 2016 und Takeuchi O, 2010)

1.1.2.2 RIG-I- und MAVS-gekoppelte Signalkaskade

Ein wichtiger Signalweg für die Einleitung einer Immunantwort gegen Viren erfolgt über RIG-I und MDA-5 und die an *mitochondrial antiviral signalling protein* (MAVS) gekoppelte Signaltransduktion. Diese zwei Mitglieder der RLR Familie verharren in Abwesenheit eines passenden Liganden durch Phosphorylierung ihrer CARD Domänen und über die *carboxy-terminal-domains* (CTDs) vermittelte Autoinhibition in einem inaktivierten Zustand. Wie in Abbildung 1 zu erkennen, induziert die Bindung des passenden RNA-Liganden eine Konformationsänderung, mit der Folge einer Freisetzung der CARDs, und Dephosphorylierung der RLRs durch die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen Proteinphosphatase-1-alpha (PP1α) oder

Proteinphosphatase-1-gamma (PP1 γ). RIG-I wird zudem durch TRIM25-vermittelte und Lys63-gekoppelte Ubiquitinierung der CARD Domäne aktiviert. Eine weitere Ubiquitin E3 Ligase, genannt Riplet, vermittelt die Lys63-gekoppelte Ubiquitinierung der CTD. Durch diese Ubiquitinierung wird eine Tetramerisierung von RIG-I erzielt. Hierdurch wird unter anderem über *mitochondrial-targeting chaperone protein 14-3-3 ϵ* eine Translokation an das Mitochondrium und die Interaktion mit MAVS ermöglicht. MDA-5 kann nach erfolgreicher Induktion durch virale RNA über die Formation von Filamenten ebenfalls an MAVS binden. Nach erfolgter Bindung von RIG-I und MDA-5 formen sich MAVS Aggregate zu einer Signalplattform, die im Zusammenspiel mit *TNF receptor associated factor* (TRAF) Molekülen die TANK-bindende Serin/Threonin-Proteinkinase TBK1 oder die I κ B- ϵ Kinase (IKK ϵ) und den IKK α -IKK β -IKK γ Komplex aktivieren. Diese leiten die Phosphorylierung von *IFN regulatory factor 3* (IRF3) und 7 (IRF7) sowie *nuclear factor "kappa-light-chain-enhancer" of activated B-cells* (NF- κ B) ein. IRF3, IRF7 und NF- κ B können schließlich die Genexpression von Typ-I- und Typ-III-IFN induzieren, wie auch von weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Chan YK 2016).

1.2 TRIM Proteine

1.2.1 Die Familie der TRIM Proteine

Die Familie der *tripartite motif* (TRIM) Proteine umfasst inzwischen mindestens 80 verschiedene Proteine. Die Proteine weisen allesamt eine ähnliche Struktur auf. Dazu gehören eine N-terminale *really interesting new gene* (RING) Domäne, ein oder zwei *b-box type zinc finger domains* (B-Boxen) und eine *coiled-coil domain* (CC). Weiterhin verfügen die einzelnen Mitglieder der TRIM-Familie über weitere variable Gruppen, anhand derer diese in elf verschiedene Subgruppen eingeteilt werden können (Ozato K 2008). Einige der Proteine sind derweil noch unklassifiziert und keiner der Untergruppen zuzuordnen.

Bislang sind Funktionen einzelner Domänen zwar in Teilen bekannt, ihre Bedeutung für die Funktion des jeweiligen Proteins jedoch meist nur unzureichend erforscht. Die *C-terminal subgroup one signature* (COS) Domäne zum Beispiel wurde mit mikrotubulären Bindungen assoziiert (Short KM 2006) während die PRY/SPRY Domäne, auch B30.2 oder *RFP-like* Domäne genannt, Antikörper-ähnliche Bindungen aufweist (James LC 2007). Mit Hilfe der RING Domäne üben TRIM Proteine E3 Ubiquitin Ligasefunktion aus.

Die Ubiquitinierung als posttranslationale Modifikation von Proteinen in Eukaryonten, bezeichnet die Bindung von einem stark konservierten, 76 Aminosäuren umfassenden Polypeptid an ein Zielprotein und beinhaltet zunächst die Initiation durch Bindung des ubiquitinierten C-Terminus an ein Cystein des aktiven Zentrums eines Ubiquitin-aktivierenden-Enzyms (E1). Das gebundene Ubiquitin wird dann durch eine Thiol-Ester Bindung auf ein Ubiquitin-konjugierendes-Enzym (E2) übertragen und schließlich abhängig vom Typ der Ubiquitin Ligase (E3) in die Nähe eines Substrates gebracht, um das Ubiquitin auf dieses Zielprotein zu übertragen. TRIM Proteine bilden die größte Gruppe der RING Domäne enthaltenden E3 Ligasen (Napolitano LM 2011).

Die verschiedenen Mitglieder der Familie der TRIM Proteine übernehmen eine wichtige Rolle in einer Vielzahl zellulärer Prozesse wie Apoptose, Onkogenese, Signalübertragung während der Immunantwort und in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen (Meroni G 2005). Besonders wichtig für die folgenden Ergebnisse ist jedoch die Rolle von TRIM Proteinen in Signalwegen der angeborenen Immunität, vor allem während antiviraler Immunantworten. Auch wenn einer Vielzahl von TRIM Proteinen eine Rolle in antiviralen Immunantworten zugesprochen wird, ist relativ wenig über die Wirkmechanismen der verschiedenen Proteine in Signalwegen der angeborenen oder erworbenen Immunität bekannt.

Während die meisten der TRIM Proteine sowohl in humanen als auch murinen Geweben nachzuweisen sind, werden einige Mitglieder der Proteinfamilie, wie TRIM12 oder TRIM30 jedoch nur in murinem Gewebe beschrieben (Rajsbaum R 2008).

1.2.2 Erkenntnisse über TRIM9 aus publizierter Literatur

TRIM9 gehört mit je einer COS, *fibronectin type III domain (FN3)*, und PRY/SPRY Domäne (Abb. 2) zur Untergruppe I dieser Proteinfamilie (Ozato K 2008). Für TRIM9 wurde eine besonders spezifische Interaktion der RING E3 Ligase mit *Ubiquitin conjugating enzyme E2 G2 (UBE2G2)* beschrieben (Napolitano LM 2011).

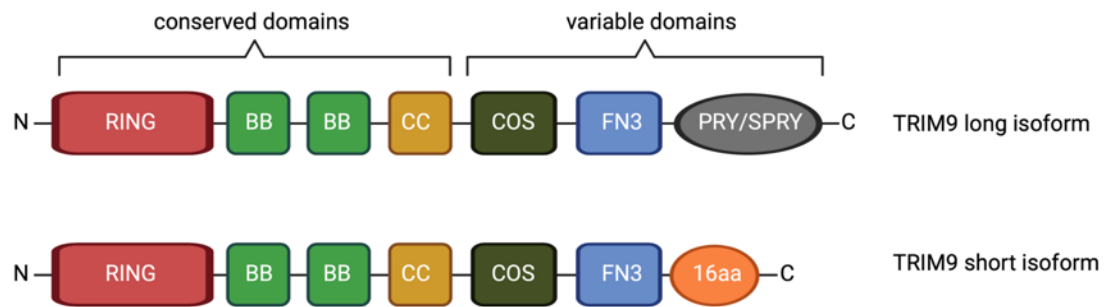


Abbildung 2: TRIM9 Proteine und ihre Domänen

(modifiziert nach: Nisole S, 2005 und (Qin Y 2016))

Die höchste Expression von TRIM9 ist im Gehirn nachzuweisen und Funktionen des Proteins sind im Gehirn am exaktesten beschrieben (Berti C 2002).

TRIM9 fungiert in murinen kortikalen Neuronen als wichtiger Modulator der Vesikelfusion und Axonverästelung. In Anwesenheit von Netrin-1 wird die Bindung von *synaptosomal nerve-associated protein 25* (SNAP25) an *vesicle-associated membrane protein* (Tiyadatah, et al.) 2 und 7 durch Interaktion mit TRIM9 blockiert, sodass die *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment-receptor* (SNARE) Komplex vermittelte Exozytose und Verzweigung von Axonen unterbunden wird. Nach Bindung von Netrin-1 an den zugehörigen Rezeptor *deleted in colorectal cancer* (DCC) wird die Interaktion von TRIM9 und SNAP25 unterbunden, sodass über SNAP25 die SNARE Komplex Formation, Vesikelfusion, Expansion der Plasmamembran und Axonverästelung erzielt werden kann. Grundlage hierfür ist die Ubiquitin-Ligasefunktion von TRIM9 (Winkle CC 2014). Auch *in vivo* konnte eine vermehrte Verästelung von Neuronen in murinen embryonalen und im Erwachsenenalter entstandenen Hippocampusneuronen in Abwesenheit von TRIM9 beobachtet werden, sowie eine verminderte Dichte an dendritischen Fortsätzen und eine Fehllokalisierung von im Erwachsenenalter entstandenen Neuronen. Diese beobachteten Effekte wurden mit einer Beeinträchtigung der vom Hippocampus abhängigen Gedächtnisleistung in Zusammenhang gebracht (Winkle CC 2016). Genauere Untersuchungen zeigten, dass TRIM9, welches an Filopodien neuronaler Wachstumskegel lokalisiert ist und an den Netrin-DCC-Rezeptor bindet, mit der Aktinpolymerase *vasodilator stimulated phosphoprotein* (VASP) interagiert und diese über die E3-Ligaseaktivität der RING Domäne des Proteins ubiquitiniert. Somit werden die Filopodien der Wachstumskegel während der Wendung von Axonen stabilisiert (Menon S 2015).

TRIM9 konnte außerdem in Lewy-Körperchen sowohl bei Lewy-Körper-Demenz (DLB) als auch bei Parkinson-Demenz nachgewiesen werden und ist bei neurodegenerativen

Erkrankungen wie DLB oder der Tollwutkrankung in reduziertem Maße vorhanden (Henderson-Smith A 2016).

Über die Rolle von TRIM9 in Immunantworten und Signalwegen des Immunsystems ist ebenfalls Vorwissen aus bereits erschienenen Veröffentlichungen vorhanden. TRIM9 wurde im Zebrafischmodell nach Stimulation mit Liganden für TLRs in Makrophagen vermehrt exprimiert und als ein Modulator der Chemotaxis von Makrophagen beschrieben (Tokarz DA 2016). In humanen Immunzellen zeigte TRIM9 eine hohe Expression in CD4+ Zellen, vor allem in nicht-stimulierten Interleukin-10 positiven (IL-10) regulatorischen T-Zellen (T-regs), und Th2 Zellen, die auch nach T-Zell-Rezeptor getriggelter Aktivierung keine weitere Hochregulierung aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Expression des TRIM9 Gens nicht von den durch T-Zellaktivierung induzierten Zytokinen abhängt. Eine Expression von TRIM9 in Makrophagen oder dendritischen Zellen wurde jedoch in dieser Studie nicht gesehen (Rajsbaum R 2008). Es sind zudem Unterschiede zwischen der Expression in humanen und murinen Makrophagen und Lymphozyten beschrieben. Während TRIM9 und TRIM54 in unbehandelten humanen Makrophagen und mit Typ-II-Interferon behandelten Lymphozyten in geringer Menge nachgewiesen werden konnten und eine Induktion in humanen Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen nach *Fc receptor for IgG* (FcγR) vermittelter Stimulation mit Immunkomplexen beschrieben wurde, zeigte sich eine hohe Expressionsrate in murinen T-Zellen, dort hingegen kaum Expression in Makrophagen oder dendritischen Zellen (Carthagena L 2009).

Neben den TRIM Proteinen 5, 50, 66 und 67, wurde TRIM9 als positiver Regulator des *Interferon Stimulated Response Element* (ISRE) Promotors beschrieben, der auch in Abwesenheit eines induzierenden Stimulus eine Antwort der angeborenen Immunität hervorruft (Versteeg GA 2013).

Eine weitere Verbindung zwischen TRIM9 und Signalwegen der angeborenen Immunität ist die negative regulatorische Aktivität des Proteins auf den NF-κB Signalweg. Wie in Abbildung 3 dargestellt, wird *beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase* (β-TrCP) durch Interaktion des *degron motif* von TRIM9 mit der *WD40 repeat region* von β-TrCP daran gehindert weitere Substrate zu binden, sodass der *Inhibitor of NF-κBα* (IκBα) und der Vorläufer p100 nicht durch das Proteasom abgebaut, sondern stabilisiert werden. Somit wird die Induktion von NF-κB inhibiert (Shi M 2014).

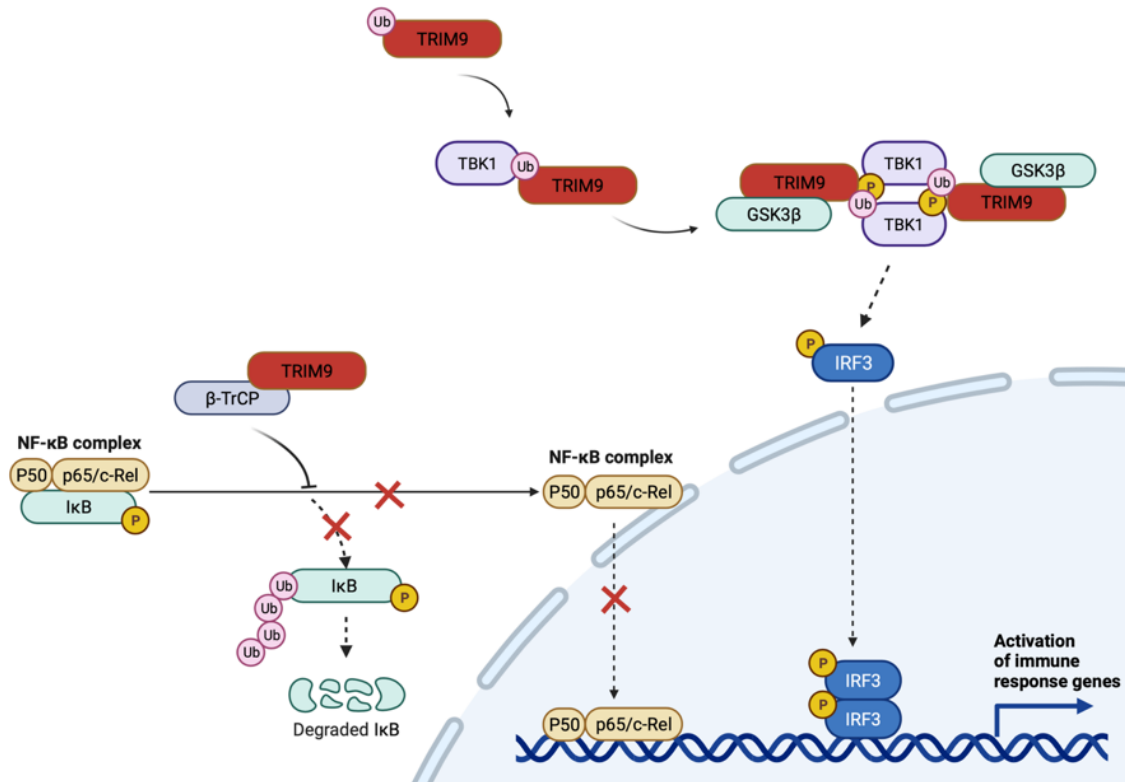


Abbildung 3: Effekt von TRIM9 auf den IRF3 und NF-κB Signalweg (modifiziert nach: (Qin Y 2016, Shi M 2014))

Weiterhin ist es bedeutsam, zwischen den zwei in Abbildung 2 dargestellten Isoformen von TRIM9 zu unterscheiden; eine lange Isoform und eine kurze Isoform, die in ihrer Struktur bis auf das Fehlen der PRY/SPRY Domäne mit der langen Isoform übereinstimmt. Bei Vorhandensein beider Isoformen wird dies im Folgenden als TRIM9 *both isoform* (TRIM9B) bezeichnet. Beide Isoformen wurden als antiviral aktiv beschrieben, wobei der antiviralen Funktion von *TRIM9 short isoform* (TRIM9s) besondere Bedeutung zugesprochen wird, da diese nach Infektion mit *negative-sense single-stranded RNA* ((-)ssRNA)-Viren die Bindung von *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK3β) und TBK1 fördert, um die Oligomerisation von TBK1 zu bewirken. Für diese Interaktion zwischen TRIM9s und TBK1 soll eine Polyubiquitinierung von TRIM9s durch K63-Bindungen erforderlich sein. Dies soll die Voraussetzung für eine Aktivierung von IRF3 darstellen und somit zu einer verstärkten antiviralen Immunantwort über Produktion von Interferon-beta (IFN-β) führen. In der Primärliteratur wird also eine immunregulatorische Rolle von TRIM9 propagiert, die abhängig von einer spezifischen Konzentration des Proteins bzw. seiner Isoformen entweder über vermehrte NF-κB Inhibition zu einer Hemmung von IFN-β und inflammatorischen Zytokinen und damit einer proviralen Immunantwort oder über eine Hochregulation der IRF3 vermittelten IFN-β Signalkaskade zu einer antiviralen Immunantwort führt. TRIM9s soll also die

Balance zwischen NF- κ B abhängiger proinflammatorischer Immunantwort und antiinflammatorischer IRF3 gekoppelter Typ-I-IFN Antwort halten (Qin Y 2016).

Eine zusätzliche Bedeutung könnte TRIM9 in der Diagnostik von Brustkrebs zukommen. Für das Protein konnte eine spezifische Methylierung in Brustkrebsgewebe nachgewiesen werden. In der klinisch-pathologischen Analyse von TRIM9-methylierten Tumoren der Brust, konnte gezeigt werden, dass TRIM9 in Zukunft als potentieller neuer Brustkrebs-spezifischer Marker eingesetzt werden könnte (Mishima C 2015).

1.2.3 Erkenntnisse über TRIM9 aus Vorarbeiten der AG Rothenfußer

Unsere Kooperationspartner aus dem Institut für Virologie der Technischen Universität München, unter Leitung von Frau Prof. Protzer, konnten in einer genomweiten *single nucleotide polymorphisms* (SNP) Analyse von mit Hepatitis-C-Virus infizierten Patienten mehrere SNPs im TRIM9-Gen identifizieren, darunter an Basenposition 1379 der *three prime untranslated region* (3' UTR) des Proteins (PubMed Reference rs12879906), die mit einer veränderten Ausheilungs- und Chronifizierungsrate der Virusinfektion in Verbindung gebracht werden konnten. Als Versuchskohorte diente dabei ein Kollektiv von 261 HCV infizierten Patienten der deutschen HCV-(1b)-Anti-D-Kohorte, deren Ursprung auf eine iatrogene HCV Infektion im Rahmen der Anti-D-Immunitätsprophylaxe in den Jahren 1978 und 1979 in der DDR zurückzuführen ist. In Bezug auf Alter, Geschlecht und Infektionsdosis ist die Kohorte somit in sich kohärent und konnte so zahlreichen prospektiven Studien als Studienkohorte dienen (Wiese, et al. 2014). Durch Gensequenzierung dieses Kollektivs von 261 HCV infizierten Patienten, konnten genetische Einflüsse auf die Rate der HCV-Chronifizierung analysiert werden. Es zeigte sich eine Ausheilungsrate von 26,8 % und somit eine Chronifizierungsrate von 73,2 %, die mit der in der Literatur beschriebenen Chronifizierungsrate von HCV Infektionen übereinstimmt. In Bezug auf den SNP rs12879906 in der TRIM9-3' UTR zeigten Homozygote für das SNP-Allel Guanosin-Cytidin (G-C) die höchste Chronifizierungsrate mit 77,6 % der HCV-Infektionen (Abb. 4). In der heterozygoten Patientengruppe zeigte sich jedoch mit lediglich 42,0 % eine deutlich geringere Chronifizierungsrate, sodass, unter Vernachlässigung wegen geringer Fallzahl der Patienten mit dem homozygotem Nachweis des SNP-Allels Adenosin-Thymin (A-T), die These aufgestellt wurde, dass die im Rahmen der SNP beschriebene Basenpaarung A-T mit einer gesteigerten Spontanausheilungsrate assoziiert werden kann (Rückel 2018).

Einleitung

rs12879906	Chronifizierung (n)	Spontanausheilung (n)	Ausheilungsrate (%)
Homozygot „A-T“			
n = 7	5	2	28,5
Heterozygot			
n = 31	13	18	58
Homozygot „G-C“			
n = 223	173	50	22,4
Summe			
n = 261	191	70	26,8

Abbildung 4: Zusammenhang des Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in TRIM9 3'UTR mit der Chronifizierungsrate von Hepatitis C Virus Infektionen. Die Abbildung zeigt die Verteilung des SNP im untersuchten HCV Kollektiv. Hierbei wird zwischen Patienten mit chronischer Hepatitis und Spontanausheilern unterschieden.

Mit diesem Vorwissen wurde der Effekt dieses 3'UTR SNP auf die Expression der TRIM9 messenger RNA (mRNA) weiter getestet. In Arbeiten von J. Rückel und J. Tossounidis wurde dafür ein Luciferase Reporter Assay verwendet, bei dem die zwei durch den SNP kodierten Varianten der 3' UTR von TRIM9 hinter die kodierende Sequenz der Gaussia Luciferase kloniert wurden, um deren Auswirkung auf die TRIM9-Expression zu untersuchen (Rückel 2018, Tossounidis 2022). So konnte gezeigt werden, dass das A-T-Allel am SNP rs12879906 im Vergleich zum G-C-Allel zu einer höheren Expression des Reporters führt (Abb. 5) und daher angenommen werden kann, dass das A-T-Allel dieses SNPs zu einer gesteigerten Expression von TRIM9 führt (Rückel 2018).

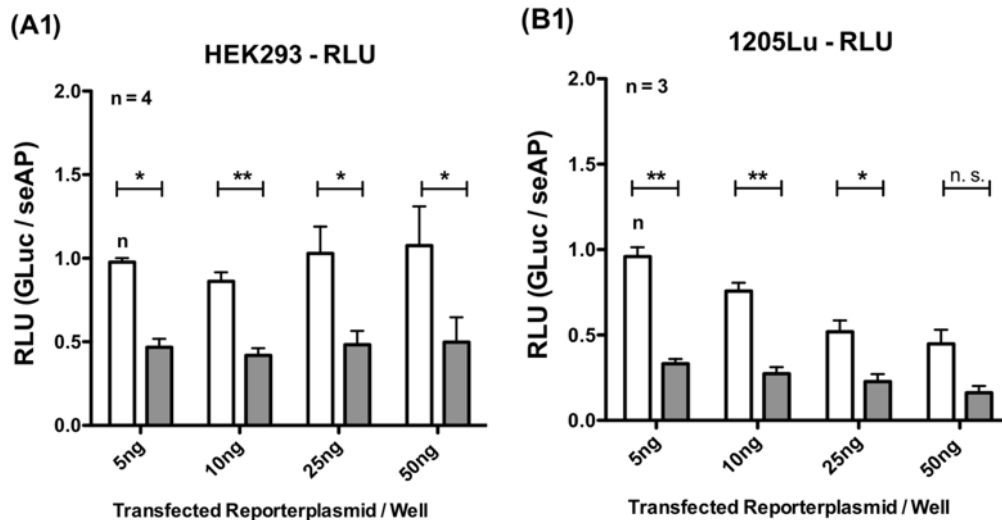


Abbildung 5: Das AT-Allel des Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in der TRIM9 3'UTR führt zu einer gesteigerten Proteinexpression.

HEK Zellen (A1) und 1205Lu Zellen (B1) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Luciferase-Reporterplasmids transfiziert, bei dem die 3'UTR von TRIM9 entweder mit dem A/T-Allel (weiß) oder dem G/C-Allel (grau) des SNPs rs12879906 hinter die kodierende Sequenz einer Gaussia Luciferase (GLuc) kloniert wurde. Die verwendeten Plasmide enthalten zusätzlich zu dem durch einen SV40 Promoter angetriebenen GLuc Konstrukt, das Varianten der TRIM9 UTR kodiert zur Transfektionskontrolle noch eine Expressionskassette mit einer immer gleich exprimierten sekretorischen alkalischen Phosphatase (seAP) unter einem CMV-Promoter. Die Daten sind als *relative light units* (RLU) dargestellt für die die gemessene Aktivität der Gluc durch die seAP Aktivität geteilt wird. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM von n=4. Identifikation der Signifikanzniveaus mittels t-Test (*= p<0.05, **= p<0.01) (Rückel 2018).

Der zuvor beschriebene negativ regulatorische Effekt von TRIM9 auf die Aktivierung von NF-κB (Shi M 2014) ließ sich durch Arbeiten der AG Rothenfußer nach erfolgreicher Etablierung von TRIM9-Knockout (KO) Zelllinien bestätigen. Nach Stimulation von 1205Lu Wildtypzellen (WT) und KO Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), welches eine Hochregulation von NF-κB über Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) bewirkt, konnte ein deutlicher Anstieg der NF-κB Antwort in verschiedenen 1205Lu TRIM9 KOs gemessen werden. In Abbildung 6 A ist zu erkennen, dass die transiente Überexpression von TRIM9 (0/ 20/ 60 ng) eine dosisabhängige Abnahme der NF-κB Aktivität bewirkt. In Abb. 6 B1 zeigen vier der fünf getesteten KO Klone eine gesteigerte NF-κB Aktivierung im Vergleich zum verwendeten WT. Die Verwendung eines Reporterplasmids mit einer höheren Anzahl an NF-κB Bindungsstellen (6x statt 3x) verdeutlicht diese Steigerung der NF-κB Antwort (Abb. 6 B2). Insgesamt suggeriert dies eine provirale Rolle des Proteins TRIM9.

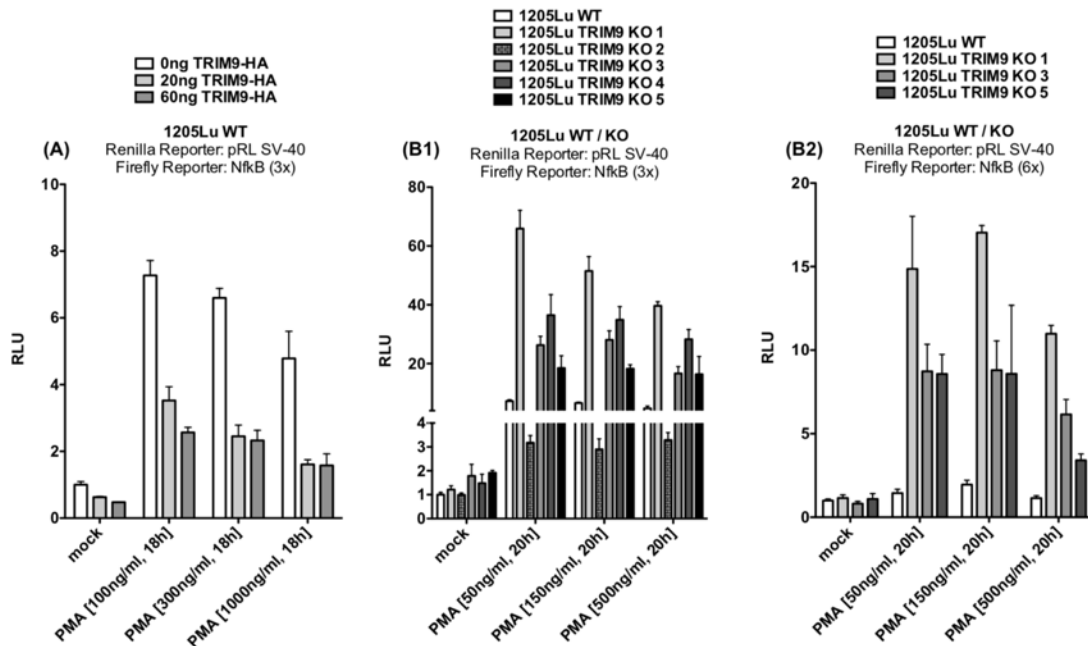


Abbildung 6: TRIM9 hat einen negativ regulatorischen Effekt auf die NF-κB Signaltransduktion in 1205Lu Zellen.

(A) 1205Lu WT Zellen wurden mit verschiedenen Mengen TRIM9-human influenza hemagglutinin (TRIM9-HA) – 0/ 20/ 60 ng – transfiziert. Die Zellen wurden dann mit einem NF-κB Luciferase Reporterplasmid transfiziert und für 18 Stunden mit verschiedenen Mengen PMA stimuliert. Ein Renilla Kontrollplasmid diente der Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die NF-κB Aktivität wird als Anstieg der Lumineszenz und Zunahme der RLU gemessen. (B1/2) 1205Lu WT und TRIM9-KO Zellen werden mit NF-κB Luciferase Reporterplasmid (mit unterschiedlicher Anzahl (3x und 6x) an NF-κB Bindungsstellen) und einem Renilla Kontrollplasmid transfiziert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen PMA für 20 Stunden stimuliert und die NF-κB Aktivität im Sinne eines Anstiegs der Lumineszenz und somit der Zunahme der RLU gemessen (Rüchel 2018).

In weiteren Vorversuchen zur Rolle von TRIM9 in Virusinfektionen zeigte das Fehlen von TRIM9 je nach Polarität der verwendeten einzelsträngigen RNA Viren einen unterschiedlichen Phänotyp (Abb. 7). Nach Infektion mit sowohl (-)ssRNA Viren wie *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) als auch (+)ssRNA Viren wie *Yellow Fever Virus 17D* (YFV) zeigten 1205Lu WT Zellen im Vergleich zu TRIM9-KO Zellen eine vermehrte Infektion in Virus quantifizierenden Assays wie dem *Tissue Culture Infection Dose 50 Assay* (TCID50). In Bezug auf die induzierte Zytokinantwort in beiden Infektionsanalysen wurde jedoch ein Unterschied deutlich. Nach Infektion mit (-)ssRNA Virus VSV wurde eine verminderte *IFN γ -induced protein 10* (IP-10) Menge in Abwesenheit von TRIM9 gemessen (Abb. 7 A2), während nach Infektion mit dem (+)ssRNA Virus YFV ein signifikanter Anstieg der IP-10 Level in TRIM9-KOs nachgewiesen wurde (Abb. 7 B2). Dies indiziert, dass TRIM9 zwei unterschiedliche Rollen während Infektionen mit ssRNA Viren unterschiedlicher Polarität einnehmen könnte.

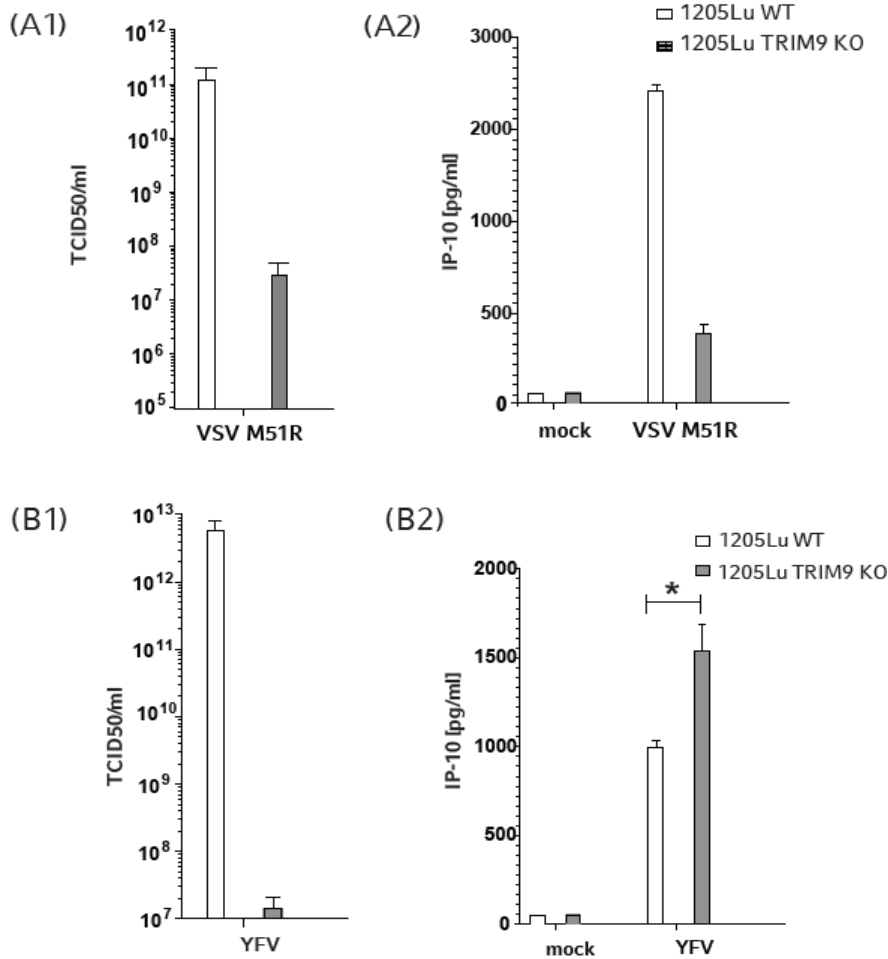


Abbildung 7: Abwesenheit von TRIM9 inhibiert die virale Replikation.

1205Lu WT und TRIM9-KO Zellen wurden mit (A) dem (-)ssRNA Virus VSV-M51R (MOI=0.1) und (B) dem (+)ssRNA Virus YFV (MOI=25) infiziert. (A1/B1) Die viralen Überstände wurden mittels TCID50-Assay 24 Stunden nach VSV-M51R und 72 Stunden nach YFV Infektion quantifiziert. (A2/B2). Die Immunantwort wurde anhand des mittels ELISA im Überstand gemessenen Zytokins IP-10 quantifiziert. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem Student t-Test für den markierten Vergleich bestimmt; * $p < 0.05$ (Rückel 2018).

1.3 Hypothese und Fragestellung

In den Vorarbeiten der AG Rothenfuß hat sich über die Charakterisierung TRIM9-defizienter humaner Zelllinien eine eher provirale Funktion von TRIM9 in Signalwegen der angeborenen Immunität herauskristallisiert.

In Bezug auf eine Infektion mit HCV kann bisher nur spekuliert werden, wie die epidemiologischen Daten zur SNP-Verteilung bei Patienten mit chronischem Verlauf versus spontaner Ausheilung, die Daten zur Auswirkung der SNP-Allele auf die TRIM9-Expression und die funktionellen Daten zu TRIM9 bei Infektion mit positiv-Strangviren in *loss of function* Modellen zusammenhängen. Eine gesteigerte Expressionsrate von TRIM9, wie sie aufgrund der Stabilisierung der mRNA durch das rs12879906 SNP Allel

A-T zu erwarten wäre, könnte nach viralem Kontakt initial zu einer vermehrten Viruslast führen. Das dadurch schneller und heftiger initial aktivierte Immunsystem mag dazu führen, dass die stärkere Immunantwort eher zu einer kompletten Ausheilung führt. Bei Patienten mit dem G-C Allel hingegen könnte die initial geringere Viruslast und dadurch bedingt das weniger stark aktivierte Immunsystem, das dann aber nicht in der Lage ist das Virus komplett zu eradizieren, zu einer chronischen Infektion führen.

Die Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe, bisher teils widersprüchliche Berichte in der Literatur und das Vorkommen von TRIM9 in einer langen und kurzen Isoform lassen jedoch einige Fragen offen. Im Rahmen dieser Dissertation soll folgenden spezifischen Fragen nachgegangen werden:

- Wird TRIM9 außerhalb von neuronalem Gewebe auch in humanem Lebergewebe und humanen Monozyten wirklich exprimiert?
- In welcher Richtung beeinflusst das Fehlen von TRIM9 die Replikation von (+)ssRNA und (-)ssRNA Viren? Nimmt TRIM9 unterschiedliche Funktionen bei Infektion mit (-)ssRNA und (+)ssRNA Viren ein?
- Bedarf es sowohl der langen und der kurzen Isoform von TRIM9 um die Virusreplikation zu beeinflussen oder reicht hierfür eine der beiden Isoformen aus?
- Gibt es Unterschiede im Expressionsmuster der intrazellulären Lokalisation und der Proteinstabilität zwischen der langen und der kurzen Isoform von TRIM9.

Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte und Allgemeine Verbrauchsmittel

2.1.1.1 Geräte

<i>Alpha Imager</i>	Alpha Innotech, San Leandro (USA)
Autoklav Varioklav 500EHP	Medizintechnik, München (D)
CO ₂ Inkubator BD 6220	Heraeus Instruments, Hanau (D)
Dampfsterilisator Varioklav	HP Medizintechnik GmbH, Großhadern (D)
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Durchflusszytometer FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Eismaschine	Manitowoc, Manitowoc (USA)
Fluoreszenzmikroskop Axio Vert.A1	Zeiss, Oberkochen (D)
Heizblock 5436	Eppendorf, Hamburg (D)
Heraeus Multifuge 3L-R	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Image Reader LAS-4000</i>	Fujifilm, Minato (Japan)
Konfokales Mikroskop Leica TCS SP5	Leica, Wetzlar (D)
<i>Laminar Air Flow</i> Werkbank HB 2472 S	Heraeus, Hanau (D)
Lichtmikroskop Axio Vert.A1	Zeiss, Oberkochen (D)
<i>Light Cycler 480 II</i>	Roche, Basel (CH)
<i>Mithras LB940 Microplate Reader</i>	Berthold Technologies, Bad Wildbad (D)
<i>NanoDrop 2000c Spectrophotometer</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Neubauer-Zählkammer	Brand, Berlin (D)
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim (D)
Spannungsquelle PowerPac Basic/ PAC200	Biorad, Hercules (USA)
<i>Thermo Cycler T3</i>	Biometra, Göttingen (D)

<i>Thermomixer compact/comfort</i>	Eppendorf, Hamburg (D)
<i>Thermoshake</i>	Gerhardt, Königswinter (D)
UV Transilluminator	LKB Bromma (SWE)
Vortexer	Scientific Industries, New York (USA)
Waage	Sartorius Industries, Göttingen (D)
Wärmeschrank B290	Heraeus, Hanau (D)
Wasser-Inkubationsbad	GFL, Burgwedel (D)
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg (D)
Zentrifuge gefühlt 5415R	Eppendorf, Hamburg (D)

2.1.1.2 Gebrauchs- und Verbrauchsmaterialien

96-Well-Platten (ELISA)	Costar Corning, New York
96-Well-Platten (Zellkultur)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Kryoröhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen (D)
Nylon- Filter (100 μ m, 30 μ m)	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach (D)
Perfusionsspritzen-Luer-Lok™Tip (50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Petrischalen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Pipetboy	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt (D)
Pipetten	Eppendorf, Hamburg (D)
<i>Polypropylene round bottom tube</i>	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Spritzen (2 ml, 10 ml, 50 ml)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ (USA)
Zellkulturflaschen	Costar Corning, New York (USA)

2.1.2 Extraktions- und Analysekits

BD OptEIA ELISA Substrat	BD Biosciences, Heidelberg (D)
<i>DC™ Protein Assay</i>	Biorad, Hercules (USA)

<i>GeneJet Plasmid Miniprep Kit</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Humanes IP-10 ELISA Kit</i>	BD Biosciences, Heidelberg (D)
<i>NucleoBond Xtra Midi Plus</i>	Macherey-Nagel, Düren (D)
<i>peqGold Gel Extraction Kit</i>	Peqlab, Erlangen (D)
<i>QIAquick® PCR Purification Kit</i>	Qiagen, Hilden (D)
<i>QIAGEN® Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen, Hilden (D)
<i>QuickExtract™ DNA Extraction Solution</i>	Fa. Epicentre, Madison (USA)
<i>MACS Cell Separation Kit</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)

2.1.3 Chemikalien

Agarose-Gelelektrophorese

LE-Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (D)
<i>OGene Ruler DNA Ladder Mix</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>SERVA DNA Stain Clear G</i>	SERVA, Heidelberg (D)
<i>6x DNA Loading Dye</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)

Dualer Luciferase-Assay

Acetyl-Coenzym A – Trilithiumsalz	AppliChem, Gatersleben (D)
ATP	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Coelenterazin	Promega, Madison (USA)
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
EDTA, pH 8.0	USB Corporation, Cleveland (USA)
Luciferin	Biosynth AG, Staad (CH)
Magnesiumcarbonathydroxid	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe (D)
<i>Passive Lysis Buffer 5x</i>	Promega, Madison (USA)

Enzyme

Alkalische Phosphatase	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Phusion High-Fidelity Polymerase</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit</i>	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym MluI	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym PacI	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym HindIII	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym XhoI	New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym BamHI	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Taq Polymerase</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Trypsin 10x	Lonza, Basel (CH)
<i>T4 DNA Ligase</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>T7 Endonuclease I</i>	New England Biolabs, Ipswich (USA)
<i>Fast-Link DNA Ligase</i>	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf (D)

Enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA)

Fetales Kälberserum	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
Natriumcarbonat Na ₂ CO ₃	Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumhydroxid NaOH	Roth, Karlsruhe (D)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel (CH)
Schwefelsäure	Klinikapotheke, München (D)
Substrat (Tetramethylbenzidin/ Hydrogenperoxid)	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Tween-20	Roth, Karlsruhe (D)

Transfektionsreagenzien

<i>GeneJuice</i>	Merck Novagen, Darmstadt (D)
<i>Lipofectamine 2000</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>Opti-MEM</i>	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
<i>RNAiMax</i>	Invitrogen, Carlsbad (USA)
<i>TransIT-X2</i>	Mirus, Madison (USA)
<i>Western Blot</i>	
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)
Natriumchlorid	
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumorthovanadat Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>Protease Inhibitor Cocktail P8340</i>	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Substrate</i>	
<i>SuperSignal West Femto Sensitivity</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)
<i>Substrate</i>	
Tetramethylethyldiamin	Roth, Karlsruhe (D)
Tromethamin (TRIS)	Roth, Karlsruhe (D)
Transfermembran, Porengröße 45 µm	Merck, Darmstadt (D)
Tween-20	Roth, Karlsruhe (D)

Zellkultur

Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe (D)
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Lonza, Basel (CH)
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
L-Glutamin	Lonza, Basel (CH)
Natriumchloridlösung (0,9 %)	B.Braun, Melsungen (D)
Penicillin Streptomycin	Lonza, Basel (CH)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel (CH)
<i>Tet System Approved FBS</i>	Clontech Takara Bioscience, Shiga (JPN)
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin 10x	Lonza, Basel (CH)
Tryptose-Phosphat- <i>Broth</i> -Lösung (29,5 g/l)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

Sonstiges

Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>Biocoll Separating Solution</i> 1,077 g/ml	Biochrom GmbH, Berlin (D)
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth, Karlsruhe (D)
<i>CD14 MicroBeads, human</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach (D)
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe (D)
Heparin-Natrium (25.000 I.E.)	Ratiopharm, Ulm (D)
Hoechst33342 200 µg/ml	ImmunoChemistry, Bloomington (USA)
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe (D)
LB-Medium/ LB-Agar	Roth, Karlsruhe (D)
Magnesiumchlorid	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Manganchlorid-Tetrahydrat	Roth, Karlsruhe (D)

PIPES	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<i>Phos-tagTM Acrylamide</i>	Wako Chemical Industries, Osaka (JPN)
<i>10x Taq Buffer</i>	Thermo Scientific, Waltham (USA)

2.1.4 Puffer und Medien

Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (50x):

242,3 g/l TRIS

17,51 Vol.% Essigsäure

18,61 g/l EDTA-2Na-2H₂O (Titriplex III)

in Wasser

Bakterienkultur

LB-Medium:

10 g/mol Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

in Wasser

LB-Selektionsmedium:

LB-Medium

100 mg/l Ampicillin

Inoue Transformations Puffer:

55 mM Manganchlorid-Tetrahydrat

15 mM Calciumchlorid-Dihydrat

250 mM KCl

10 mM PIPES (0.5 M, pH 6,7)

in Wasser

Enzyme-linked immunoabsorbent assay

Assay Diluent:

10 Vol.% FCS

in PBS

Waschpuffer:

0,05 Vol.% Tween-20

in PBS

Coating Puffer (pH 9,5):

0,1 M Natriumcarbonat

in Wasser

Luciferase Assay:

Firefly-Luciferase Substrat:

20 mM Tricine

2,67 mM Magnesiumsulfat-Heptahydrat

0,1 mM EDTA, pH 8,0

33,3 mM Dithiothreitol

0,53 mM ATP

270 µM Acetyl-Coenzym A

131,6 µg/ml Luciferin

5 mM Natriumhydroxid

0,265 mM Magnesiumcarbonathydroxid

in Wasser

Western Blot

Laufpuffer (1x):

192 mM Glycin

25 mM TRIS

3,47 mM Natriumlaurylsulfat

in Wasser

Transferpuffer (1x):

100 mM Glycin

10 mM TRIS

20 Vol.% Methanol

in Wasser

TBST (1x, pH 7,6):

50 mM TRIS

150 mM Natriumchlorid

0,1 Vol.% Tween-20

in Wasser

Resolving Gel Puffer (4x, pH 8,8):

1,5 M TRIS

13,87 mM Natriumlaurylsulfat

in Wasser*filtriert

Porengröße 0,45 µm

Stacking Gel Puffer (4x, pH 6,6):

250 mM TRIS

13,87 mM Natriumlaurylsulfat

in Wasser filtriert (0,45 µm)

RIPA Zellysepuffer:

150 mM Natriumchlorid

25 mM TRIS-HCL

Proteaseinhibitor P8340, 1:100

2 mM Na₃VO₄

0.1 Vol.% SDS in Wasser

Lämmli Puffer (6x):

1,2 g SDS

2 mg Bromphenolblau

4,7 ml Glycerol

4,2 ml von 0,5 M TRIS (pH 6,8)

0,93 g Dithiothreitol

4,1 ml Wasser

Blocking Puffer:

5 Vol.% Milchpulver

in TBST

Zellkultur

DMEM Vollmedium:

10 Vol.% FCS

10 mM L-Glutamin

10 mg/l Ciprofloxacin

in DMEM

BHK Medium:

10 Vol.% FCS

10 mM L-Glutamin

10 mg/l Ciprofloxacin

0.1 Vol.% Tryptosephosphat-Lösung

in DMEM

2.1.5 Antikörper

TRIM9 polyklonal, Hase	Proteintech, Chicago (USA)
TRIM9 polyklonal, Maus	Novus Biologicals, Littleton (USA)
β -TrcP monoklonal, Hase	Cell Signalling Technology, Danvers (USA)
SINTBAD monoklonal, Hase	Cell Signalling Technology, Danvers (USA)
TBK1 polyklonal, Hase	eBioscience, San Diego (USA)
Phospho-Tyrosine monoklonal, Maus	Cell Signalling Technology, Danvers (USA)
IRF3 monoklonal, Maus	BD Bioscience, Heidelberg (D)
IRF3 monoklonal, Hase	Cell Signalling Technology, Danvers (USA)
Phospho-IRF3, monoklonal, Hase	Cell Signalling Technology, Danvers (USA)
GAPDH monoklonal, Maus	Merck Millipore, Darmstadt (D)
β -Aktin-HRP monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
2° Maus Fc(IgG)-HRP monoklonal, Ziege	Biorad, Hercules (USA)
2° Hase Fc(IgG)-HRP, Ziege	Biorad, Hercules (USA)

2.1.6 PCR-Primer

Sequenzierungs Primer pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-mCherry

rev GCT TTC AAG TCC CTG TTC GG (5' → 3')

fwd CAG CAT CTG TTG CAA CTC ACA

rev ATC CAG GTC GTG TGA TTC CAA

fwd GGC ATT CTG CAC GCT TCA A

fwd CGC TTT CCC CCT CCC TAT TG

fwd GAA GGA AGG TCC GCT GGA TTG

fwd ATA TCA GAG AGT GAG AGG CCT TG

fwd TGA AGT GGT GGC CTA ACT ACG

rev GCG TCA GAC CCC GTA GAA AA

fwd CAC CAG CGT TTC TGG GTG AG

rev ACA TTT CCG TGT CGC CCT TAT

Einfügen von MCS hinter TRIM9 in pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9

fwd TACATGTTAATTAACATATGGAATTCTACCGGGTAGGG

rev CAGATCTAGACGCGTGATCAGGCTATTGATGCTCTGCTG

Amplifikation von mCherry

fwd CAGAGCATCAATAGCCCGGCG

rev CTACCCGGTAGAATTCTTACTTGTACAGCT

Einfügen von mCherry in MCS hinter TRIM9 in pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS

fwd AAT TAC GCG TAT GGT GAG CAA GG

rev CCT TAA TTA ACT ACT TGT ACA GCT CG

Genotypisierung von WT und TRIM9-KO Mäusen

CTTCTGAGGGTTGGAGAAAAGC

CGTGAGAGCTGCTTTCTTATTGC

CGACGGTATCGATAAAGCTAGCTTGG

Deletion der einzelnen TRIM9 Domänen

RING fwd CTGGTGCAGACCCAG

rev CAACTCCTCTTCCATCTCCTC

B1 fwd GCCCAGGGTCGTGTGAG

rev TTTGCTCTGCTGGTAGCGG

B2 fwd GGGGCCATGTGGAAACTAC

rev TGGGCTCAGCCTCCG

COS fwd AAAGCTTCCTCTCCAGTC

rev CACCTCCAAGCAGTACTC

FN3 fwd TTCGACCCTGGCTCGG

rev GGTGCTGGGACTGGAGAG

SPRY fwd TTTATCAACGATGAACAACAAGG

rev AGCAAACCAGGCCACC

2.1.7 Plasmide

Expressionsplasmide

pLVX-Tet-On Advanced, Amp.-Resistenz

PLVX-Tight-Puro-MCS, Amp.-Resistenz

VSV-G *Envelope* Vektor

dR8.9 *Packaging Plasmid* (gag/pol)

GFP-TRIM9 (n-term.Tag), pcDNA3x(+)MyEGFP, EcoRI, XhoI, Amp.-Resistenz

HA-TRIM9 (n-term.Tag), pcDNA3x(+)HA, EcoRI, XhoI, Amp.-Resistenz

mCherry, pcDNATM5/FRT/TO, Amp.-Resistenz

TRIM9-HA (c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

TRIM9s-HA (c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

TRIM9sdel-HA (c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

MCS-TRIM9-HA (n-term. und c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

mCherry-TRIM9-HA (n-term. und c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

mCherry-TRIM9s-HA (n-term. und c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

mCherry-TRIM9sdel-HA (n-term. und c-term. Tag), pLVX-Tight-Puro, Amp.-Resistenz

eSpCas9(1.1)-2a-Puro, eSpCas9, Puromycin Resistenz

Reporterplasmide

ISRE-Promoter, *FireFly Luciferase*, pGL4.45[*luc2P*/ISRE/Hygro]

3 multim. PRDII Domänen des IFN β -Promoters (Nf κ B 3x), FireFly, p55A2/ pBLCAT2

SV40, Renilla, pRL

2.1.8 siRNAs

Die siRNA wurden unter Verwendung des WI siRNA Selektionsprogramms (Yuan, et al. 2004) designt und anschließend von Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Als Kontroll RNA ohne Target im humanen Genom diente dabei CO4. Unten dargestellt sind die Sequenzen im Sense-Strang der Ziel-mRNA:

siCO4 GCGCUAUCCAGCUUACGUA

TRIM9 (#58) CUGGACAAGAUGAGCCUAU

TRIM9 (#95) CUGGACAAGAUGAGCCUAUUU

2.1.9 Stimulantien

rekombinant hergestellte Zytokine und Stimulantien:

Tumornekrosefaktor α , R&D Systems, Minneapolis (USA)

Phorbol-12-myristat-13-acetat, Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)

synthetische Rezeptorliganden:

hochmolekulares Polyinosin-Polycytosinsäure (p(I:C)), Invivogen

Triphosphat-RNA (Sequenz 5'→3':

GGCAUGCGACCUCUGUUUGAUCAAACAGAGGUCGCAUGCC)

CO4-siRNA (Verwendung als Kontrolle)

2.1.9 Viren

Vesicular Stomatitis Virus (VSV)

Indiana-Stamm, Wildtyp; (-)ssRNA; Rhabdoviridae, nicht-segmentiertes Genom.

Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München

Vesicular Stomatitis Virus M51R

VSV mit Met->Arg-Substitution an Position 51 des M-Proteins

Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München

Vesicular Stomatitis Virus p-GFP

VSV mit green fluorescent protein (GFP)-markierten P-Protein

Zur Verfügung gestellt von Oliver Ebert, Technische Universität München

Sendai Virus (SeV)

Cantell-Stamm; (-)ssRNA; Paramyxoviridae, nicht-segmentiertes Genom

Bezogen von Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA)

Semliki Forest Virus (SFV)

(+)ssRNA; Togaviridae, nicht-segmentiertes Genom

Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jovan Pavlovic, Institut für Medizinische Virologie, Universität Zürich, Schweiz

Encephalomyocarditis Virus (EMCV)

(+)ssRNA; Picornaviridae, nicht-segmentiertes Genom

Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. F.J.M. (Frank) van Kuppeveld Department Biomolecular Health Sciences & Infectious Diseases & Immunology Universität Utrecht

Mengovirus (C19A/C22A)*

(+)ssRNA, Picornaviridae

*Diese Mutante des Mengovirus erlaubt die Interferon-Produktion der infizierten Zellen durch C19A/C22A-Mutation im leader (L) Gen.

Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. F.J.M. van Kuppeveld, Department Biomolecular Health Sciences & Infectious Diseases & Immunology Universität Utrecht, Niederlande.

Gelbfieber Impfvirus 17D

Flaviviridae, (+)ssRNA

Zur Verfügung gestellt von Prof. Charles M. Rice, Rockefeller University, New York City, USA.

2.1.10 Zelllinien

- A549 human, Adenokarzinomzelllinie aus Lungenepithelzellen; adhärenz
bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
- BHK21 Nierenfibroblastzelllinie eines Babyhamsters (*Baby Hamster Kidney cell*);
adhärenz
bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
- HEK 293 human, embryonale Nierenzelllinie (*Human Embryonic Kidney cells*);
adhärenz
bezogen von American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, USA)
- Huh 7.5 human, hepatozelluläre Karzinomzelllinie
zur Verfügung gestellt von Prof. Protzer, TU München und Prof. Charles
M. Rice, Rockefeller University, New York City, USA
- 1205Lu human, Melanomzelllinie isoliert aus einer Lungenmetastase; adhärenz
zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Besch, Ludwig-Maximilians-
Universität München

2.1.11 Software

- | | |
|-----------------------|-------------------------------------|
| Adobe Creative Suite | Adobe Systems, San Jose, USA |
| EndNote X6 | Thomson Reuters, Carlsbad, USA |
| Flow Jo | Tree Star, Ashland, USA |
| GraphPad PRISM® | GraphPad Software, La Jolla, USA |
| Microsoft Office 2011 | Microsoft, Redmond, WA, USA |
| SnapGene | GSL Biotech LLC, San Diego, CA, USA |

2.2 Methoden

2.2.1 Zelluläre Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die Versuchszelllinien wurden in DMEM bzw. BHK21-Zellen in BHK-Medium im Brutschrank bei 37 °C Temperatur, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert und bis zu 90-prozentiger Konfluenz kultiviert. Bei Erreichen dieser Zelldichte wurden die Zellen trypsiniert und im Verhältnis 1:10 gesplittet. Es erfolgte eine Zugabe von frischem Medium. Die überschüssigen Zellen wurden verworfen. Eingefrorene Zelllinien wurden bei -80 °C in FCS inkl. 10 Vol.% DMSO gelagert. Die Arbeit mit den verschiedenen Zellen wurde unter Beachtung steriler Bedingungen an einer *Laminar Air Flow* Werkbank durchgeführt. Ausgezählt wurden die lebendigen Zellen nach Zugabe von Trypanblau mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Gewünschte Zellzahlen wurden dann in 6- bis 96-Well-Flachbodenplatten, bzw. in Zellkulturplatten mit 10 bzw. 14,5 cm Durchmesser für Versuche ausgesät.

2.2.1.2 Transfektion von Zellen

Für die Transfektion von DNA wurden je nach Zelltyp Lipofectamine 2000 (HEK293 Zellen), GeneJuice (1205Lu Zellen) oder TransIT-X2 (HEK293, 1205LU, A549 oder Huh7.5 Zellen) verwendet. Die Transfektion von RNA wurde mit Hilfe von RNAiMax ermöglicht.

Zellen wurden in 6, 24 oder 96-Well Formaten in entsprechender Menge an Kultiviermedium (200 µl im 96-Well Format/ 1 ml im 24-Well Format/ 2ml im 6-Well Format) ausgesät und für mindestens 8 Stunden inkubiert, um eine gewünschte Zelldichte von 70-90 % zum Zeitpunkt der Transfektion zu erreichen. In einem nächsten Schritt wurden das gewählte Transfektionsreagenz in einem Ansatz und parallel dazu die zu transfizierende DNA oder RNA in einem zweiten Ansatz mit gleichen Mengen *improved Minimal Essential Medium* (Opti-MEM) für mindestens 10 Minuten inkubiert, dann gemischt und nochmals 5 Minuten inkubiert. Die Verhältnisse von Transfektionsreagenz zu RNA/Menge wurden entsprechend den Angaben der jeweiligen Hersteller gewählt. Nach Zugabe des Reaktionsgemisches auf die adhärenenten Zellen wurden diese je nach experimentellem Ansatz für 1-3 Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen weiter analysiert.

2.2.1.3 Infektion von Zellen

Für die Infektion von Zellen wurden diese in unterschiedlich großen (10 oder 15 cm) Zellkulturschalen ausgesät und für mindestens 8 Stunden inkubiert, um eine Adhärenz der Zellen und eine Konfluenz von 70-90 % zu erzielen.

Die Virusmenge bei Infektion mit plaquebildenden Viren (VSV, YFV) richtete sich hierbei nach der zu infizierenden Zellzahl. Angegeben wurde diese in Form der Multiplizität der Infektion (MOI) (Barrangou R). Diese beschreibt das Verhältnis von plaquebildenden Einheiten (PFU) zur Zellzahl und nahm bei Infektions-Assays dieser Arbeit Werte zwischen 0,1 und 50 ein.

2.2.1.4 Isolation von humanen PBMCs und Monozyten

Für die Isolation von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMCs) wurde ein Dichtegradient mittels Biocoll (d = 1,077 g/ml) genutzt. Zunächst erfolgte die Entnahme von bis zu 150 ml Vollblut pro Proband. Die Blutentnahme erfolgte in 50 ml Spritzen, die zuvor mit 0,5 ml Heparin benetzt wurden. Für die Isolation der PBMCs wurden pro 10 ml Vollblut im nächsten Schritt in neuen 50 ml *Falcons* 10 ml PBS zugesetzt. Nach Vorlage von 10 ml Biocoll erfolgte die langsame Überschichtung mit dem 20 ml Blut/PBS-Gemisch. Danach wurde das Gemisch bei 1000 g bei 20 °C für 20 min (ohne Bremse) zentrifugiert. Der PBMC-Ring wurde möglichst vollständig abgenommen, in je ein ungebrauchtes *Falcon* pipettiert und auf 50 ml PBS aufgefüllt. Ein erneuter Zentrifugationsschritt wurde für 10 min bei 500 g und 20 °C unternommen. Der Überstand wurde verworfen, alle *Pellets* in einem *Falcon* vereinigt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Ein dritter Zentrifugationsschritt von 400 g und 10 min bei 4 °C erfolgte, bevor Monozyten mittels unterschiedlicher Zelladhärenz oder *MACS-Kit* extrahiert werden konnten.

Aus 30 ml Vollblut konnten 30-60 Millionen PBMCs extrahiert werden.

2.2.1.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western Blot

Um intrazelluläre Proteine sowohl qualitativ als auch quantitativ nachweisen zu können, wurden diese mittels Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) elektrophoretisch nach Größe bzw. Molekülmasse im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die im Gel enthaltenen

Proteine wurden dann auf eine Polyvinylidenfluoridmembran (PVD) übertragen und konnten durch Antikörperbindung detektiert werden.

Die Zugabe des anionischen Tensids SDS zum Gel bewirkt die Überdeckung der Eigenladungen der Proteine und deren konstant negative Ladung. Das Resultat ist die gegenseitige Abstoßung der Proteine. Nach Erhitzen der Proben auf 95 °C und damit einhergehender Denaturierung, liegen die Proteine in linearisierter Form vor und lassen sich so nach Kettenlänge auftrennen.

Die Proteinbanden können dann durch Anlegen eines senkrecht zum Polyacrylamidgel gerichteten elektrischen Feldes auf eine PVD-Membran übertragen werden. Hierbei wandern die an SDS-gekoppelten negativ geladenen Proteine in Richtung Anode.

Die Detektion der Proteine erfolgt später mittels Inkubation in Lösungen, die spezifische Antikörper beinhalten, welche gegen Epitope der Proteine gerichtet sind. Diese werden als Primärantikörper bezeichnet und können direkt an die Proteinbande auf der Membran binden. Weiterhin wird dann ein Sekundärantikörper-Konjugat verwendet, welches an den Primärantikörper bindet und durch Kopplung an Meerrettichperoxidase (HRP) nach Zugabe des Substratgemisches eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert, welche die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form bewirkt, sodass dementsprechend Lumineszenz detektiert werden kann. Es können auch Primärantikörper-Konjugate verwendet werden.

Protokoll:

Zunächst wurden die Zellen in RIPA Puffer auf Eis lysiert und anschließend die Proteinkonzentration mittels *Bradford-Assay* entsprechend Herstellerprotokoll ermittelt. Die Proteinkonzentrationen wurden angeglichen und auf ein Gesamtvolumen von 240 μ l mit ddH₂O gebracht, mit 6xLämmli-Puffer und 5 Vol.% β -Mercaptoethanol versetzt und anschließend bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bei einer Spannung von 100-150 V in einem 10-prozentigen Gel in Laufpuffer. Das Gel wurde danach auf eine in Methanol aktivierte Membran übertragen. Dabei wurde die Membran anodenseitig auf das Gel gelegt, beidseitig von in Transfer-Puffer getränkten Filterpapieren und Schwämmen umgeben und in einem Tank-Blotter zwischen die beiden Elektroden gespannt. Der Tank wurde mit Transfer-Puffer aufgefüllt und mit gefrorenen Falcons gekühlt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte unter Einstellung entweder einer konstanten Spannung von 110 V oder einer konstanten Stromstärke von 350 mA über 90 Minuten. Nach erfolgreicher Proteinübertragung wurde die Membran in 5-prozentiger

Milch beziehungsweise bovinem Serumalbumin (BSA) enthaltender *Tris-buffered saline with Tween20* Lösung (TBST) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren. Nachdem die Membran drei Mal in TBST gewaschen wurde, konnte diese bei 4 °C für mindestens acht Stunden in Primärantikörper in 5-prozentigem BSA, gelöst in 5 ml TBST, inkubiert werden. Die Membran wurde erneut drei Mal in TBST gewaschen, bevor sie für eine Stunde in Sekundärantikörper, welcher im Verhältnis 1:3000 (0,33 ng/ml) in 5 ml TBST inklusive 5-prozentigem Milchpulver gelöst war, inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen der Membran konnte diese nach Zugabe von Substrat entwickelt und eine Chemilumineszenzmessung vorgenommen werden. Als Kontrolle für die gleich geladenen Proteinmengen wurde die Membran zusätzlich mit einem Antikörper gegen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β -Aktin inkubiert.

2.2.1.6 Immunopräzipitation

Der Nachweis von Protein-Protein Interaktionen ist mittels Ko-Immunopräzipitation möglich. Durch Zugabe eines Antikörpers, der gegen ein Protein-(*Tag*) gerichtet ist, wird ein bestimmtes Protein samt seiner Interaktionspartner aus einem Proteingemisch heraus präzipitiert. Die Proteine können dann mit Hilfe eines Western Blots nachgewiesen werden.

Protokoll:

Nachdem Lysate der Zellen mit RIPA Puffer hergestellt wurden, wurde die Proteinkonzentration des jeweiligen Lysats mittels *Bradford-Assay* bestimmt. 1-5 mg des Proteingemisches wurden dann in einem Gesamtvolumen von 1 ml zunächst mit 30 μ l *A/G-Sepharose Beads* zum *Preclearing* inkubiert, um die Anzahl an nicht spezifischen Komponenten zu verringern. Anschließend wurden die *Beads* bei 10000 *rounds per minute* (rpm) für 30 Sekunden herunterzentrifugiert, zwei Minuten auf Eis stehen gelassen und der Überstand dann in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) überführt. Das Lysat wurde anschließend mit Primärantikörper, der gegen das zu analysierende Protein bzw. ein Protein-*Tag* desselben Proteins gerichtet ist, bei 4 °C inkubiert. Nach mindestens acht Stunden wurden 50 μ l *A/G Sepharose Beads* zum Lysat hinzugegeben und auf dem *End Over Roller* bei 4 °C für drei bis vier Stunden inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation und dreimaligem Waschen der *Pellets* mit RIPA Puffer, wurden die *Pellets* nach Zugabe von 6xLämmli Puffer mit 1:100 β -Mercaptoethanol versetzt und bei 95 °C für 5 Minuten aufgekocht. Das *Pellet* wurde vor Beladen des Gels

noch einmal herunterzentrifugiert. Fortgefahren wurde wie im Western Blot Protokoll aufgeführt.

2.2.1.7 ELISA

Dieses Antikörper-basierte Nachweisverfahren zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen beruht auf einer enzymatischen Farbreaktion. Es wurde in dieser Arbeit verwendet, um Zytokine, wie zum Beispiel IP-10 in Zellkulturüberständen nachzuweisen. Zunächst werden 96-Well Platten mit sog. *Coating*-Antikörper über Nacht inkubiert und dann für zwei Stunden mit *Reagent Diluent* geblockt. Nach Zugabe der zu untersuchenden Proben bindet das Antigen nach einer bestimmten Inkubationszeit an den *Coating*-Antikörper. Durch nachfolgende Waschschriffe wird garantiert, dass nur das zu untersuchende und an den Primärantikörper gebundene Antigen in den *Wells* verbleibt, ungebundene Anteile jedoch entfernt werden. Im nächsten Schritt wird zu diesem Komplex ein zweiter Antikörper, der *Detection*-Antikörper, hinzugegeben. Dieser bindet das zu untersuchende Antigen an einem anderen Epitop als der *Coating*-Antikörper und ist mit einem Reporterenzym verbunden. Die Platten werden erneut gewaschen und überschüssiger *Detection*-Antikörper entfernt. Nun kann durch Zugabe eines spezifischen Substrates durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemilumineszenz die Antigenkonzentration anhand einer Kalibrierungskurve bestimmt werden, die aus Messungen einer Standardreihe mit bekannter Antigenkonzentration resultiert.

Protokoll:

Die Standardreihe wurde durch Verdünnung eines rekombinanten Proteins in *Assay Diluent* hergestellt. Außerdem wurden die zu messenden Proben verdünnt, sodass die zu messenden Konzentrationen im Bereich der Standardkurve lagen. Zur Bestimmung der IP-10 Messwerte wurde das in 2.1.2 beschriebene Kit verwendet. Der einzige Unterschied zu den Herstellerangaben bestand in den verwendeten Volumina. Da spezifische ELISA-kompatible *half-Well* Platten verwendet wurden, konnte eine Volumenreduktion um 50 % pro *Well* erfolgen.

2.2.1.8 TCID₅₀ (*Tissue Culture Infective Dose*)

Dieser *Assay* zur Bestimmung von Virustitern beruht auf dem Prinzip der Endpunktverdünnung und ist nur bei Viren, die einen zytopathischen Effekt hervorrufen

möglich. Es wird dabei die Virusmenge quantifiziert, die in 50 % der untersuchten Zellen Letalität bewirkt. Virussensitive BHK21 Zellen werden dabei nach 5- bis 6-tägiger Inkubation in virushaltigem Überstand auf Zelltod untersucht und der TCID₅₀ Wert bestimmt.

Protokoll:

BHK21 Zellen wurden im 96-Well Format ausgesät mit einer Konzentration von 10.000 Zellen pro 180 µl BHK21-Kulturmedium pro Well. Die Zellen wurden für mindestens acht Stunden über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Anfertigung einer zwölf-stufigen Verdünnungsreihe der virushaltigen Zellüberstände, wobei jeweils mit acht Replikaten gearbeitet wurde. Als erste Verdünnung wurde 1×10^{-3} gewählt, die folgenden Verdünnungen wurden im Verhältnis 1:10 der vorhergehenden Verdünnung angefertigt und in einem Volumen von 20 µl BHK21-Kulturmedium zu den 180 µl BHK21 Zellen in BHK21-Kulturmedium zugegeben.

Nach fünf bis sechs Tagen Inkubation wurde lichtmikroskopisch die Verdünnung bestimmt, die noch zytopathische Effekte in 50 % der Zellen hervorruft. Diese Werte ermöglichten dann die Bestimmung der TCID₅₀ Werte der ursprünglichen Proben und somit die Viruskonzentrationsbestimmung im primär unverdünnten Zellüberstand. Die Auswertung erfolgte mittels frei zugänglicher Kalkulationstabelle von M. Binder der Universität Heidelberg, Abteilung für Molekulare Virologie (online: https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/fileadmin/inst_hygiene/.../TCID50.xls).

2.2.1.9 Dualer Luciferase Assay

Die Verwendung Dualer Luciferase-Assays ermöglicht eine Quantifizierung von transkriptionsfaktorvermittelten Promoteraktivitäten. Grundprinzip dieses Assays ist die Kotransfektion zweier verschiedener Reporterplasmide, die entweder für eine Luciferase kodieren, die unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters steht oder aber für eine Luciferase, deren Promoter-bedingte Expression abhängig ist von spezifischen Transkriptionsfaktoren. Das verwendete Kontrollplasmid kodiert für die *Renilla*-Luciferase und steht unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promoters, sodass es innerhalb des Luciferase-Assays als Transkriptionseffizienzkontrolle fungiert. Das kotransfizierte Reporterplasmid kodiert für die *Firefly*-Luciferase, unter Kontrolle einer transkriptionsfaktorsensitiven Promotersequenz. Die *Firefly*-Luciferase wird somit nur dann verstärkt synthetisiert, wenn ein Stimulus eine Transkriptionsfaktor-vermittelte Aktivierung initiiert. Zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Transfektion der

Reporterplasmide erfolgt die Lyse der Zellen. Nach Zugabe gleicher Volumina Substrat in zwei getrennten Reaktionsansätzen (*Renilla*-Substrat: Coelenterazin; *Firefly*-Substrat: Luciferin) erfolgt die Messung der Lumineszenzsignale, die es ermöglicht auf die Menge an Luciferase und somit auch Promoteraktivität zurückzuschließen. Die erhobenen Messwerte der *Firefly*-Luciferaseaktivität werden zur *Renilla*-Luciferaseaktivität normalisiert und dann als RLU (*relative light units*) dargestellt.

Protokoll:

Nach Ausplattieren von jeweils 25.000-30.000 Zellen pro *Well* (1205Lu/ HEK293) im 96-*Well* Format erfolgte am folgenden Tag die Transfektion, wobei jede Bedingung in Triplikaten behandelt wurde. Als Transfektionsagenz wurde TransIT-X2 nach Herstellerangaben verwendet. Es wurde eine Gesamtmenge von bis zu 575 ng DNA transfiziert. Bei Verwendung dieser Gesamtmenge wurden 45 ng des Reporterplasmids und 5 ng des Kontrollplasmids eingesetzt. Die restlichen 525 ng DNA wurden dann durch Leervektoren oder eine bestimmte Kombination an Alternativplasmiden aufgefüllt. Zum Beispiel erfolgte die Stimulation eines ISRE Reporters durch Kotransfektion verschiedener Expressionsplasmide (RIG-I CARD2, TBK1, IKK- ϵ oder IRF3) zusammen mit den Luciferasereportern. In einigen Fällen erfolgte acht Stunden nach Transfektion eine Stimulation durch Zugabe von Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) oder PMA.

Nach weiteren 24 Stunden fand die Lyse der Zellen unter Verwendung von 100 μ l *Passive Lysis Buffer* pro *Well* statt. Durch Zugabe gleicher Mengen an Luciferase Substraten (Luciferin 2.1.3 und Coelenterazin 1:800 in Wasser) in zwei verschiedenen Reaktionsansätzen wurde die Lumineszenzreaktion gestartet. Die Lumineszenzemission wurde im direkten Anschluss mit Hilfe des *Mithras LB940 Microplate Reader* detektiert.

2.2.1.10 Konfokale Mikroskopie

Um eine Darstellung zellulärer Strukturen und Proteine zu ermöglichen sowie den Verlauf einer Virusinfektion zu beobachten, wurden fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine (GFP/ mCherry) oder aber fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet, die gegen zelluläre Strukturen oder Proteine gerichtet sind. Diese wurden mittels Konfokalmikroskopie dargestellt. Das Präparat wird dabei von einem Laser spezifischer Wellenlänge abgetastet. Zuvor in das Gewebe eingebrachte Fluorochrome wurden zur Emission angeregt, das Fluoreszenzlicht von einem Detektor aufgefangen und an einen

Computer weitergeleitet. Da die Lichtintensitäten nacheinander an allen Orten des abzubildenden Bildes gemessen werden, ist später eine Rekonstruktion des gesamten Bildes möglich. Gleichzeitig befindet sich im Strahlengang vor dem Detektor eine sogenannte Detektionslochblende oder auch *Pinhole*, welches das Licht, das unter- und oberhalb der Fokusebene entsteht, ausblendet und nur das Licht aus der Fokusebene bis zum Detektor durchlässt. Somit wird eine sehr gute Auflösung auch in der Z-Ebene erreicht und eine dreidimensionale Rekonstruktion der untersuchten Zellen ermöglicht.

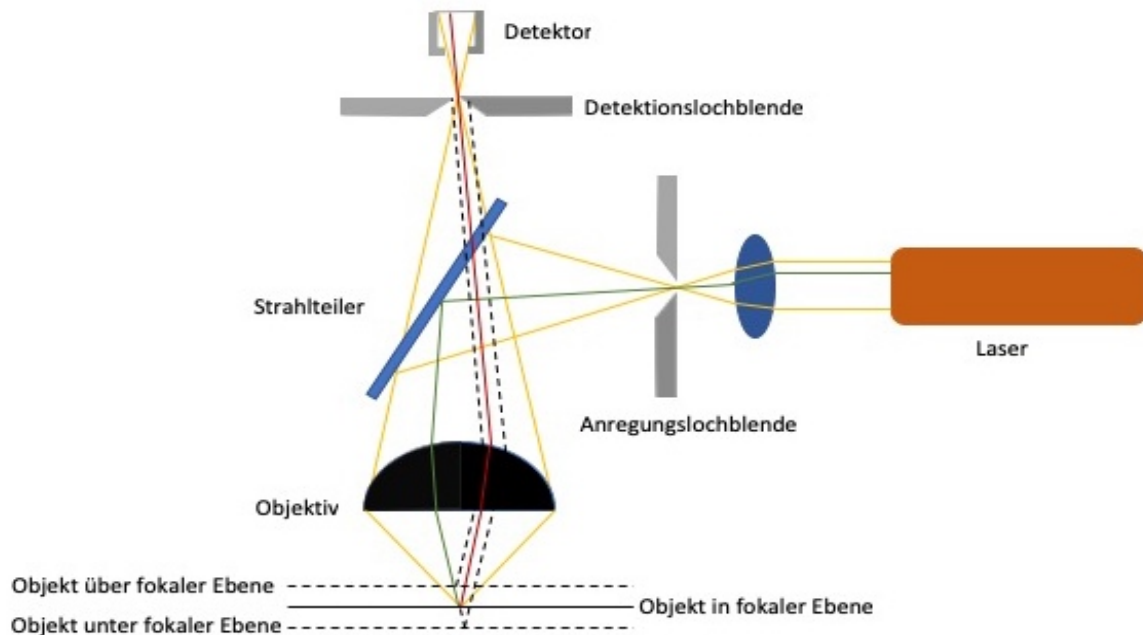


Abbildung 8: Schema der Konfokalmikroskopie

(modifiziert nach Zeiss: Das Konfokale Prinzip)

Protokoll:

Es wurden 50.000 Zellen im 24-Well Format auf *Cover Slips* ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach mindestens acht Stunden erfolgte dann entweder die Transfektion von Plasmiden, die für Fusionskonstrukte von TRIM9 und einem Fluoreszenzprotein kodieren, oder aber die Induktion der stabil in der Zelllinie integrierten Konstrukte mit Doxycyclin bei Verwendung von induzierbaren TRIM9 Überexpressionskonstrukten. 12-24 Stunden nach Induktion oder Transfektion erfolgte dann bei einigen Versuchen die Infektion der Zellen mit VSV p-GFP (MOI=5), einer Virusvariante, welche ein Fusionskonstrukt von viralem P-Protein mit eGFP kodiert. Nach der Infektion erfolgte dann die Abnahme des Mediums. Die Plättchen wurden mit Hilfe von phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen, bevor die Zellen unter Verwendung von vier-prozentiger Paraformaldehydlösung (PFA) und zehnmütiger Inkubation fixiert

wurden. Die Zellen wurden durch Inkubation in PBS mit 0,1 % Triton permeabilisiert und der Zellkern für eine Färbung mit *Hoechst33342* (1:10.000 in PBS) zugänglich gemacht. Nach weiteren Waschgängen mit PBS wurden die *Cover Slips* mit Hilfe von Mowiol auf Objektträgern fixiert und nach dem vollständigen Trocknen mit dem Leica TCS SP5 Konfokalmikroskop visualisiert und analysiert.

2.2.1.11 Durchflusszytometrie (FACS)

Diese Methode dient der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen sowie intrazellulären Proteinen und DNA in einzelnen Zellen. *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS) ermöglicht außerdem die Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer Zellgranularität, Größe und Fluoreszenzeigenschaften. Einzelne Zellen werden in einem Laminarstrom an verschiedenen Lasern bestimmter Wellenlänge vorbeigeleitet und von monochromatischen Laserstrahlen angeregt. Dabei wird das Streulicht, welches mit der Größe der Zelle und ihrer Komplexität korreliert, sowie das von Fluoreszenzmarkern emittierte Licht mittels Detektoren nachgewiesen.

Protokoll:

Die Durchflusszytometrie wurde verwendet, um die Replikationseffizienz verschiedener Viren in Abhängigkeit von TRIM9 zu untersuchen. Dementsprechend wurden verschiedene humane Tumorzelllinien mit fluoreszenzmarkierten Virusstämmen infiziert und die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten abtrypsiniert, in DMEM-Kulturmedium resuspendiert, in PBS gewaschen und schließlich die Zellpellets in vier-prozentiger PFA-Lösung fixiert. Die so entstandene Zellsuspension stand zur durchflusszytometrischen Analyse mit Hilfe des „FACS Calibur“ zur Verfügung.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation doppelsträngiger DNA-Fragmente. Diese zu amplifizierenden Abschnitte werden von zwei *Primern* flankiert, die jeweils an die zueinander komplementären Einzelstränge binden. Zu der DNA und den *Primern* werden noch Desoxyribonukleotidtriphosphate, DNA Polymerase und Reaktionspuffer gegeben. Im Falle mehrerer zu amplifizierender DNA-Abschnitte wird ein Mastermix angefertigt, zu dem die *Template*-DNA zugegeben wird. Dieser

Reaktionsansatz beinhaltet 100 ng DNA-*Template*, 0,4 mM dNTPs, 2 x 0,2 μ M *Primer*, 1 U DNA Polymerase und 5 μ l 10-fach konzentrierter Reaktionspuffer. Die Proben werden dann im *Thermo Cycler* einer bestimmten Abfolge an Temperaturänderungen unterzogen; wobei die Schritte zwei bis vier im hier vorliegenden Protokoll insgesamt 35 Mal wiederholt werden:

1	Initiale DNA Denaturierung	95°C	30s
2	DNA Denaturierung	95°C	15-30s
3	Anlagerung der <i>Primer</i>	Primer spezifische Temp.	15-60s
4	Polymerisierung	68-72°C	1min/kb
5	Finale Erweiterung	68-72°C	5min
6	Probenkühlung	4°C	Pause

Die Anlagerungstemperatur (3) ist dabei anhängig von der Schmelztemperatur der *Primer* und somit je nach PCR Ansatz spezifisch auszuwählen. Die Polymerisierungstemperatur hängt von der verwendeten Polymerase ab. Dabei sollte für die „*Phusion High Fidelity*“ Polymerase eine Temperatur von 72 °C, für die „*Taq*“ Polymerase eine Temperatur von 68 °C genutzt werden. Die Dauer der Elongationsphase hängt vor allem von der Länge des zu amplifizierenden DNA Abschnittes sowie der verwendeten Polymerase ab, da diese die Synthesegeschwindigkeit vorgibt.

2.2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung der im Rahmen der Polymerase-Kettenreaktion amplifizierten DNA wurden 1-2-prozentige Agarosegele verwendet. Hierfür wurden 1,5 g bis 3,0 g Agarose in 150 ml TAE-Puffer gelöst und mit 5,25 μ l DNA-*Stain* versetzt. Nach Aushärtung des Gels, Befüllung der Taschen durch mit *Loading Dye* gefärbten Proben und 30 bis 60 Minuten Laufzeit bei 110 V Spannung konnte das Gel mit Hilfe des *Alpha Imagers* entwickelt werden. Spezifische Banden wurden ggf. ausgeschnitten und unter Verwendung des *peqGOLD Gel Extraction Kit* gemäß des Herstellerprotokolls konnte die enthaltene DNA aufgereinigt werden.

2.2.2.3 Klonierung und lentivirale Transfektion

Um die Funktion der einzelnen Isoformen von TRIM9 im Rahmen von viralen Infektionen untersuchen zu können, machten wir uns Überexpressionsmodelle zunutze. Hierfür wurde das *Lenti-X Tet-On Advanced Inducible Expression System* verwendet, welches ein Doxycyclin-induzierbares Vektorsystem beschreibt, das in beliebige Zielzellen mit Hilfe eines replikations-defizienten Lentivirus integriert werden kann. Eine VSV-G Pseudotypisierung ist dabei für die Zellaufnahme und den breiten Zelltropismus verantwortlich. Das von Clontech Takara Bioscience, Shiga (JPN) produzierte System beruht auf dem von Gossen und Bujard 1992 entwickelten Tetracyclin-regulierten Expressionssystem, welches nun um einen weiterentwickelten Transaktivator und einen gezielt induzierbaren Promoter P_{tight} ergänzt wurde (Ackland-Berglund and Leib 1995, Gossen and Bujard 1992, Urlinger, et al. 2000). Ziel ist es mit Hilfe des *Lenti-X HTX Packaging Mix* nach separater Produktion eines lentiviralen Regulator- (*pLVX-Tet-On-Advanced*) und Reaktionsvektorüberstandes (*pLVX-Tight-Puro* mit integriertem Wunschgen) in HEK293 Zellen, diese für die Kotransduktion der Zielzellen zu nutzen. Benötigt werden demnach das beliebige Zielgen integriert in den *pLVX-Tight-Puro* Vektor, der einen induzierbaren Promoter (P_{tight}) enthält, welcher aus einem Tet-Responsive Element besteht sowie ein *pLVX-Tet-On Advanced* Vektor, der einen konstitutiv exprimierten Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator enthält. Außerdem wird eine Verpackungszelllinie benötigt (hier HEK293 Zellen) und die Verpackungsplasmide, die für das VSV-G Hüllprotein sowie die Gene gag und pol kodieren.

Im Rahmen der Klonierung eines *Inserts* in einen ausgewählten Vektor wurde zunächst die für TRIM9 kodierende Sequenz als *Insert* aus einem bereits bestehenden Plasmid mit der kompletten Sequenz von TRIM9 amplifiziert und aufgereinigt. *TRIM9 long isoform* (TRIM9I) wurde durch Deletion einiger Basen zu den modifizierten Formen TRIM9s und *TRIM9 short isoform including 16 deleted amino acids* (TRIM9sdel) moduliert. Diese Isoform wurde konstruiert, um die Funktion der zusätzlichen 16 Aminosäuren in der Sequenz von TRIM9s auszuarbeiten.

Aminosäuresequenzen der einzelnen TRIM9 Isoformen:

TRIM9I (fett gedruckt hier die PRY/SPRY Domäne)

MEEMEEELKCPVCGSFYREPIILPCSHNLCQACARNILVQTPESESPQSHRAAGSGVSDYDY
LDLDKMSLYSEADSGYGSYGGFASAPTPCQKSPNGVRVFPPAMPPPATHLSPALAPVPRN
SCITCPQCHRSLILDDRGLRGFPKNRVLEGVIDRYQQSKAAALKCQLCEKAPKEATVMCEQC
DVFYCDPCRLRCHPPRGPLAKHRLVPPAQGRVSRRLSPRKVSTCTDHELENHSMYCVQCK
MPVCYQCLEEGKHSSHEVKALGAMWKLHKSQALNGLSDRAKEAKEFLVQLRNMVQQI
QENSVEFEACLVAQCDALIDALNRRKAQLLARVNKEHEHKLKVVRDQISHCTVKLRQTTGLM
EYCLEVIKENDPSGFLQISDALIRRVHLTEDQWGKGTTPRMTTDFDLSLDNSPLLQSIHQD
FVQVKASSPVPATPILQLEECCTHNSATLSWKQPPLSTVPADGYILELDDGNGGQFREYVY
GKETMCTVDGLHFNSTYNARVKAFNKTVSPYSKTLVLQTSE**VAWF****AFDPGSAHSDIILSN**
DNLTVTCSSYDDRVLGKTGFSKGIHYWELTVDRYDNHPDPAFGVARMDVMKDVMLGKD
DKAWAMYVDNNSRWFMHNSHTNRTEGGITKGATIGVLLDLNRKNLFFINDEQQGPIAF
DNVEGLFFPAVSLNRNVQVTLHTGLPVPDFYSSRASIA

TRIM9s (ohne PRY/SPRY Domäne, fett gedruckt hier die additionalen 16 Aminosäuren)

MEEMEEELKCPVCGSFYREPIILPCSHNLCQACARNILVQTPESESPQSHRAAGSGVSDYDY
LDLDKMSLYSEADSGYGSYGGFASAPTPCQKSPNGVRVFPPAMPPPATHLSPALAPVPRN
SCITCPQCHRSLILDDRGLRGFPKNRVLEGVIDRYQQSKAAALKCQLCEKAPKEATVMCEQC
DVFYCDPCRLRCHPPRGPLAKHRLVPPAQGRVSRRLSPRKVSTCTDHELENHSMYCVQCK
MPVCYQCLEEGKHSSHEVKALGAMWKLHKSQALNGLSDRAKEAKEFLVQLRNMVQQI
QENSVEFEACLVAQCDALIDALNRRKAQLLARVNKEHEHKLKVVRDQISHCTVKLRQTTGLM
EYCLEVIKENDPSGFLQISDALIRRVHLTEDQWGKGTTPRMTTDFDLSLDNSPLLQSIHQD
FVQVKASSPVPATPILQLEECCTHNSATLSWKQPPLSTVPADGYILELDDGNGGQFREYVY
GKETMCTVDGLHFNSTYNARVKAFNKTVSPYSKTLVLQTSE**GKALQQYPSERELGI**

TRIM9sdel

MEEMEEELKCPVCGSFYREPIILPCSHNLCQACARNILVQTPESESPQSHRAAGSGVSDYDY
LDLDKMSLYSEADSGYGSYGGFASAPTPCQKSPNGVRVFPPAMPPPATHLSPALAPVPRN
SCITCPQCHRSLILDDRGLRGFPKNRVLEGVIDRYQQSKAAALKCQLCEKAPKEATVMCEQC
DVFYCDPCRLRCHPPRGPLAKHRLVPPAQGRVSRRLSPRKVSTCTDHELENHSMYCVQCK
MPVCYQCLEEGKHSSHEVKALGAMWKLHKSQALNGLSDRAKEAKEFLVQLRNMVQQI
QENSVEFEACLVAQCDALIDALNRRKAQLLARVNKEHEHKLKVVRDQISHCTVKLRQTTGLM
EYCLEVIKENDPSGFLQISDALIRRVHLTEDQWGKGTTPRMTTDFDLSLDNSPLLQSIHQD
FVQVKASSPVPATPILQLEECCTHNSATLSWKQPPLSTVPADGYILELDDGNGGQFREYVY
GKETMCTVDGLHFNSTYNARVKAFNKTVSPYSKTLVLQTSE

Die verwendeten Sequenzen verfügten außerdem über ein N-terminales *influenza hemagglutinin*-Tag (HA). In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden diese DNA-Sequenzen in pLVX-Tight-Puro Vektoren, wie oben beschrieben, eingesetzt. In einem weiteren Arbeitsschritt erfolgte die Insertion einer *Multiple Cloning Site (MCS)* an das

C-terminale Ende der für die entsprechende TRIM9 Isoform kodierenden DNA Sequenz. Hierfür wurde das Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit verwendet und die Herstellerangaben befolgt, jedoch herunterskaliert auf folgenden Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l:

5 μ l	Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix
10 μ M	fwd Primer pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS (s. 2.1.2.2)
10 μ M	rev Primer pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS (s. 2.1.2.2)
25 ng	template DNA pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9I/ s/ sdel
rest	ddH ₂ O

Nach erfolgreicher Transformation in 50 μ l eines kompetenten DH5 α Bakterienstammes, wurden am nächsten Tag Kolonien gepickt und diese zunächst in einem Volumen von 5 ml LB-Medium, nach erfolgreicher Selektion positiver Klone in einem größeren Volumen von 300 ml, expandiert. Im Anschluss wurden die Plasmide mit Hilfe eines *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* nach Herstellerangaben aufgereinigt und die Konzentrationen der DNA mittels NanoDrop 2000c Spectrophotometer bestimmt. Durch enzymatischen Verdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und MluI wurde nach positiven Klonen selektioniert, welche im Anschluss durch Sequenzierung verifiziert wurden.

Je ein verifiziertes, MCS enthaltendes Plasmid pro Isoform wurde dann mit PacI und MluI verdaut und zusammen mit amplifizierter, für mCherry kodierender DNA als *Insert* mit Hilfe der *Fast-Link DNA Ligase* im Verhältnis von 1:3 bzw. 1:5 (Vektor : Insert) ligiert und in DH5 α beziehungsweise MachI Bakterien transformiert. Die Auswahl der Klone, die zur Sequenzierung geschickt wurden, erfolgte nun via Restriktionsverdau mit EcoRI. Nach erfolgreicher Sequenzierung der Konstrukte pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9I-mCherry, pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s-mCherry und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9sdel-mCherry wurde die lentivirale Transfektion der Plasmide durchgeführt.

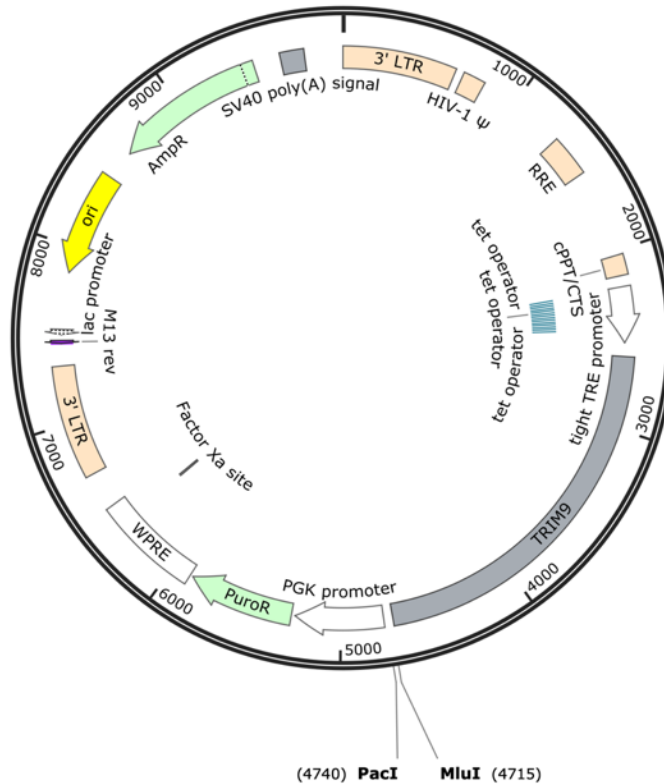


Abbildung 9: Graphische Darstellung des pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS Plasmids in zirkulärer Form.

Das zirkuläre Plasmid pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS konnte mittels der Restriktionsenzyme PacI und MluI geschnitten werden. Es wurde die DNA Sequenz des rot-fluoreszierenden Proteins mCherry mittels DNA Ligase eingefügt und ein pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-mCherry Plasmid erstellt. Die Klonierung erfolgte ebenfalls mit den Isoformen TRIM9s und TRIM9sdel und ergab folgende weitere Konstrukte: pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s-mCherry und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9sdel-mCherry (SnapGene).

Um die pLVX-Tight-Puro-basierten Konstrukte in Replikations-defiziente Lentiviren zu verpacken wurden als Virus-generierende Zellen 5×10^6 HEK293 Zellen auf Kollagen-beschichteten 6-Well Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um eine 80 bis 90-prozentige Konfluenz zum Zeitpunkt der Transfektion zu erreichen. Für die transiente Transfektion wurde nun folgender Reaktionsansatz vermengt:

5 μ l	pLVX-Tight-Puro-basiertes lentivirales Kosntrukt oder Tet-ON Plasmid
2,5 μ g	VSV-G
2,5 μ g	dR8.9
30 μ l	Lipofectamine2000

Die Substanzmenge wurde dann auf 1 ml Gesamtvolumen mit OptiMEM aufgefüllt, für zehn Minuten inkubiert und anschließend auf jeweils eine der beschichteten Platten gegeben. Nach sechs Stunden wurde das gesamte Medium durch Tetracyclin-freies Medium ersetzt. Nach weiteren 48 Stunden wurden die lentivirale Partikel enthaltenden Überstände abgenommen, bei 800 g für 5 Minuten zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Filter gereinigt.

Die zu transfizierenden Zellen (die Melanomzelllinie 1205Lu bzw. deren TRIM9-defizienten Varianten und die von Bronchialepithel abgeleitete A549 bzw. deren TRIM9-defizienten Varianten) wurden 24 Stunden nach Transfektion der HEK293 Zellen vorbereitet und $0,3 \times 10^6$ Zellen pro *Well* im 6-*Well* Format ausgesät. Zunächst wurde das Medium der Zielzellen zu 1 ml Medium mit 5 µg/ml Polybren erneuert. Nach Addition des generierten Virus in einem bestimmten Verhältnis des pLVX-Tight-Puro Plasmids zu TetON (z.B. 1:1 500 µl TetON und 500 µl pLVX-Tight-Puro), wurden die Zellkulturplatten bei 32 °C und 1200 g für 60-90 Minuten zentrifugiert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubationszeit konnte das Medium durch ein Selektionsmedium ersetzt werden. Für die Selektion positiv transfizierter A549 Zellen wurden 1 µg/ml Puromycin und 2,5 mg/ml G418 verwendet. Für 1205Lu Zellen wurde eine Konzentration von 1 µg/ml Puromycin und 1 mg/ml G418 gewählt. Im Folgenden wurden die Überexpressionsmodelle in ihrer Funktion getestet.

2.2.2.4 Etablierung eines stabilen Überexpressionsmodells von TRIM9

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, konnten die einzelnen mCherry-markierten TRIM9 Isoformen nach Induktion mit Doxycyclin im Zytoplasma der Zellen visualisiert werden. Auffällig war ein mikroskopisch sichtbarer struktureller Unterschied der einzelnen Isoformen, der im Weiteren noch genauer untersucht wurde. Außerdem fiel auf, dass die Induktion und Darstellung von TRIM9l schwieriger war als die der kurzen Isoformen von TRIM9.

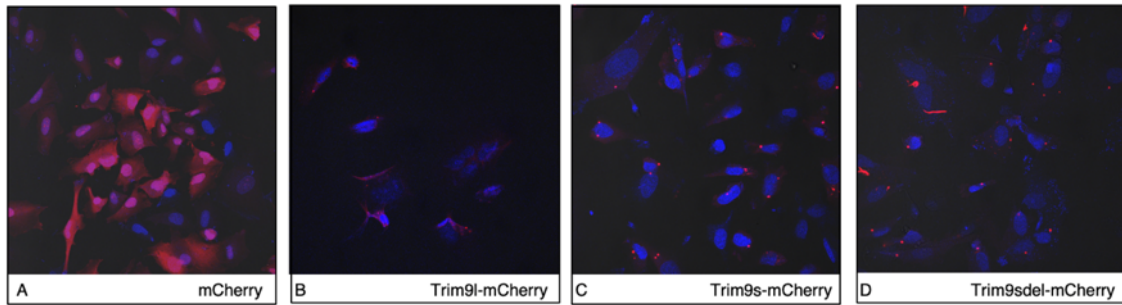


Abbildung 10: Konfokalmikroskopische Darstellung Doxycyclin-induzierter, mCherry-markierter TRIM9 Konstrukte in 1205Lu Zellen.

1205Lu TRIM9-KO Zellen mit integrierten pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l/s/sdel-mCherry Plasmiden wurden im 24-Well Format über Nacht auf Coverslips ausgesät und mit 1 $\mu\text{g/ml}$ Doxycyclin über 48 Stunden induziert. Es erfolgte die Fixation der Zellen mit 4-prozentiger PFA-Lösung und die anschließende Permeabilisierung mittels 0,1% Triton. Die Inkubation in Hoechst-Farbstoff ermöglichte die Anfärbung der Zellkerne. Anschließend wurden die *Coverslips* auf Objektträger aufgebracht und konnten für die Konfokalmikroskopie verwendet werden.

Neben dem mikroskopischen Nachweis der Überexpression der einzelnen TRIM9 Isoformen in verschiedenen A549 und 1205Lu TRIM9-KO Zelllinien, erfolgte ein Expressionsnachweis auf Proteinebene. Nach Entwicklung der einzelnen Western Blots konnte in mit pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l/s/sdel(-mCherry) Plasmid transfizierten 1205Lu TRIM9-KO3 und KO5 Zellen eine Expression der einzelnen Isoformen sowohl nach Doxycyclin-Induktion mit einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ als auch mit 1,0 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden (Abb. 11 A und B). Die Isoform TRIM9l-mCherry ließ sich jedoch erst mit einer Doxycyclin-Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ induzieren. Ohne Zugabe von Doxycyclin wurde keine Expression von TRIM9 nachgewiesen; das System zeigte volle Funktionalität. Einzige Ausnahme stellte hier pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9sdel-mCherry in A549 TRIM9-KO Zellen dar (Abb. 11 C). Dieses Konstrukt zeigte auch ohne Induktion durch Doxycyclin eine geringe Expression. Außerdem ließ sich die mit mCherry markierte Isoform Trim9l nicht mit einer Doxycyclin-Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ induzieren. Nach Induktion mit einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ konnte, zumindest im Rahmen einer qualitativen Beurteilung, die Expression nicht auf ein ähnliches Niveau der Proteinexpression wie in 1205Lu Zellen gesteigert werden. Das System in A549 Zellen zeigte dementsprechend einige Undichtigkeiten an. Im Folgenden wurde daher primär mit 1205Lu Zellen gearbeitet.

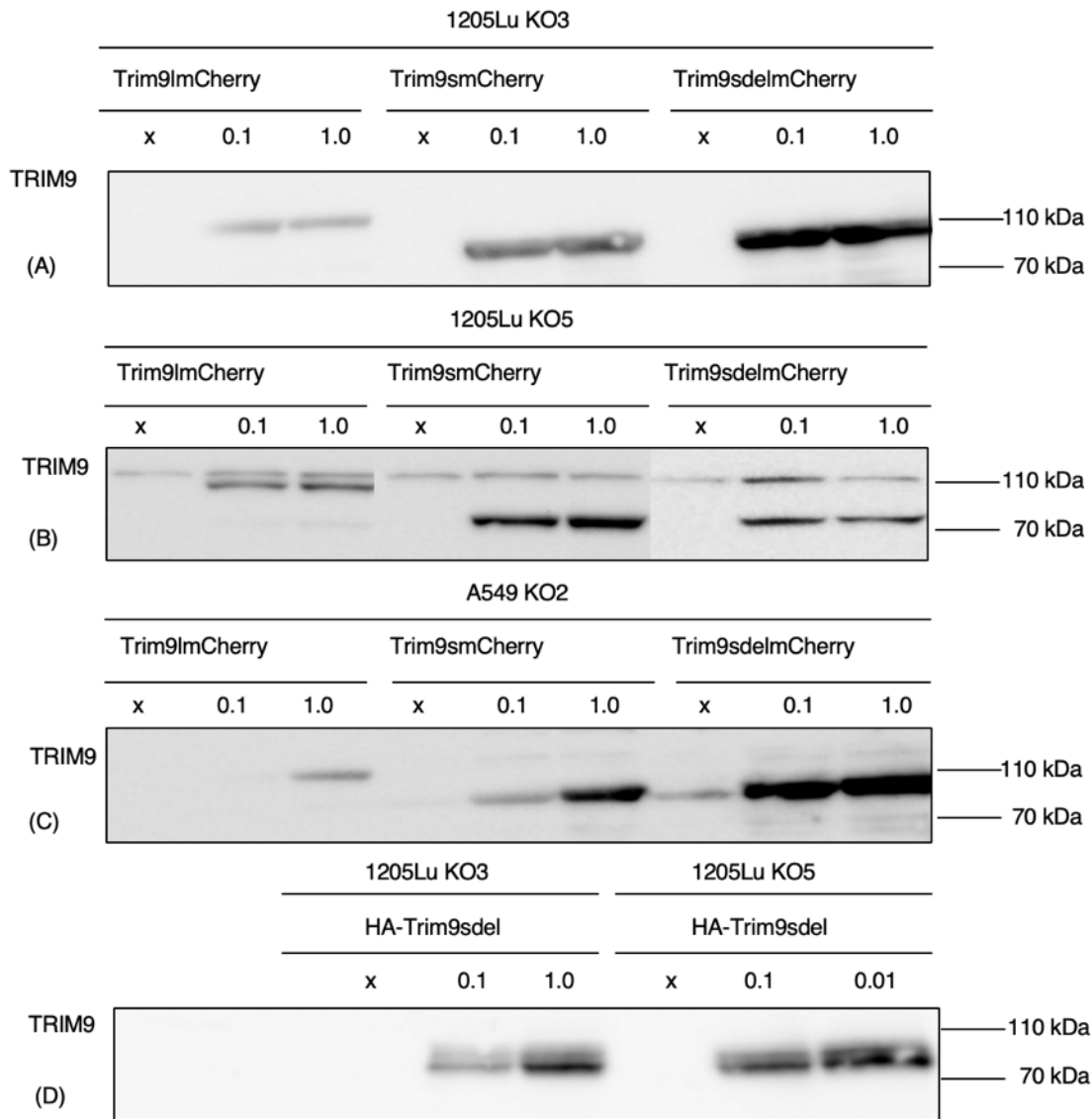


Abbildung 11: Die einzelnen Isoformen Trim9l/ TRIM9s/ TRIM9sdel lassen sich in 1205Lu KO3 und KO5 Zellen nach Induktion mit Doxycyclin überexprimieren.

Nach Induktion von 1205Lu und A549 TRIM9-KO Zellen im 6-Well Format mit transfiziertem pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l/s/sdel(-mCherry) Plasmid mit Doxycyclin (0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml) über 48 Stunden, wurden Lysate der Zellen mit RIPA Puffer angefertigt und nach Durchführung eines Bradford-Assays Proben für die Proteinanalyse mittels Western Blot hergestellt. Die Blots wurden über Nacht in TRIM9 Antikörper inkubiert und nach Inkubation mit sekundärem Antikörper entwickelt.

Nach erfolgreicher Verifizierung der Einzelisoformüberexpressionen in 1205Lu TRIM9-KO Zelllinien wurden 1205Lu TRIM9-KO Zelllinien mit beiden Plasmiden pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s transfiziert, um die gleichzeitige Überexpression der Isoformen in einem KO zu erreichen. Diese Zellen werden im folgenden Text als TRIM9 *double isoform overexpression* (DOE) Zellen bezeichnet. In einem ersten Versuch konnte die Überexpression beider Isoformen in 1205Lu TRIM9-KO3 Zellen nach Induktion mit 1,0 µg/ml Doxycyclin erzielt werden,

jedoch zeigte sich ein inverses Expressionsverhältnis der beiden Isoformen zueinander. Die endogene Expression von TRIM9l zu TRIM9s in WT Zellen erfolgt im Verhältnis von circa 3:1, während die Induktion der erstellten Überexpressionszellen eine viel stärkere Expression der kurzen Isoform von TRIM9 erzielte (Abb. 12).

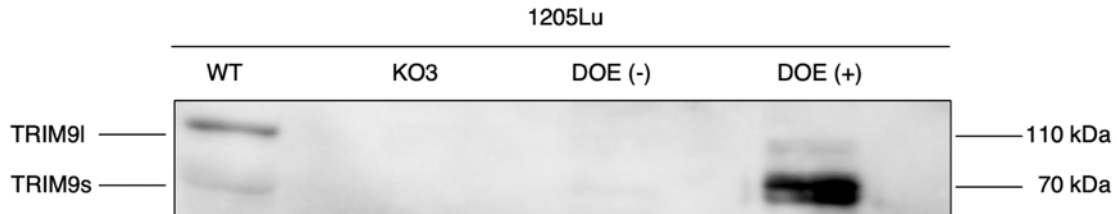


Abbildung 12: Die gleichzeitige Überexpression von TRIM9s und TRIM9l in 1205Lu TRIM9-KO3 Zellen resultierte in einem inversen Verhältnis der Expression der beiden Isoformen im Vergleich zum WT.

Es erfolgte die gleichzeitige lentivirale Transfektion der Plasmide pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l in 1205Lu TRIM9-KO3 Zellen und die Selektion der Zielzellen mit G418 (1,0 mg/ml) und Puromycin (1,0 μ g/ml). Nach Induktion mit Doxycyclin 1,0 μ g/ml für 48 Stunden wurden Lysate der Zellen mit RIPA Puffer angefertigt und nach Durchführung eines Bradford-Assays Proben für die Proteinanalyse mittels Western Blot hergestellt. Die Blots wurden über Nacht in polyklonalem TRIM9 Antikörper der Firma Proteintech inkubiert und nach Inkubation mit sekundärem Antikörper entwickelt.

Aus diesem Grund wurde versucht das Verhältnis der Isoformen dem Wildtypniveau anzugleichen. Die Transfektion der TRIM9-KO Zellen wurde dafür mit den zwei Plasmiden pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l in den Verhältnissen 1:2, 1:4 und 1:9 durchgeführt. Qualitativ beurteilt zeigte sich der beste Angleich an das Wildtypniveau bei Transfektion von pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l im Verhältnis 1:4 (Abb. 13).

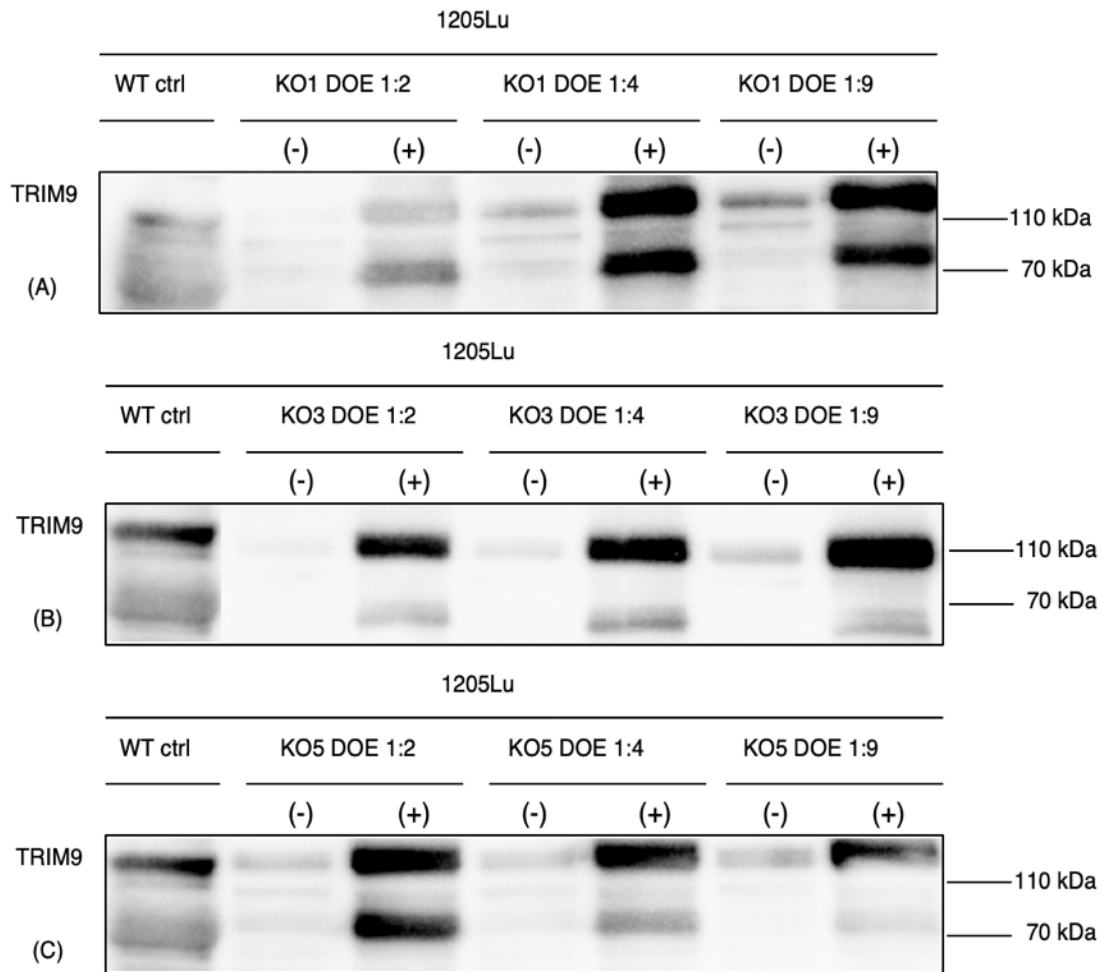


Abbildung 13: Nach lentiviraler Transfektion von 1205Lu TRIM9-KO Zellen mit den Plasmiden pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l im Verhältnis 1:4 konnte das Expressionsverhältnis der beiden Isoformen dem Wildtypverhältnis angeglichen werden.

Es erfolgte die gleichzeitige lentivirale Transfektion der Plasmide pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l in 1205Lu TRIM9-KO1 (A), 1205Lu TRIM9-KO3 (B) und 1205Lu TRIM9-KO5 (C) Zellen in den Verhältnissen 1:2, 1:4 und 1:9 und die anschließende Selektion der Zielzellen mit G418 (1,0 mg/ml) und Puromycin (1,0 µg/ml). Vor (-) und nach (+) Induktion mit Doxycyclin 1,0 µg/ml für 48 Stunden wurden Proteinlysate und später ein Western Blot erstellt.

2.2.2.4 CRISPR/Cas9-Geneditierung: Herstellung stabiler TRIM-9 Knock-out Zelllinien

Wissenschaftler der Universität Osaka (Japan), die sich der Identifikation der Sequenz des bakteriellen Gens widmeten, welches für die alkalische Phosphatase kodiert, publizierten im Jahr 1987 die Entdeckung eines ungewöhnlichen DNA-Abschnitts, der aus sich wiederholenden Nukleotidsequenzen bestand (Ishino Y 1987). Nachdem im Jahr 2000 weitere sogenannte *Short Regularly Spaced Repeats* (SRSR) in anderen Bakterien und Archaeen entdeckt wurden (Mojica FJ 2000), wurde zwei Jahre später

zum ersten Mal der Begriff *clustered regularly interspaced short palindromic repeat* (CRISPR) geprägt (Jansen R 2002).

Es konnte gezeigt werden, dass eben diese CRISPR Sequenzen viralen DNA Abschnitten oder Plasmiden entsprachen und so schließlich bewiesen werden, dass das CRISPR-Cas System ein adaptives Immunsystem der Bakterien darstellt (Barrangou R 2007). Das Enzym CRISPR *associated protein 9* (Cas9), welches in den meisten Typ II CRISPR-Cas Systemen der Bakterien gefunden wird, schneidet mit Hilfe von spezifischer *guide RNA* (gRNA) eindringende Fremd-DNA, die an bestimmten Stellen durch enthaltene konservierte *proto-spacer adjacent motifs* (PAMs) erkannt wird (Abb. 14). Um den die Fremd-DNA erkennenden Komplex zu vervollständigen, benötigt die Endonuklease Cas9 eine CRISPR RNA (crRNA) Sequenz sowie eine *trans-acting* CRISPR RNA (tracrRNA), die beide als *single-guide RNA* (sgRNA) zusammengefasst werden können (Charpentier E 2013). Inzwischen wurde dieses in Bakterien vorkommende CRISPR-Cas9 System durch Abwandlung und Weiterentwicklung in ein hocheffektives molekularbiologisches Instrument verwandelt, das dazu genutzt werden kann, in Eukaryoten an spezifischer Stelle im Genom Geneditierungen vorzunehmen (Cong L 2013, Mali P 2013).

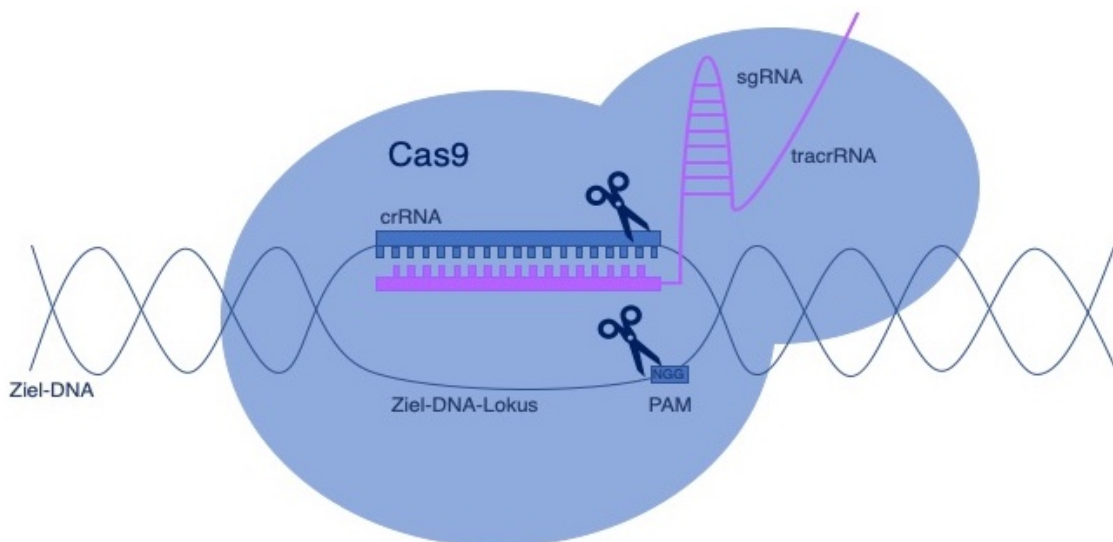


Abbildung 14: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas Systems

(modifiziert nach Charpentier E, 2013)

Durch die enzymatische Aktivität von Cas9 entstehen so an der gewünschten Stelle der eukaryotischen DNA Doppelstrangbrüche, die entweder durch *non-homologous end joining* (NHEJ) oder *homologous recombination* (HR) repariert werden. Hierbei kann

vorhandene Erbinformation deletiert, neu eingesetzt oder auch genetische Information zwischen DNA Molekülen ähnlicher Sequenzen ausgetauscht werden.

Die für die Anwendung beim Menschen optimierte Variante der bakteriellen Cas9 Endonuklease entstammt dem Bakterium *Streptococcus pyogenes* und wird als SpCas9 bezeichnet. Durch weitere Adjustierung verschiedener Cas9 Enzyme konnten Endonukleasevarianten (sogenannte Cas9 Nickasen) entwickelt werden, die die Rate der sehr fehleranfälligen und somit für die Wirtszelle toxischen NHEJ reduzieren und hohe Effizienz in Bezug auf die Geneditierung durch HR erzielen. Durch weitere Stabilisierung der Separation doppelsträngiger DNA in Einzelstränge, wurde eine weitere Cas9 Variante, die *enhanced* spCas9 (eSpCas9) entwickelt, die auch in der vorliegenden Arbeit Anwendung findet. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die eSpCas9 sowie auch zwei weitere Konstrukte, SpCas9-HF1 und HypaCas9, eine geringere Rate an *off-target* Effekten während des Prozesses der humanen Geneditierung durch Schwächung nicht-spezifischer Interaktionen zwischen dem Cas9-RNA Komplex und der Substrat-RNA garantieren. Neu entwickelte Cas9 Varianten mit verbesserter *off-target* Aktivität, wie zum Beispiel die 2018 veröffentlichte Sniper-Cas9, werden die Spezifität des Systems noch weiter verbessern (Lee JK 2018).

Protokoll:

Die verwendeten A549, 1205Lu und Huh7.5 TRIM9-KO Klone wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems generiert. Für die ersten von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe generierten TRIM9-defizienten Zelllinien diente das Fragment von Basenposition 227-249 in Exon 1 (5'-3': GCGGCTATGGCTCCTACGGGGG) als Zielregion der entsprechend komplementär erstellten sgRNA. Im Folgenden wurde nun versucht durch Verwendung von eSpCas9 die Anzahl der *off-target* Effekte zu reduzieren und ggf. ein höheres Level an Spezifität zu erreichen. Zunächst erfolgte durch Verwendung folgender Primer der Einbau der, die Zielregion beschreibenden sgRNA in ein auch für die eSpCas9 kodierendes Plasmid (Abb. 15).

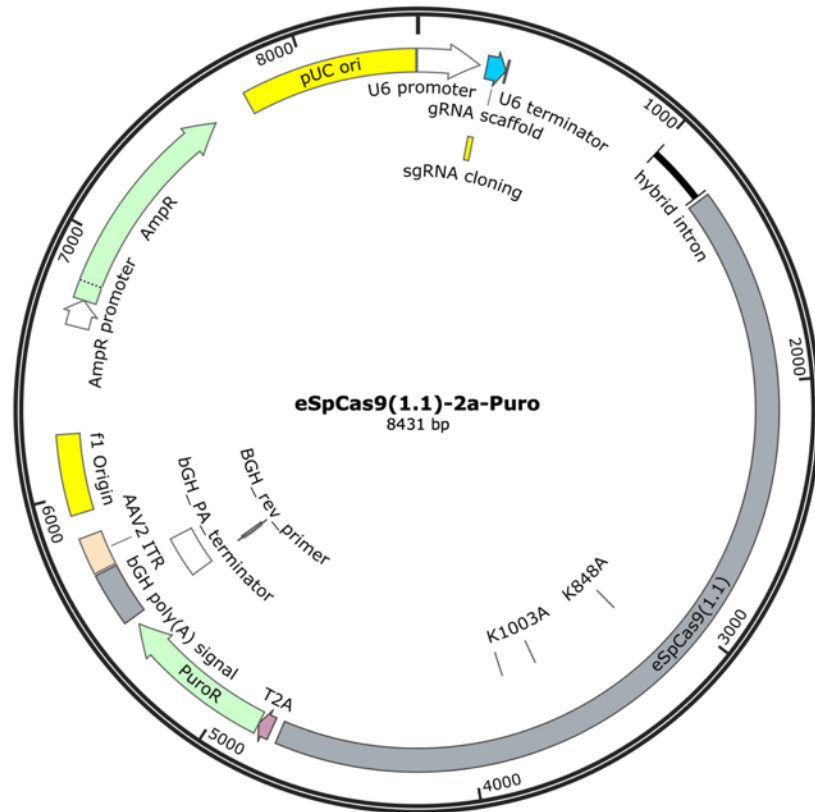


Abbildung 15: Graphische Darstellung des eSpCas9(1.1)-2a-Puro Plasmids in zirkulärer Form.

Das zirkuläre Plasmid eSpCas9(1.1)-2a-Puro Plasmid (erworben von *addgene*) exprimiert sowohl die eSpCas9 als auch eine Puromycin Resistenz. Dargestellt ist ebenfalls die Zielregion für die sgRNA (*sgRNA cloning*). (SnapGene)

Sequenzen der einzelnen sgRNAs und zugehörige Primer-Sequenzen:

KO der TRIM9I-Isoform

Zielregion (Exon) 9

sgRNA GGAGGGCCTCTTCTTCCCTG

Trim9s-Cas9-Fw-N CAC CGG AGG GCC TCT TCT TCC CTG

Trim9s-Cas9-Rev-N AAA CCA GGG AAG AAG AGG CCC TCC

KO der Trim9s-Isoform

Zielregion (Exon) 7

sgRNA CAGAGCGAGAACTGCGTGCC

Trim9s-Cas9-Fw-N CAC CGC CAC GCA GTT CTC GCT CTG

Trim9s-Cas9-Rev-N AAA CCA GAG CGA GAA CTG CGT GGC

KO beider Trim9-Isoformen

Zielregion (Exon) 1

sgRNA GAGTTGAAATGCCCCGTGTG

Trim9s-Cas9-Fw-N CAC CGA GTT GAA ATG CCC CGT GTG

Trim9s-Cas9-Rev-N AAA CCA CAC GGG GCA TTT CAA CTC

Zielregion und Sequenz der sgRNA sowie zugehörige Primerpaare. 5' Überhang "CACC" für den *Sense*-Strang und "AAAC" für den *Antisense*-Strang für die Klonierung sind rot markiert.

Für die TRIM9 Geneditierung wurden Zellen der Zelllinien A549 und 1205Lu mit einer Dichte von 3×10^5 Zellen pro *Well* im 6-*Well* Format ausgesät und mit dem für eSpCas9 und der entsprechenden sgRNA kodierenden Plasmid und TransIT-X2 transfiziert. Da das Plasmid unter anderem auch eine Puromycin-kodierende Kassetten enthielt, konnte die Selektion transfektions-positiver Zellen mittels $2 \mu\text{g/ml}$ Puromycin erfolgen. Nach täglichem Wechsel von Puromycin-enthaltendem DMEM wurde am fünften Tag nach Transfektion frisches, nicht Puromycin enthaltendes Medium den Zellen zugeführt. Nach einer ersten Runde der Antibiotikaselektion erfolgte die Generation von Einzelzellklonen mittels Grenzverdünnung. Als Zielkonzentration wurde 0,5 Zellen/*Well* gewählt. Die aus Einzelzellklonen heranwachsenden Zelllinien wurden durch T7-Endonukleasescreening vorselektioniert und durch paralleles Sequenzieren der CRISPR-Zielregion in einem NGS-Ansatz mittels MiSeq™ und Immunoblotting auf den erfolgten KO von TRIM9 überprüft.

2.2.2.5 Mutationsscreening: T7-Endonuklease-Assay und Sequenzierung

Nach Gen-Editierung mittels CRISPR/Cas9 wurde zwecks primärer Einschätzung der Effektivität dieser Methode ein T7-Endonukleasescreening durchgeführt. Das Konzept dieses Assays beruht auf der Fähigkeit der T7-Endonuklease-1 (T7E1) Basenfehlpaarungen innerhalb eines DNA-Doppelstranges zu erkennen und die vorliegende DNA am Ort der Fehlpaarung in zwei Teile unterschiedlicher Größe zu schneiden.

Voraussetzung für den Verdau sind die Isolation der zu analysierenden DNA und die Amplifikation des spezifischen DNA-Fragmentes, welches die CRISPR-Zielregion

enthält. Durch Mischen und folgende Denaturierung der doppelsträngigen PCR Fragmente der Zielregion aus geneditierten CRISPR-Klonen und WT-Zellen und anschließendem *Re-Annealing* der Einzelstränge entstehen bei Anlagerung je eines mutierten und nicht-mutierten Stranges ein sogenannter Heteroduplex. Dieser kann im Prozess des T7-Endonuklease-Verdau durch die T7E1 erkannt und zerschnitten werden. Nach Auftrennung der Fragmente mittels Gelelektrophorese kann dieser Heteroduplex von Homoduplexen durch das Vorhandensein zweier zusätzlicher Banden abgegrenzt werden.

Protokoll:

Zunächst erfolgte die DNA-Extraktion aus einem Aliquot der verschiedenen Zellklone aus dem 24-Well Format durch Resuspension der Zellen in 100 μl *QuickExtract™ DNA Extraction Solution*. Anschließend wurde folgendes Erwärmungsprotokoll durchlaufen:

1	68 °C	17 min
2	95 °C	8 min
3	4 °C	–

Die Amplifikation des zu analysierenden und die CRISPR-Zielregion enthaltenden DNA-Fragmentes erfolgte in folgendem PCR Ansatz nach vorgegebenem Schema mit 35 Zyklen der Schritte zwei bis vier. Hierbei wurde als *template* die zu analysierende DNA und WT DNA zugefügt wie oben beschrieben.

50 μl PCR Ansatz:

10 μl	5x Q5 Reaction Buffer
21 μl	10 mM dNTPs
2,5 μl	forward Primer (10 μM)
2,5 μl	reverse Primer (10 μM)
1 μl	template DNA (< 250 ng)
0,1 μl	Q5 High-Fidelity DNA Polymerase
10 μl	Q5 High GC Enhancer

2,9 μ l	ddH ₂ O
-------------	--------------------

Die hierbei verwendeten Primersets waren wie folgt:

TRIM9s	CACATACAACGCTCGGGTCAAG	CTCTCTAAAGGCAGGAGAGGAAC
TRIM9l	AATTGGGGTCCTCCTCGACTTA	CATATCTTGGTCTGGGCCTTACG
TRIM9B	GTGCTGGACAAGACGGGC	TAGTCATAGTCGGAGACCCCGGA

1	Initiale DNA Denaturierung	98 °C	1 min
2	DNA Denaturierung	98 °C	15 s
3	Anlagerung der <i>Primer</i>	65 °C	30 s
4	Polymerisierung	72 °C	10 s
5	Finale Erweiterung	72 °C	5 min
6	Probenkühlung	4 °C	Pause

Im nächsten Schritt wurde das *Annealing* der Einzelstränge durch Zugabe von 2 μ l *NEB Buffer 2* und 8 μ l ddH₂O zu 10 μ l DNA eingeleitet und folgendes Erwärmungsprogramm durchlaufen:

95 °C	10 min
95 °C- 85 °C	-2 °C/s
85 °C	1 min
85 °C- 75 °C	-0,3 °C/s
75 °C	1 min
75 °C- 65 °C	-0,3 °C/s
65 °C	1 min
weitere Reduktion um -3°C/s und alle -10 °C 1 min Pause bis 4 °C	

Die Zugabe von 0,5 μ l NEB T7E1 und Inkubation bei 37 °C für 10 min initiiert schließlich die Trennung an der Position der vorhandenen Basenfehlpaarung. Das Vorhandensein zusätzlicher Banden in der Agarose-Gelelektrophorese von ca. 200 und 400 Nukleotiden zeigte somit Mutationen in der CRISPR-Zielregion an. Die so ausgewählten Proben konnten schließlich mittels MiSeq™-System weiter analysiert und sequenziert werden. Beim MiSeq™-System handelt es sich um die Illumina-Sequenzierung, eine Art des *Next Generation Sequencing*. Nach mechanischer Fragmentation der DNA in Segmente von ca. 300 bp Länge erfolgt die Ligation von Adaptern an beide Enden des Fragments. Über die Adapter werden die DNA-Fragmente auf einer Platte gebunden, auf der sich bereits die ebenfalls gebundenen komplementären *Primer* befinden. Die Vervielfältigung der DNA-Fragmente erfolgt mittels Brücken-PCR. Durch Wiederholung der Amplifikation entstehen auf der Platte unterscheidbare *Cluster* einer identischen Sequenz. Nach Zugabe eines *Primers*, einer Polymerase und gelabelten dNTPs, erfolgt die Sequenzierung nach dem Prinzip „*Sequencing-by-Synthesis*“. Nach Einbau eines gelabelten Nukleotids, unterbricht die Synthese, bis das *Label* enzymatisch abgespalten ist und von der *Software* registriert wurde. Der Vergleich zum Referenzgenom erlaubt die Identifikation der vorliegenden Varianten.

2.2.2.6 Entwicklung und Verifizierung neuer 1205Lu und A549 TRIM9 Knockout-Zellen

Exemplarisch wird am Beispiel der neu etablierten *single isoform knockouts* (SIKO) in der Zelllinie A549 für den TRIM9I Knockout die Verifizierung mittels MiSeq™ und zugehörigem Immunoblot gezeigt (Abb. 16). Die Klone 1, 5, 7, 23, 31 und 40 stellten sich hierbei als homozygote oder heterozygote Knockouts (*out-of-frame Indels*) der langen Isoform von TRIM9 heraus. Komplette KOs beider TRIM9 Isoformen werden im folgenden Text *double isoform knockout* (DIKO) bezeichnet.

Die verschiedenen Einzelzellklone wurden mittels T7-Endonukleaseverdau, Sequenzierung des CRISPR-Zielabschnittes und Immunoblotting mit TRIM9 Proteintech Antikörper auf den erfolgten Knockout der kurzen (Abb. 17), langen (Abb. 18) oder beider Isoformen von TRIM9 (Abb. 19) überprüft.

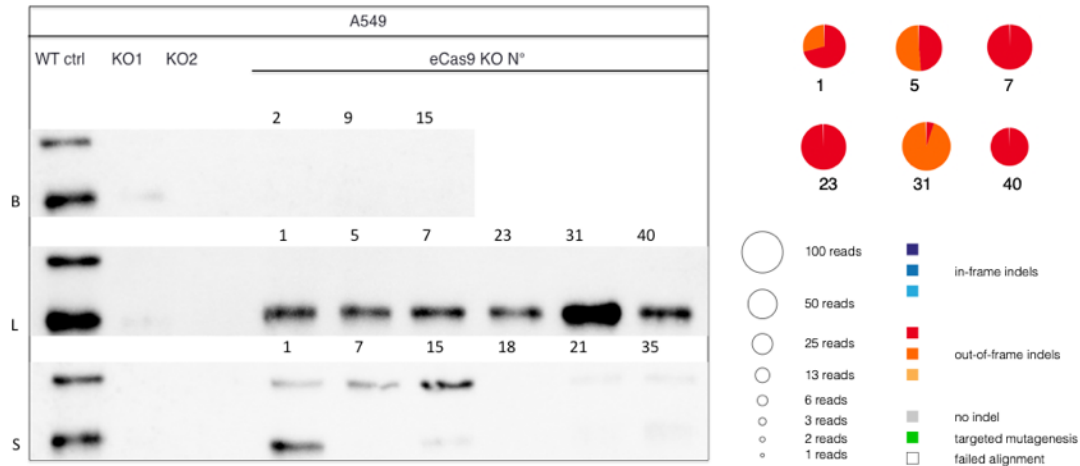


Abbildung 16: Die Klone 1, 5, 7, 23, 31 und 40 stellten sich als positive Knockouts der langen Isoform von TRIM9 in A549 Zellen heraus.

Nach Vorselektion mittels T7-Endonukleaseverdau, wurden die aus Einzelzellklonen generierten Zelllinien mittels Sequenzierung des CRISPR-Zielabschnittes und Immunoblotting mit TRIM9 Proteintech Antikörper auf den erfolgten Knockout der langen Isoform von TRIM9 überprüft.

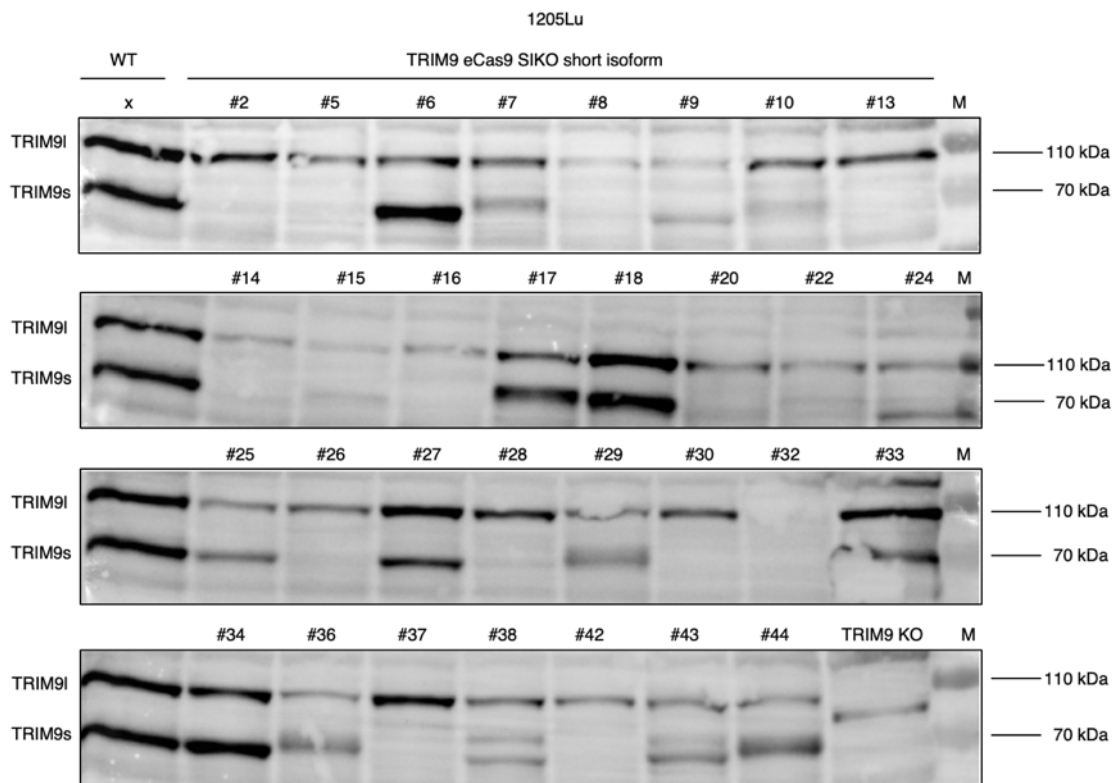


Abbildung 17: Die Klone # 2, 5, (8), 13, (16), 26, 28, 30, 37, 42 stellten sich als positive Knockouts der kurzen Isoform von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.

Nach Vorselektion mittels T7-Endonukleaseverdau, wurden die aus Einzelzellklonen generierten Zelllinien mittels Sequenzierung des CRISPR-Zielabschnittes und Immunoblotting mit TRIM9 Proteintech Antikörper auf den erfolgten Knockout der kurzen Isoform von TRIM9 (SIKO TRIM9s) überprüft.

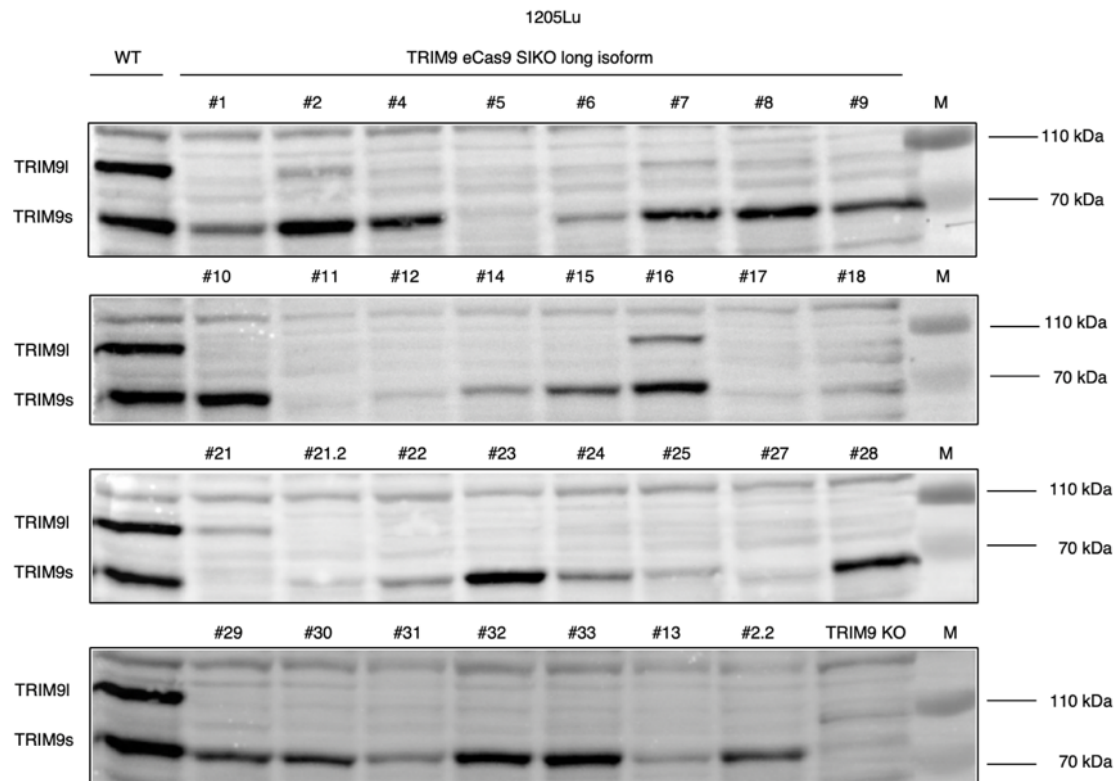


Abbildung 18: Die Klone # 1, 4, (6), 7, 8, 9, 10, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 29, 30, (31), 32, 33, (13), 2.2 stellten sich als positive Knockouts der langen Isoform von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.

Nach Vorselektion mittels T7-Endonukleaseverdau, wurden die aus Einzelzellklonen generierten Zelllinien mittels Sequenzierung des CRISPR-Zielabschnittes und Immunoblotting mit TRIM9 Proteintech Antikörper auf den erfolgten Knockout der langen Isoform von TRIM9 (SIKO TRIM9I) überprüft.

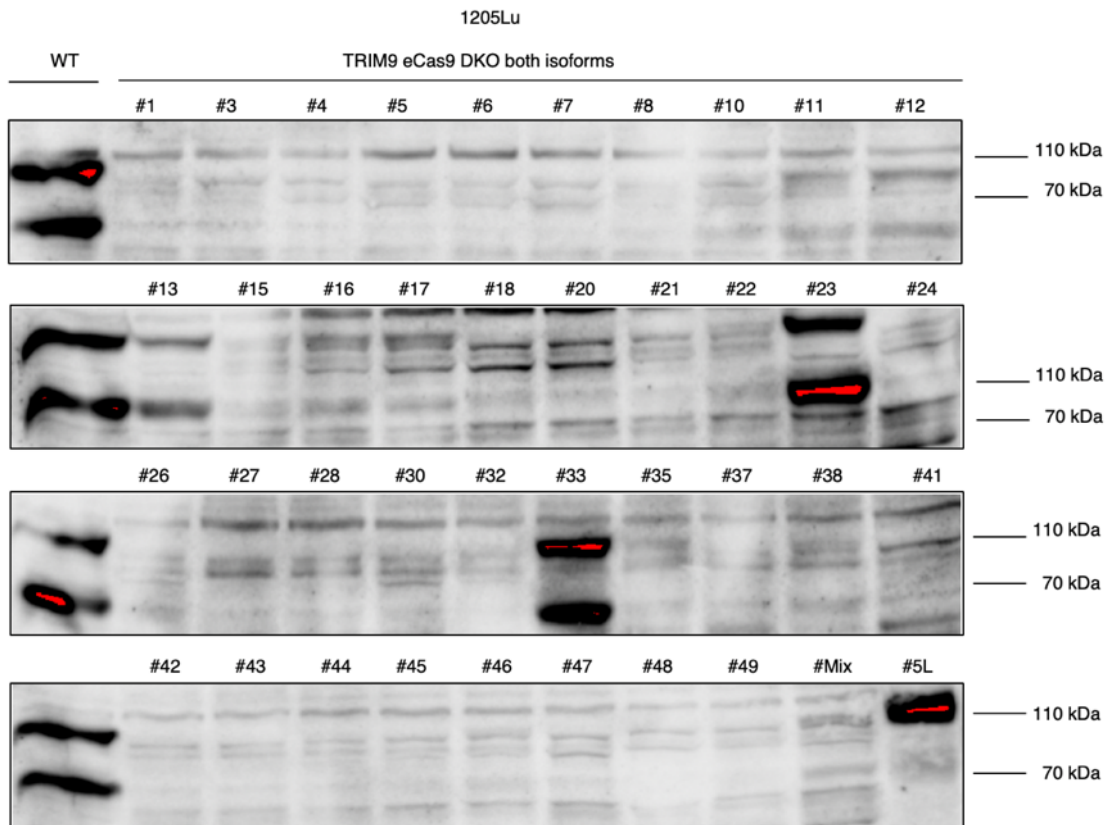


Abbildung 19: Die Klone # 1, 4, 6, 8, 21, 22, 26, 42, 43, 44 stellten sich als positive Knockouts beider Isoformen von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.

Nach Vorselektion mittels T7-Endonukleaseverdau, wurden die aus Einzelzellklonen generierten Zelllinien mittels Sequenzierung des CRISPR-Zielabschnittes und Immunoblotting mit TRIM9 Proteintech Antikörper auf den erfolgten Knockout beider Isoformen von TRIM9 (DIKO) überprüft.

2.2.2.6 Statistische Analyse

Die Anzahl der Wiederholungen eines Experimentes wurden durch $n=1,2,3,\dots$ für jedes Experiment angegeben. Fehlerdarstellungen erfolgten durch Angabe des *standard error of the mean* (SEM). Bei $n > 3$ wurde die Signifikanz des Experimentes bei Normalverteilung der biologischen Messwerte durch einen zweiseitigen, gepaarten *t-Test* untersucht. Bei nicht normalverteilten Messwerten wurde auf den zweiseitigen *Mann-Whitney-U-Test* zurückgegriffen. Die statistische Analyse wurde mit dem Programm GraphPad Prism durchgeführt. Die Signifikanzniveaus sind in den folgenden Abbildungen mittels p-Wert separat angegeben.

Ergebnisse

3.1 Nachweis von TRIM9 in murinen Hirn- und Leberpräparaten sowie humanen Leberpräparaten, 1205Lu Zellen und Monozyten

Wie in der Einleitung dargestellt, variieren die Mitglieder der TRIM Protein Familie enorm in ihrem Expressionsmuster und ihrer Funktion. Nur ungefähr die Hälfte aller TRIM Proteine zeigt dabei eine ubiquitäre Expression auf. Auch TRIM9 kann zumindest auf mRNA Ebene in verschiedenen humanen Geweben, wie Leber, Haut, Wirbelsäule, Retina, Herz und Prostata mittels RNA *Sequencing* (RNAseq), Microarray und SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*) nachgewiesen werden (Uhlen, et al. 2015). In humanen und murinen Proben imponiert vor allem die hohe Expressionsrate im Hirngewebe, welche mit den beschriebenen neuronalen Funktionen von TRIM9 korreliert (Tanji, et al. 2010). In Vorarbeiten der AG Rothenfußer konnte die Expression von TRIM9 auf Proteinniveau in Hirnlysaten der Maus mittels Western Blot bestätigt werden. In Bezug auf die Expression von TRIM9 in der murinen Leber war der Proteinnachweis mittels Western Blot nicht möglich, es zeigte sich jedoch ein Signal auf RNA-Ebene.

3.1.1 TRIM9 lässt sich mittels Immunhistochemie im Hirngewebe der Maus und sowohl murinen als auch humanen Leberschnitten nachweisen und zeigt dabei ein zytoplasmatisches Expressionsmuster

Um die Expression von TRIM9 in murinen und humanen Geweben zu untersuchen, wurden in Kooperation mit Prof. Dr. med. Doris Mayr am Pathologischen Institut der LMU München eine immunhistochemische Färbung mit einem polyklonalen TRIM9 (Hase IgG) Antikörper der Firma Proteintech etabliert. Die Spezifität der Färbung für humane Zellen wurde dabei anhand der Färbung von 1205Lu Wildtypzellen und deren TRIM-9-defizienten und TRIM-9-überexprimierenden Varianten überprüft (Abb. 20). 1205Lu WT Zellen zeigen dabei eine deutliche zytoplasmatische braune Färbung, die in 1205Lu TRIM9-KO Zellen fehlt, in TRIM9-überexprimierenden 1205L Zellen jedoch noch intensiver nachzuweisen war. Bei murinen Hirn- und Leberpräparaten konnten entsprechende Schnitte aus den Geweben von TRIM9-KO Mäusen als Kontrollen für die Etablierung der Färbung dienen (Abb. 21). Gewebsschnitte aus Hirn und Leber der Maus sowie humane Leberschnitten wurden dann mit diesem Protokoll gefärbt.

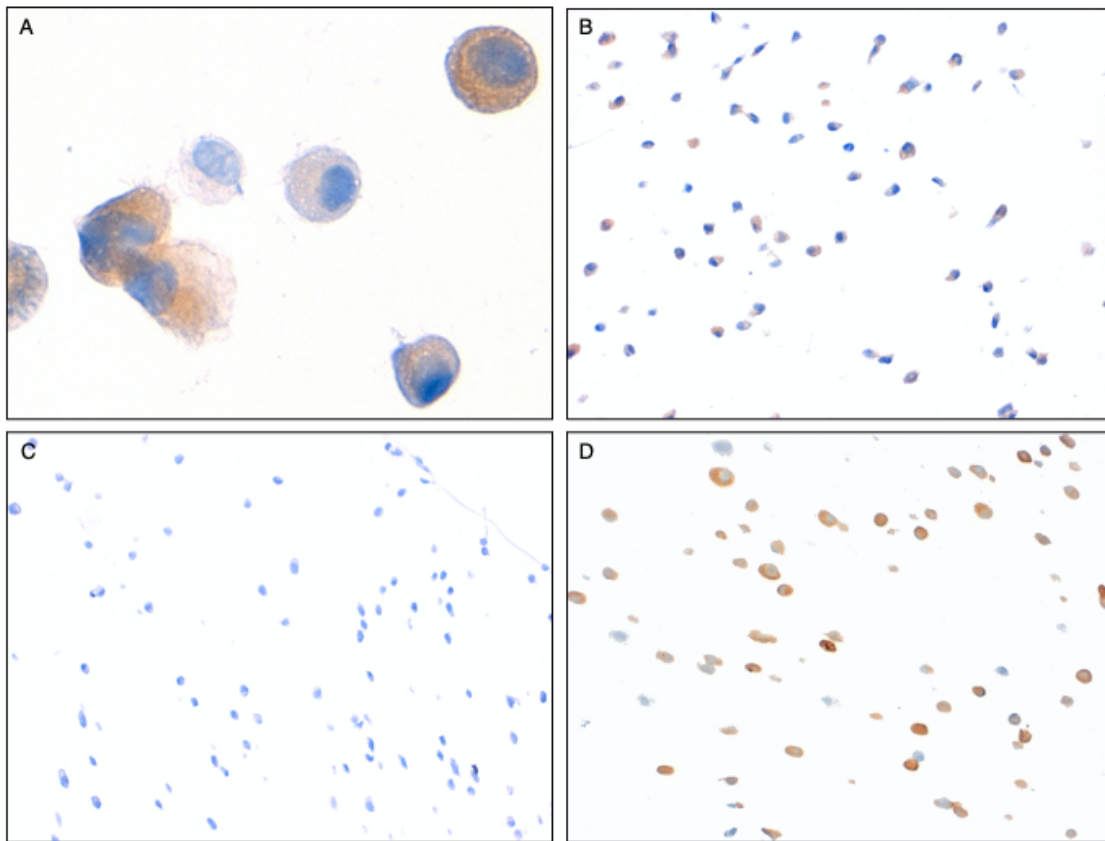


Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von 1205Lu Wildtyp, 1205Lu TRIM9-KO und 1205Lu TRIM9-OE-Zellen mit TRIM9 Antikörper.

(Verdünnung 1:1700; Auflösung 63x/0,75) Nach der Einbettung von (A und B) 1205Lu WT, (C) 1205Lu TRIM9-KO und (D) 1205Lu-TRIM9-OE Zellen in Paraffin und Anfertigung verschiedener Paraffinschnitte mittels Mikrotom, wurde eine immunhistochemische Färbung mit TRIM9 Antikörper (Primärantikörper TRIM9 polyklonal Hase IgG, Proteintech und Sekundärantikörper Ziege Anti-Hase IgG-Antikörper HRP-konjugiert, Biorad) hergestellt. TRIM9 ist intrazellulär in bräunlicher Färbung sichtbar.

Die Hirnpräparate (Abb. 21 A und B) wiesen eine vermehrte bräunliche Färbung von Neuronen im Bereich des Cortex cerebri auf, während die Färbung in der Medulla etwas schwächer imponierte. Der Nachweis von TRIM9 war vor allem im Zytoplasma und den proximalen Dendriten der Pyramidenzellen, jedoch auch in Korb- und Körnerzellen möglich. Bei den TRIM9 positiven Zellen zeigt sich eine meist gleichmäßig verteilte zytoplasmatische Färbung. Wie in den Hirnpräparaten konnte auch in den Leberschnitten (Abb. 21 C und D) eine vermehrte bräunliche Färbung in der murinen WT Leber gesehen werden, die in den Leber-Schnitten von TRIM9-defizienten Tieren so nicht zu sehen war. Die Verteilung des Antikörpers deutete hier auf ein zytoplasmatisches Vorkommen von TRIM9 in Hepatozyten hin. Auffällig war insgesamt, dass die zytoplasmatische bräunliche Färbung und somit die Expression des Proteins

TRIM9 sich in Hirnzellen intensiver darstellte als in Hepatozyten und somit auf eine vermehrte Genexpression im murinen Gehirn im Vergleich zur murinen Leber rückzuschließen ist.

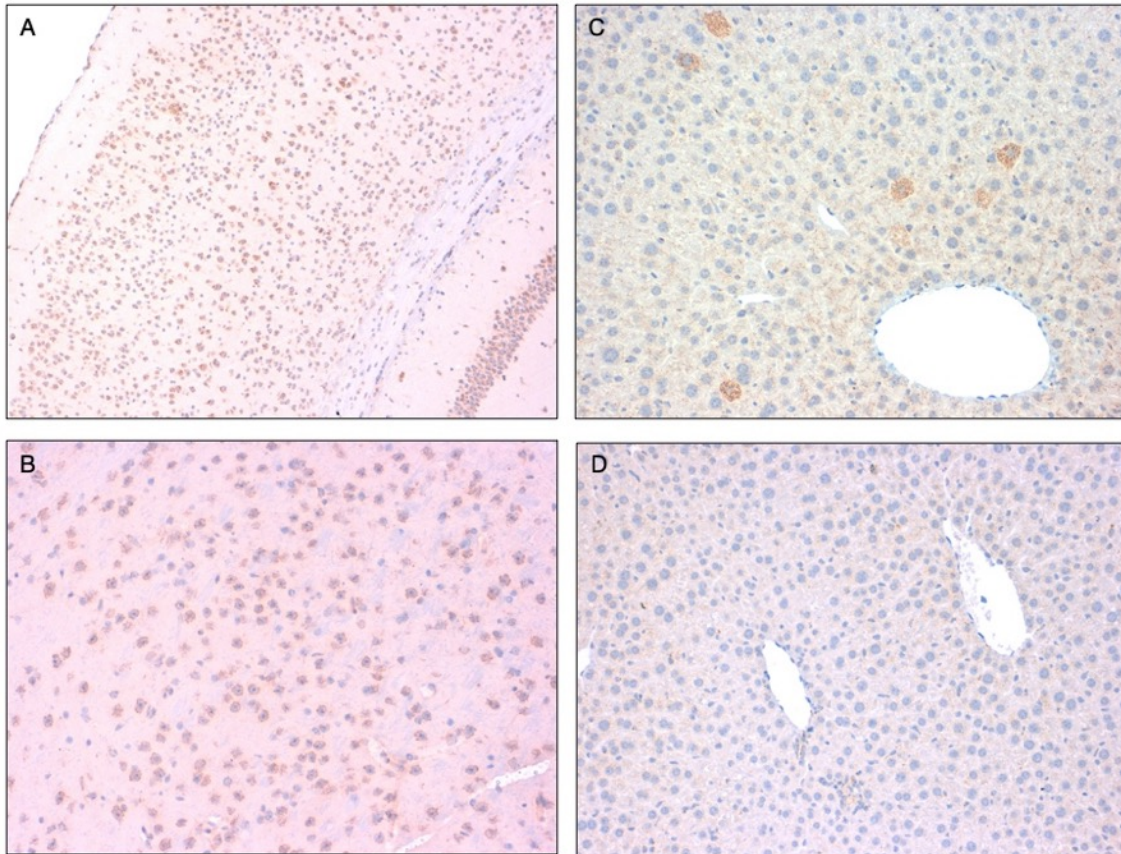


Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung muriner Hirn- und Leberschnitte mit TRIM9 Antikörper.

(Verdünnung 1:100, Auflösung A 10x/0,25 und B, C, D 20x) Nach der Gewebeentnahme aus (A, B und C) WT und (D) TRIM9-KO Mäusen im Labor, wurden die (A und B) Hirn- und (C und D) Leber-Präparate mittels Formol chemisch fixiert und anschließend in Paraffinwachs eingebettet. Nach Anfertigung verschiedener Paraffinschnitte mittels Mikrotom und anschließender immunhistochemischer Färbung mit TRIM9 Antikörper (Primärantikörper TRIM9 polyklonal Hase IgG, Proteintech und Sekundärantikörper Ziege Anti-Hase IgG-Antikörper HRP-konjugiert, Biorad), konnte das Protein intrazellulär in bräunlicher Färbung sichtbar gemacht werden. Hier ist die TRIM9-Expression im (A und B) Cortex cerebri von Wildtyp Mäusen und im (C) Leberpräparat einer TRIM9 WT bzw. einer (D) TRIM9 KO Maus dargestellt.

Bei der weiteren Untersuchung der Proteinexpression von TRIM9 in humanen fibrotischen Lebergewebepräparaten, die teilweise mit HCC-Zellen infiltriert waren, war TRIM9 in den Hepatozyten im Fibrosegewebe im Vergleich zu murinen Hepatozyten deutlich vermehrt nachzuweisen. Im Hepatozellulären Karzinom (HCC) Gewebe zeigten sich nur noch vereinzelt Zellen klar positiv, insgesamt war hier ein deutlich reduzierter Nachweis von TRIM9 möglich und die Verteilung imponierte recht inhomogen (Abb. 22).

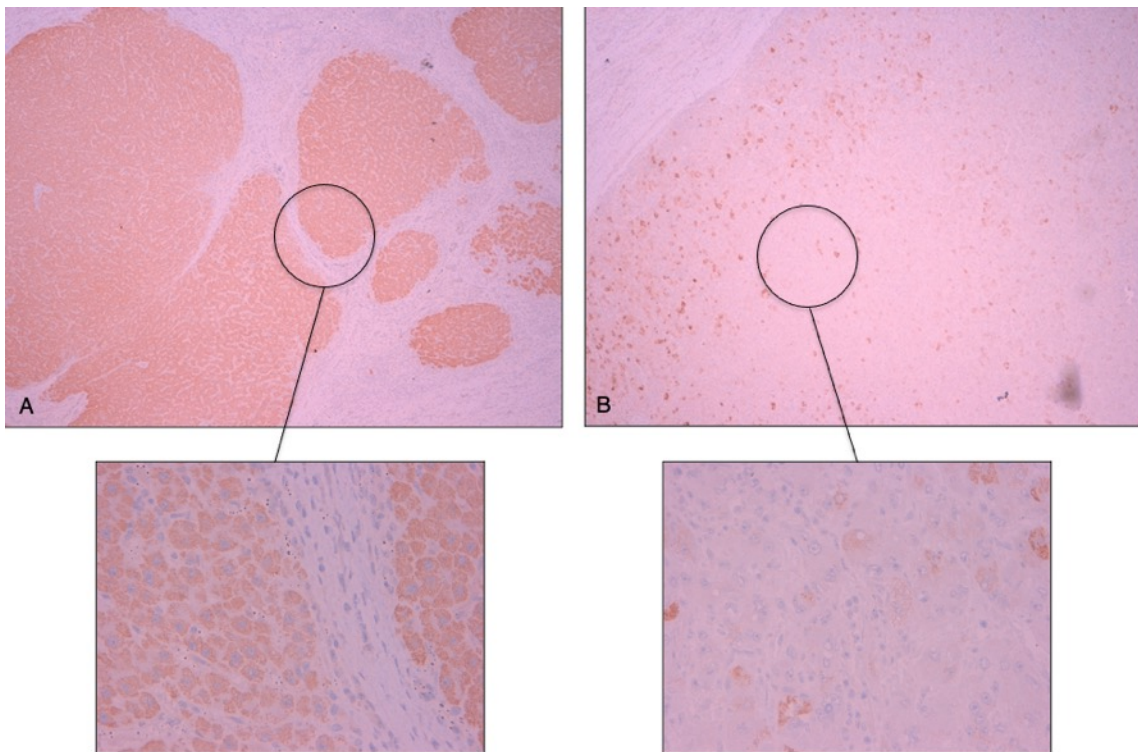


Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines teilweise karzinomatösen Leberpräparates mit TRIM9 Antikörper.

(Auflösung A&B 4x/0,10 und Zoom 40x/0,65) Nach der Gewebepreparation eines (A) teilweise gesunden und (B) teilweise von Tumorgewebe (HCC) durchsetztem Leberpräparates erfolgte die chemische Fixation mittels Formol und anschließend die Einbettung in Paraffinwachs. Nach Anfertigung verschiedener Paraffinschnitte mittels Mikrotom und anschließender immunhistochemischer Färbung mit TRIM9 Antikörper Primärantikörper TRIM9 polyklonal Hase IgG, Proteintech und Sekundärantikörper Ziege Anti-Hase IgG-Antikörper HRP-konjugiert, Biorad), konnte das Protein intrazellulär in bräunlicher Färbung sichtbar gemacht werden.

3.1.2 Trim9 kommt in der humanen Melanomzelllinie 1205Lu in zwei Isoformen TRIM9l und TRIM9s vor und wird in CD14-positiven primären humanen Monozyten exprimiert

In den durchgeführten Experimenten wurde vor allem mit drei verschiedenen humanen Zelllinien gearbeitet. Die meisten Versuche wurden mit der humanen Melanomzelllinie 1205Lu und der humanen Adenokarzinomzelllinie der Lunge A549 sowie mit der humanen hepatozellulären Karzinomzelllinie Huh7.5 durchgeführt. In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe wurden schon mehrere TRIM9-KO Klone hergestellt und als solche verifiziert. Die Verifizierung erfolgte mittels Western Blot. Damit konnte in WT Zellen eine endogene TRIM9 Expression dargestellt werden, während diese in den TRIM9-defizienten Subklonen fehlen. In 1205Lu WT Zellen gelang es (Abb. 23) sowohl TRIM9s knapp unterhalb der 70kDa Bande und TRIM9l auf Höhe von 110 kDa zu

identifizieren. Somit konnte erneut nachgewiesen werden, dass es mindestens zwei verschiedene Isoformen von TRIM9 gibt.

Um zu untersuchen, ob individuelle Unterschiede in der Expression von TRIM9 existieren, wurde in einem weiteren Experiment das Vorhandensein von TRIM9 in humanen Monozyten analysiert. Die Expressionslevel in PBMCs und mittels *Magnetic Cell Separation* (MACS) gewonnenen CD14-positiven Monozyten wurden verglichen.

Zwei verschiedene Protokolle wurden zur Hilfe genommen (Abb. 23). In beiden Fällen ließ sich nach Lyse der Zellen und anschließender Durchführung eines Western Blots mit TRIM9 Proteintech Antikörper eine Expression von TRIM9 in beiden Blutspendern nachweisen. Das zweite Verfahren mit MACS zeigte allerdings einen deutlich höheren Ertrag an (CD14+)-Zellen mit 97,2% (CD14+)-Zellen im Vergleich zu 66,3% (CD14+)-Zellen unter den adhärennten der über Nacht inkubierten Zellen.

Wir konnten somit zeigen, dass sich TRIM9 auch in humanen PBMCs und insbesondere in angereicherten Monozyten nachweisen lässt. Dabei überwiegt der Isotyp TRIM9l deutlich. Außerdem gibt es deutliche Schwankungen in der Expression von TRIM9 und dem Verhältnis der beiden Isoformen TRIM9l und TRIM9s zwischen den beiden Spendern. Der erste der beiden Spender wies diesbezüglich eine geringere Gesamtproteinkonzentration in Monozyten im Vergleich zum zweiten Spender auf, zeigte jedoch einen eindeutigen Nachweis beider TRIM9 Isoformen, während der zweite Spender v.a. die Isoform TRIM9l aufwies.

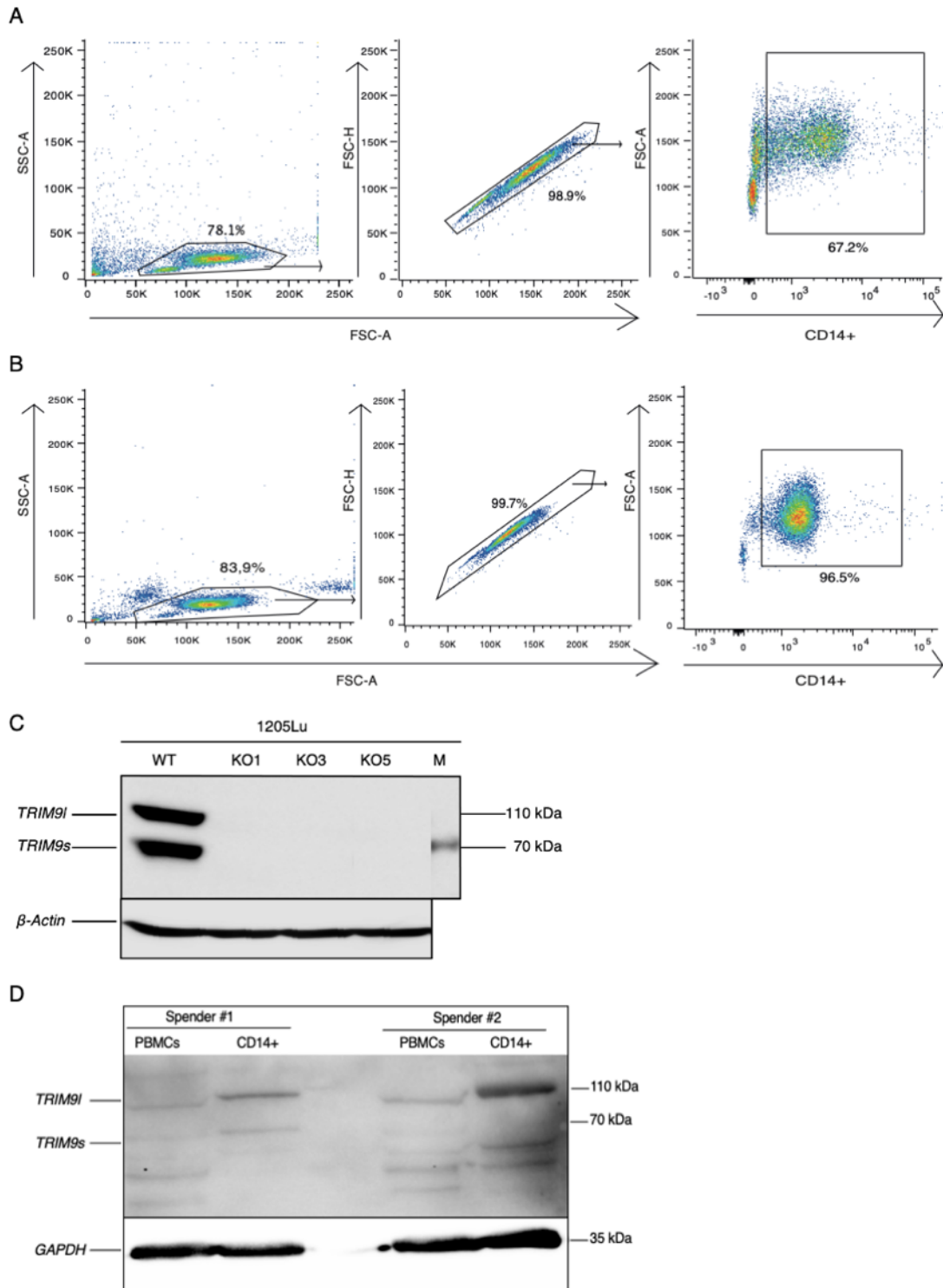


Abbildung 23: Trim9 kommt in der humanen Melanomzelllinie 1205Lu in zwei Isoformen (TRIM9I und TRIM9s) vor und wird in CD14-positiven primären humanen Monozyten exprimiert.

(A und B) Von zwei gesunden Spendern wurden PBMCs isoliert und Monozyten entweder mittels (A) Adhärenz über Nacht (Spender #1) oder (B) über eine positive Selektion von CD14+ Zellen mittels MACS (Spender #2) angereichert und der Prozentsatz CD14 positiver Zellen in den isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt. (C und D) Die unseparierten PBMCs und angereicherten Monozyten, sowie Wildtyp Melanomzelllinie 1205Lu und drei mittels CRISPR-Cas9 Geneditierung hergestellte TRIM-9-defiziente Subklone wurden lysiert, die Proteinfraction

über SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von TRIM9 im Western-Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde GAPDH bzw. β -Aktin verwendet. M = Marker.

3.2 Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Melanomzellen und A549 Bronchialepithelzellen hemmt sowohl die Replikation des negativ-Strang RNA Virus VSV als auch der positiv-Strang RNA Viren YFV17D, EMCV und Mengo Virus

In Vorarbeiten der AG Rothenfußer konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von TRIM9 zu einer signifikanten Reduktion der Virusreplikation nach Infektion mit (-)ssRNA Viren führt. Dies konnte durch Infektion von 1205Lu Melanomzellen mit dem (-)ssRNA Virus VSV-eGFP durch einen prozentuell höheren Anteil GFP-positiver und somit infizierter Zellen in der 1205Lu WT Kondition im Vergleich zu den TRIM9-defizienten 1205Lu Zellklonen bestätigt werden (Abb. 24 A, $p = < 0,0001$). Durch Infektion von 1205Lu WT und TRIM9-KO Zellen mit (+)ssRNA Viren wie YFV17D, *Encephalomyocarditis Virus* (EMCV) und zwei verschiedenen Stämmen des Mengo Virus (XNS und C12A/C22A) konnte die provirale Funktion von TRIM9 auch bei viraler Infektion mit positiv-Strang RNA Viren nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Infektion mit YFV17D führt (Abb. 24 B, $p = 0,0022$). Die Infektion der 1205Lu WT und TRIM9-KO Zellen mit Mengo XNS Virus ($p = 0,2857$), Mengo C12A/C22A Virus ($p = 0,1429$) und EMCV ($p = 0,0864$) zeigte zwar keine signifikanten Unterschiede, jedoch bildete sich auch hier der Trend einer Reduktion der Infektion in TRIM9-KO Zellen ab (Abb. 24 D-F). In Bezug auf die humane Bronchialkarzinomzelllinie A549 konnte nach Infektion von WT und TRIM9-defizienten Klonen zwar ein ähnlicher Trend im Sinne einer reduzierten Virusreplikation in KO Zellen beobachtet werden, jedoch zeigte sich hier der Unterschied ebenfalls ohne statistische Signifikanz ($p = 0,0527$).

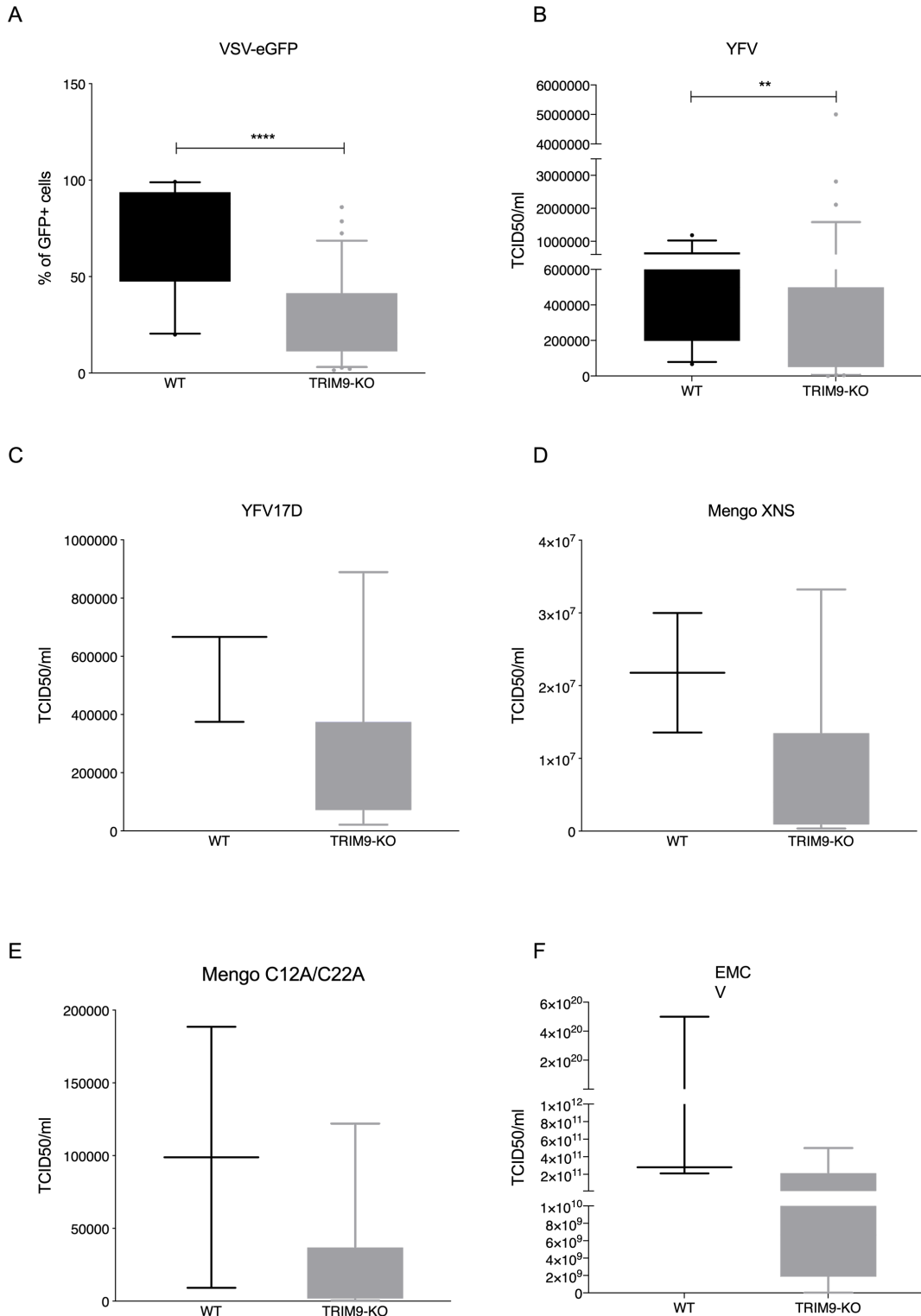


Abbildung 24: Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Melanomzellen und A549 Bronchialepithelzellen hemmt sowohl die Replikation des negativ-Strang RNA Virus VSV als auch der positiv-Strang RNA Viren YFV17D, EMCV und Mengo Virus.

Es erfolgte die Infektion von (A, B, D, E) 1205Lu WT und gepoolten Klonen von 1205Lu TRIM9-KO Zellen bzw. (C) A549 WT und A549 TRIM9-KO Zellen mit (A) (-)ssRNA Virus VSV-eGFP (Mol=0,1) für 24 Stunden und anschließender Fixation der infizierten Zellen und FACS Analyse auf GFP-positive Zellen bzw. eine Infektion mit (B, C) (+)ssRNA Virus YFV17D (Mol=0,1) für 72 Stunden, (D) Mengo XNS Virus (Mol=50), (E) Mengo C12A/C22A Virus (Mol=50) oder (F) EMCV Virus (Mol=1) jeweils für eine Dauer von 24 Stunden, Abnahme der

Zellkulturüberstände und Durchführung eines TCID₅₀. Dargestellt sind die Ergebnisse von mehreren unabhängigen Experimenten ($n \geq 3$), der Box-Plot zeigt das 5-95% Konfidenzintervall. Die statistische Signifikanz wurde mittels *Mann-Whitney-U-Test* analysiert (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$, **** für $p < 0,0001$).

Nachdem eine provirale Funktion von TRIM9 nach Infektion mit (-)ssRNA Virus im WT zu TRIM9KO Vergleich nachgewiesen wurde (Abb. 24), wurde der Infektionsprozess mit VSV-eGFP mikroskopisch genauer untersucht. Beim direkten konfokalmikroskopischen Vergleich von infizierten 1205Lu WT und 1205Lu TRIM9-KO Zellen konnte wiederholt eine Reduktion der Infektion im Sinne einer visuell sichtbaren Verringerung der Anzahl an grün-fluoreszierenden Zellen bei Abwesenheit von TRIM9 gezeigt werden (Abb. 25). Um die Aktivierung antiviraler Signalwege durch die Virusinfektion entlang des IRF3 Signalweges zu verfolgen, erfolgte ein Proteinnachweis mittels Western Blot von IRF3 und phospho IRF3- (pIRF3) nach Infektion von 1205Lu WT und TRIM9-defizienten Zellen mit VSV-eGFP. Nach Virusinfektion untergeht IRF3 an mehreren Serin- und Threoninresten einer posttranslationalen Phosphorylierung, die zu einer Translokation von pIRF3 vom Zytoplasma in den Zellkern führt und dort einen Anstieg der Transkription mehrerer antiviraler Botenstoffe bewirkt (Lin R 1998).

Es konnte beobachtet werden, dass in Abwesenheit von TRIM9 die Phosphorylierung von IRF3 zwölf Stunden post infectionem (p.i.) mit (-)ssRNA Virus VSV-eGFP im Vergleich zur Phosphorylierung von IRF3 in den infizierten 1205Lu WT Zellen stark vermindert ist. Erst 24 Stunden p.i. setzt die Phosphorylierung von IRF3 verstärkt ein. Die Intensität der pIRF3 Bande 24 Stunden p.i. übertrifft in den 1205Lu TRIM9-KO Zellen die der WT Zellen. Gleichermäßen beschreiben auch die Immunfluoreszenzaufnahmen der mit VSV-eGFP infizierten Zellen diese Verzögerung der Infektion mit (-)ssRNA Virus in TRIM9-KO Zellen im Vergleich zu WT Zellen. Zwölf Stunden p.i. ist visuell eine vermehrte Infektion der WT Zellen zu erkennen, die jedoch 24 Stunden p.i. auch in den TRIM9-KO Zellen zunimmt. Somit führt das Fehlen von TRIM9 führt zu einer verzögerten Virusreplikation und verzögerten Aktivierung von IRF3.

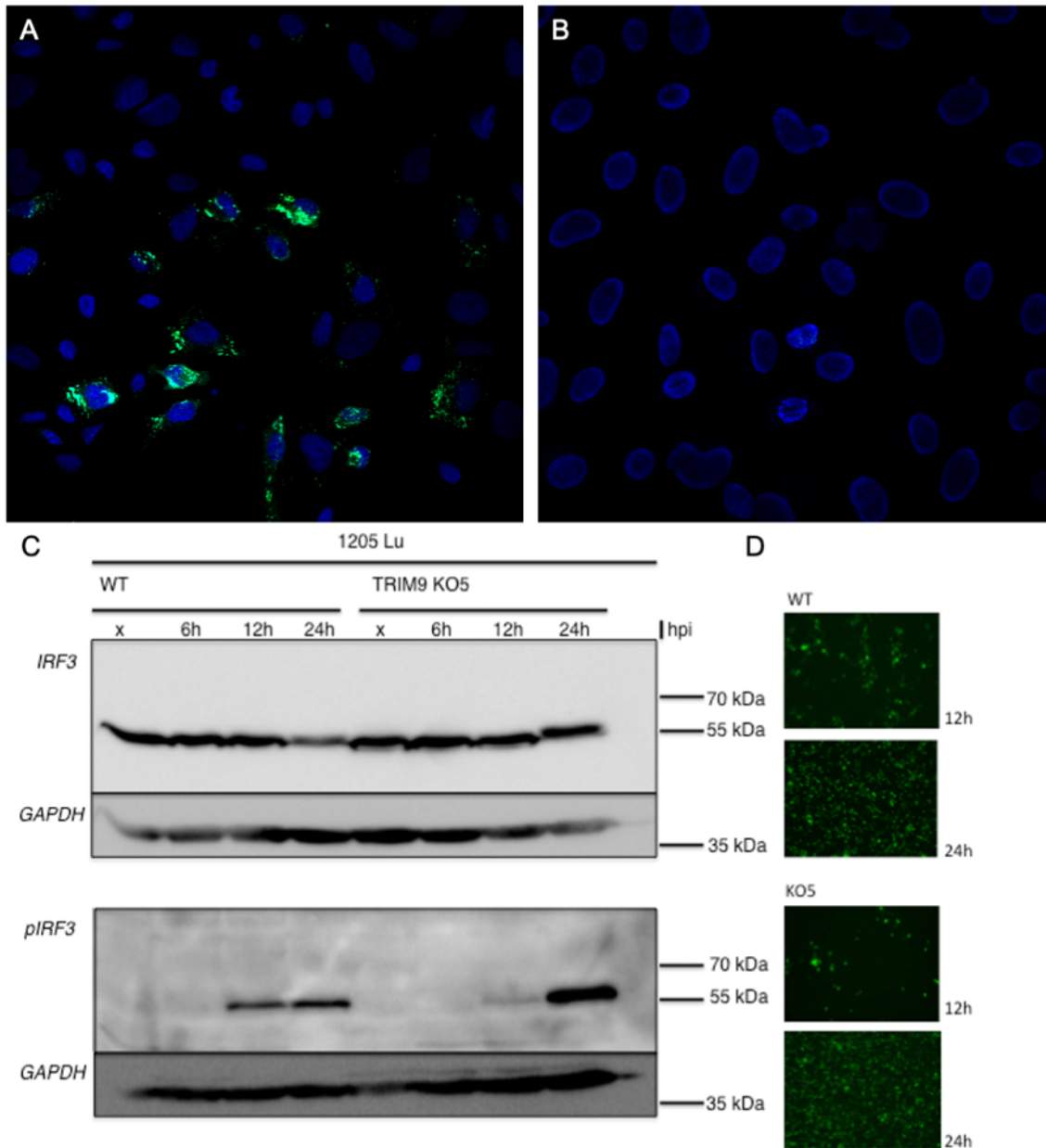


Abbildung 25: Das Fehlen von TRIM9 führt zu einer verzögerten Virusreplikation und verzögerten Aktivierung von IRF3.

(A) 60.000 1205Lu WT und (B) 1205Lu TRIM9-KO Zellen wurden im 24-Well Format ausgesät und mit VSV-eGFP (Mol=5,0) für 24 Stunden infiziert. Die *Cover Slips* wurden auf Objektträgern fixiert und für die Konfokalmikroskopie verwendet. (C) Infektion von 1205Lu WT und TRIM9-KO5 Zellen mit VSV-eGFP, anschließende Lyse sechs, zwölf und 24 Stunden p.i. gefolgt von PAGE und der Anfertigung eines Western Blots auf IRF3 und pIRF3. (D) Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen zudem mittels Immunfluoreszenzmikroskopie dargestellt.

3.3 Beide, sowohl die lange als auch die kurze Isoform von TRIM9 sind erforderlich, um Virusreplikation zu erleichtern.

Mit Hilfe der etablierten TRIM9 Isoform-defizienten Zelllinien sowie den Überexpressionsmodellen der einzelnen TRIM9-Isoformen konnte der Effekt der einzelnen Isoformen von TRIM9 auf die Virusreplikation genauer untersucht werden. Nach Infektion mit YFV17D von TRIM9 WT, TRIM9-KO Zelllinien mit Fehlen beider TRIM9 Isoformen oder Fehlen entweder nur der langen oder nur der kurzen TRIM9 Isoform (für die Generierung und Validierung der Zelllinien s. Methodenteil) sowie TRIM9-KO Zellen, in denen Doxycyclin-induziert die einzelnen Isoformen von TRIM9 re-exprimiert wurden, wurde nach 72 Stunden die Virusreplikation mittels TCID50 quantifiziert. In A549 Zellen (Abb. 26 A) zeigte sich eine signifikante Inhibition der Virusreplikation sowohl in Zelllinien mit Fehlen beider Isoformen von TRIM9 ($p = 0,0238$), als auch in Zelllinien mit Fehlen von entweder nur der langen Isoform von TRIM9 ($p = 0,0442$, Lmix entspricht den gepoolten Klonen SIKO #5, 23, 40) oder nur der kurzen Isoform von TRIM9 ($p = 0,0449$, S7). In einem zweiten Schritt wurde in 1205Lu TRIM9 Überexpressionszelllinien gezeigt, dass durch separate Rekonstitution der einzelnen Isoformen von TRIM9 (5s bzw. 5l) in TRIM9-defizienten Zellen die Virusreplikation nicht vollständig auf das Niveau von WT Zellen zurückgebracht werden konnte (Abb. 26 B). In 1205Lu WT Zellen zeigte sich im Vergleich zum TRIM9-defizienten Klon KO5 eine signifikant gesteigerte Virusreplikation ($p = 0,0337$). Die Einzelisoform-Überexpressionsklone zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede der Virusreplikation im Vergleich zu WT und KO Zellen, jedoch eine visuell gesteigerte Virusreplikation vor allem nach Überexpression der kurzen Isoform von TRIM9 (5s). Einzig durch Re-expression beider TRIM9-Isoformen konnte die Virusreplikation im Vergleich zur TRIM9-defizienten Zelllinie signifikant gesteigert werden ($p = 0,0382$, Abb. 26 C). Somit scheinen sowohl die lange als auch die kurze Isoform von TRIM9 erforderlich, um die Virusreplikation zu erleichtern und wieder auf das Niveau in WT Zellen anzugleichen.

Die insuffiziente Rekonstitution der Virusreplikation durch alleinige Überexpression einzelner Isoformen von TRIM9 konnten wir ebenfalls konfokalmikroskopisch visualisieren. Hierfür erfolgte die Induktion von mCherry-markierten 1205Lu Überexpressionszelllinien der einzelnen Isoformen von TRIM9 sowie Infektion dieser mit (-)ssRNA Virus VSVeGFP. Mittels Konfokalmikroskopie konnte eine nur minimal gesteigerte Infektion der Einzelisoform-überexprimierenden Zielzellen im Vergleich zu uninferierten Zelllinien bestätigt werden (Abb. 27).

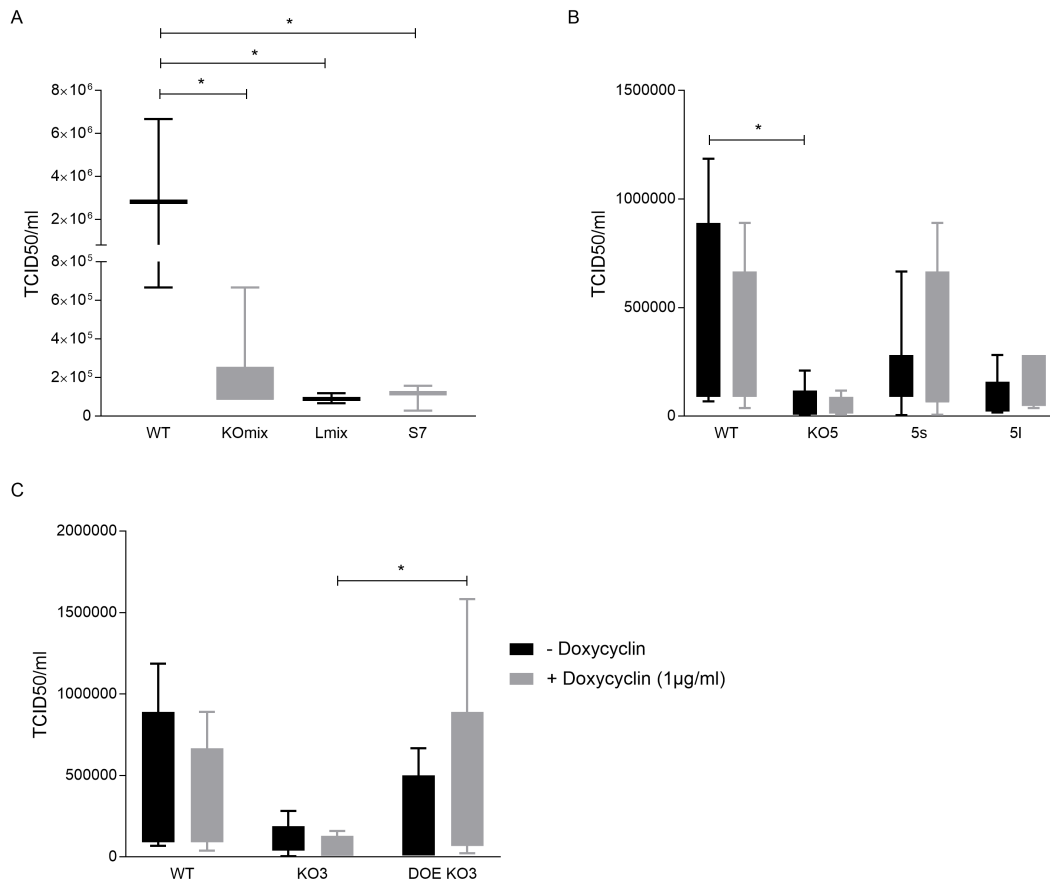


Abbildung 26: Beide, sowohl die lange als auch die kurze Isoform von TRIM9 sind erforderlich, um die Virusreplikation zu erleichtern.

(A) Je 10.000 A549 WT, A549 Zellen mit Fehlen beider Isoformen (KOmix entspricht dem pool von sechs KO Klonen), A549 Zellen mit Fehlen nur der langen Isoform von TRIM9 (Lmix bezeichnet den Pool der Klone #5, 23, 40; siehe Methodenteil) und A549 Zellen mit Fehlen nur der kurzen Isoform von TRIM 9 (S7) sowie (B) 1205Lu WT Zellen, 1205Lu Zellen mit Fehlen beider Isoformen von TRIM9 (KO5) und 1205Lu defizienten Zellen mit Rekonstitution nur der kurzen (5s) bzw. nur der langen (5l) Isoform von TRIM9 bzw, (C) 1205Lu WT, 1205Lu Zellen mit Fehlen beider TRIM9-Isoformen (KO3) und TRIM9-defiziente Zellen mit Rekonstitution beider Isoformen (KO3 DOE) wurden nach Induktion der Überexpressionszelllinien mit Doxycyclin (1 µg/ml) für 24 Stunden im 96-Well Format ausgesät und mit YFV17D (Mol=0,1) für 72 Stunden infiziert und anschließend die Virusreplikation mittels TCID50 quantifiziert. Dargestellt sind die Ergebnisse von mehreren unabhängigen Experimenten (n=3), der Box-Plot zeigt das 5-95% Konfidenzintervall. Die statistische Signifikanz wurde mittels Ein- bzw. Zweiseitigem ANOVA- Test analysiert (* für p < 0,05, ** für p < 0,01, *** für p < 0,001, **** für p < 0,0001).

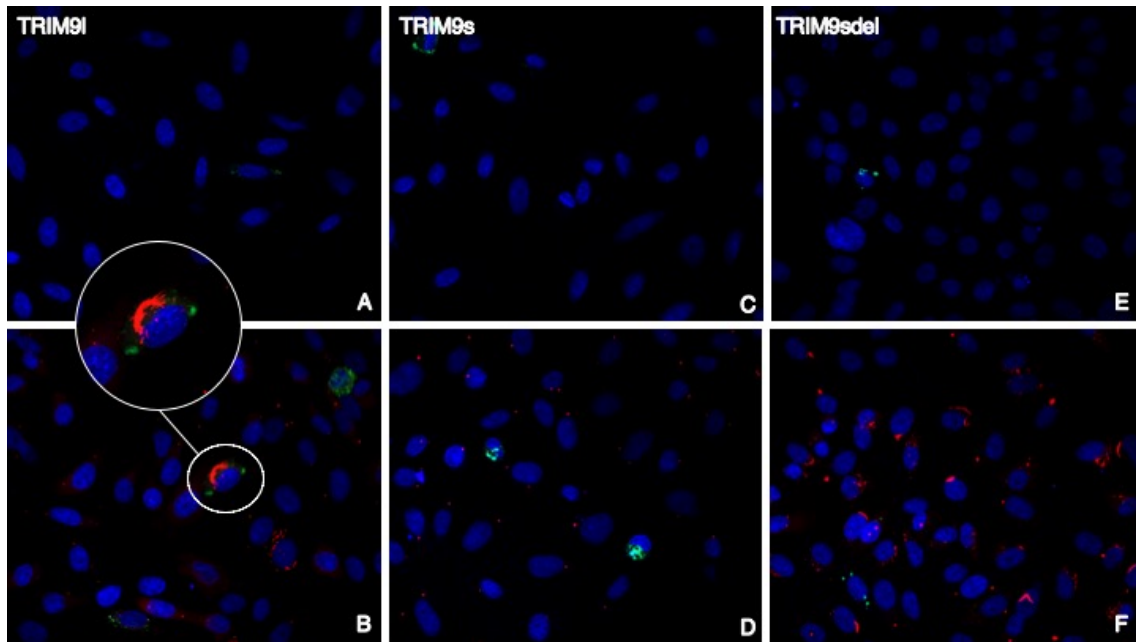


Abbildung 27: Die Induktion der einzelnen Isoformen von TRIM9 führt zu einer nur minimal gesteigerten Infektion der Zielzellen. Eine Kolokalisation von TRIM9 und VSV-eGFP kann nur vereinzelt beobachtet werden.

1205Lu HA-TRIM9I-mCherry (A und B) HA-TRIM9s-mCherry (C und D) und HA-TRIM9sdel-mCherry (E und F) Zellen wurden im 24-Well Format auf *Cover Slips* ausgesät und für 48 Stunden mit Doxycyclin ($1,0 \mu\text{g/ml}$) induziert (B, D, F) oder unstimuliert belassen (A, C, E). Anschließend wurden die Zellen für weitere 24 Stunden mit VSV-eGFP (Mol=5,0) infiziert und die *Cover Slips* auf Objektträgern fixiert, sodass die Zellen mittels Konfokalmikroskopie analysiert werden konnten.

3.4 Die kurze Isoform von TRIM9 hat eine kürzere Halbwertszeit als die lange Isoform und wird über proteasomale Degradation abgebaut

Nach der Durchführung von Titrationsversuchen zur Bestimmung der minimalen Induktionskonzentration von Doxycyclin, die für eine stabile Expression der einzelnen HA- oder mCherry-markierten TRIM9 Isoformen ausreicht, zeigte sich, dass die Isoformen TRIM9s und TRIM9I zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion unterschiedliche Expressionsintensitäten aufwiesen (Abb. 28). Mit Fortschreiten der Zeit konnte eine Abnahme der Expression der kurzen Isoform gezeigt werden, während die relative Expression der langen Isoform auf gleichem Niveau persistierte.

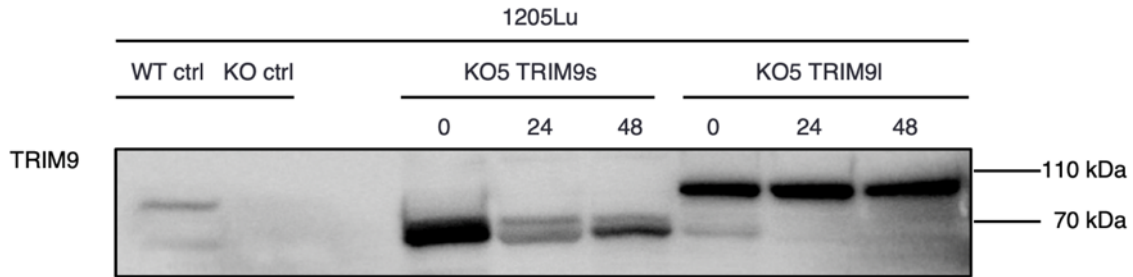


Abbildung 28: Die Isoformen TRIM9I und TRIM9s zeigen nach Induktion mit Doxycyclin und Zugabe frischen Mediums eine unterschiedliche Stabilität.

Es erfolgte die Induktion der Expression der TRIM9 Isoformen von mit pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9I oder pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s transfizierten 1205Lu TRIM9-KO5 Zellen über einen Zeitraum von 24 Stunden mit einer Doxycyclin-Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ und anschließendem Waschen der Zellen mit PBS und Mediumwechsel zu DMEM+++ (mit Tetracyclin-freiem FCS). Direkt nach der 24-stündigen Induktion (Zeitpunkt 0) sowie 24 Stunden (Zeitpunkt 24) und 48 Stunden (Zeitpunkt 48) nach Mediumwechsel erfolgte die Lyse der Zellen. Nach Quantifizierung der Proteinmenge mittels Bradford-Assay, wurden die Proteine mittels PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot die TRIM9 Menge quantifiziert.

Dieser Beobachtung wurde im Folgenden weiter nachgegangen. 1205Lu WT, 1205Lu TRIM9-KO und mit pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9I, pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s oder mit Plasmiden beider Isoformen transfizierte 1205Lu-KO3 beziehungsweise KO5 Zellen wurden über einen Zeitraum von vier bis sechs Tagen mit Doxycyclin induziert und die Expression der einzelnen Isoformen mittels Western Blot qualitativ und quantitativ analysiert (Abb. 29). Für die kurze Isoform von TRIM9 konnte gezeigt werden, dass schon einen Tag nach Induktion die Intensität der Expression abfiel und stetig weiter abnahm. Die lange Isoform von TRIM9 jedoch zeigte eine gleichbleibend starke, beziehungsweise wie in der quantitativen Analyse der Western Blots zu sehen, sogar leicht ansteigende Expression. Lediglich im Fall der Expression der langen Isoform von TRIM9 im Doppelisoformüberexpressionsmodell war ein endgültiger Abfall der Isoformkonzentration sechs Tage nach Induktion zu beobachten.

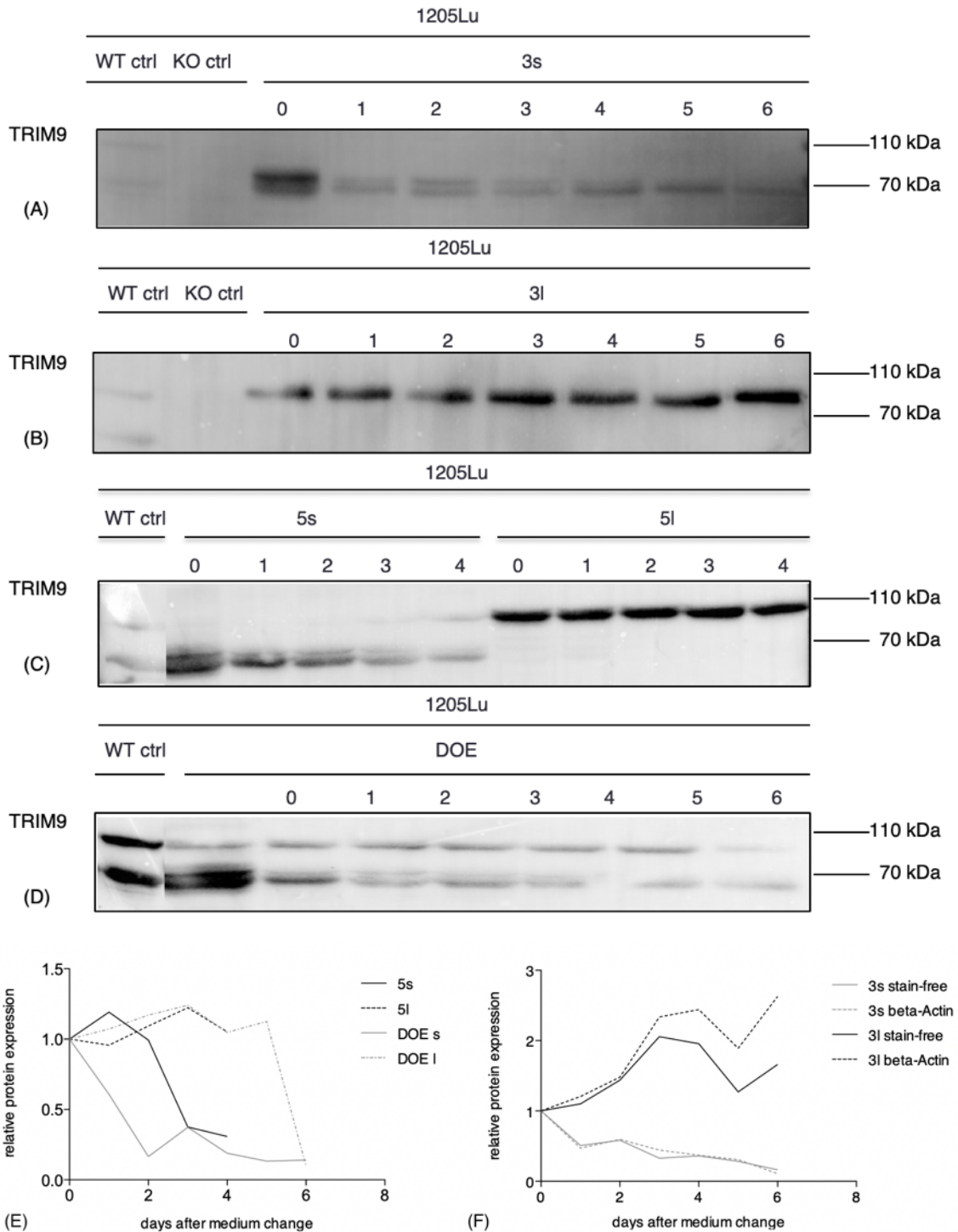


Abbildung 29: Die Isoformen TRIM9I und TRIM9s zeigen nach Induktion mit Doxycyclin Unterschiede in ihrer Stabilität.

Die Induktion der TRIM9-Isoformen erfolgte durch Zugabe von 1 µg/ml Doxycyclin für 24 h zu mit (A, C) pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s, (B, C) pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9I oder (D) Plasmiden beider Isoformen transfizierter (A, B, D, F) 1205Lu-KO3 Zellen beziehungsweise (C, E) 1205Lu-KO5 Zellen. Direkt nach Ende der Induktion (0) sowie in 24-Stunden-Abständen nach dem Mediumwechsel bis insgesamt vier bzw. sechs Tage danach (1,2,3,4,5,6) wurden Lysate der induzierten Zellen erstellt. Nach Quantifizierung der Proteinmenge mittels Bradford-Assay, wurden die Proteine mittels PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot die Menge der TRIM9 Isoformen quantifiziert. (E und F) Die relative Proteinoxpression normalisiert auf (E, F) β-Aktin oder die (F) Proteingesamtmenge wurde mit Hilfe der Image Lab Software (Biorad) quantifiziert

und graphisch dargestellt. Auch hier konnte ein Abfall der relativen Proteinexpression in Bezug auf die kurze Isoform von TRIM9 nachgewiesen werden, bei gleichbleibender Stabilität der langen Isoform.

In Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass TRIM9l und TRIM9s im Gegensatz zu TRIM9sdel proteasomal degradiert wird. Durch Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG132 (10 μ M) für vier Stunden nach Induktion der Zellen konnte dabei eine Zunahme der Expression von TRIM9l-mCherry im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen erzielt werden. Die Inhibition der proteasomalen Degradation mittels MG132 zeigte in TRIM9sdel-mCherry exprimierenden Zellen keinen Unterschied in der Intensität der Expression der einzelnen Isoformen. Der Unterschied der TRIM9sdel Isoform zur TRIM9s Isoform ist das Fehlen von 16 additionalen in der Isoform TRIM9s vorhandenen Aminosäuren. Da das für den proteasomalen Abbau von Proteinen notwendige Signal in den meisten Fällen eine Polyubiquitinierung des Proteins darstellt, ist davon auszugehen, dass dieser Mechanismus durch Fehlen der 16 Aminosäuren gestört wird.

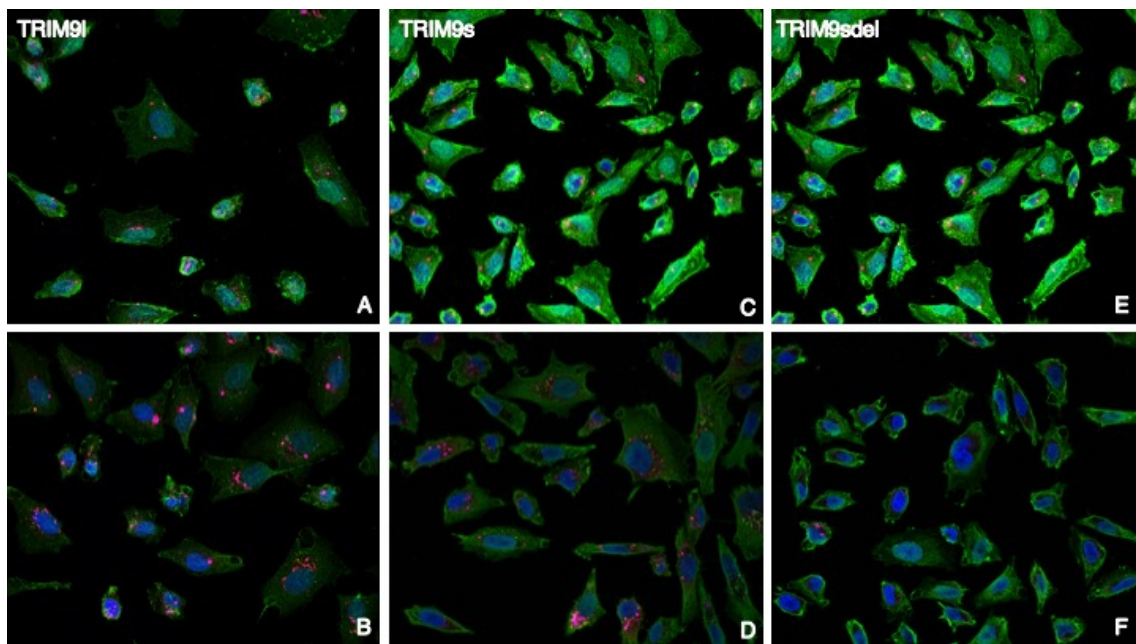


Abbildung 30: Proteasomale Degradation von TRIM9l.

Nach Induktion der in 1205Lu TRIM9-KO Zellen integrierten pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l/s/sdel-mCherry Plasmide mit 1,0 μ g/ml Doxycyclin über 48 Stunden, wurden die Zellen mit jeweils (B, D, F) 10 μ M MG132 beziehungsweise (A, C, E) als Kontrolle mit DMSO für vier Stunden behandelt. Nach Fixation der Zellen und Färbung mit DAPI, LC-3 und HA-Antikörper konnten die Zellen mittels Konfokalmikroskop visualisiert werden.

3.5 Die Isoformen von TRIM9 bilden vom Zellzyklus-unabhängig tubuläre oder punktuell-aggregierende Strukturen im Zytoplasma aus

3.5.1 Lokalisation der unterschiedlichen Isoformen von TRIM9

Im Überexpressionsnachweis mittels Konfokalmikroskopie konnten Unterschiede in der Lokalisation und Morphologie der einzelnen Isoformen festgestellt werden, die im Folgenden noch einmal weiter untersucht wurden. Beobachtet werden konnte das Auftreten zweier verschiedener mikroskopischer Phänotypen der unterschiedlichen Isoformen, die beide jeweils eine tubuläre sowie eine punktförmige Gestalt in Zellen einnehmen können (Abb. 27). Die Ursache könnte eine unterschiedliche Funktion je nach Erscheinungsbild und/oder eine Kolo­kalisierung mit unterschiedlichen zellulären Strukturen sein. Eine eventuelle Konformationsänderung während der Zellteilung oder Kolo­kalisierung mit Mikrotubuli könnten Gründe für die unterschiedlichen Erscheinungsformen sein. Im Folgenden wurde die Kolo­kalisierung mit Hilfe von Konfokalmikroskopie über einen längeren Zeitraum genauer untersucht.

3.5.2 Die Funktion von TRIM9 während der Zellteilung

Nachdem die Untersuchung der strukturellen Unterschiede der einzelnen TRIM9 Isoformen mittels Konfokalmikroskop zwei verschiedene Morphologien – eine punktförmige sowie eine tubuläre – zum Vorschein brachte, wurde mittels Konfokalmikroskopie über einen längeren Zeitraum versucht herauszufinden, ob sich eine Konformationsänderung von einer zur anderen Erscheinungsform detektieren lässt.

Weiterhin wurde aufgrund der tubulären Struktur die Vermutung einer Kolo­kalisierung mit Mikrotubuli und einer potentiell funktionellen Bedeutung des Proteins während der Zellteilung gestellt, die im Folgenden genauer untersucht wurde. In einer *Life Cell Imaging* Sequenz wurde im folgenden Versuch die Zellteilung HA-TRIM9-mCherry exprimierender 1205Lu Zellen nachverfolgt. Im Video konnte beobachtet werden, dass TRIM9 vor allem in Form von bis zu drei punktuellen Konglomeraten im Zellzytoplasma mit Orientierung zum Zellkern hin vorliegt (Abb. 31 und 32). Eine Kolo­kalisierung mit den Zentromeren oder Mikrotubuli konnte nicht nachgewiesen werden. Die durch mCherry markierten Strukturen zeigten während der Zellteilung weder ein polarisierendes Verhalten, noch eine Änderung der Struktur in die tubuläre Expressionsvariante. Nach

erfolgreicher Zellteilung wird TRIM9 in beiden Schwesterzellen wieder in punktueller Form exprimiert. In Zellen mit tubulärer Ausprägung ließ sich während der Beobachtung mittels Konfokalmikroskopie kein Prozess der Zellteilung abbilden.

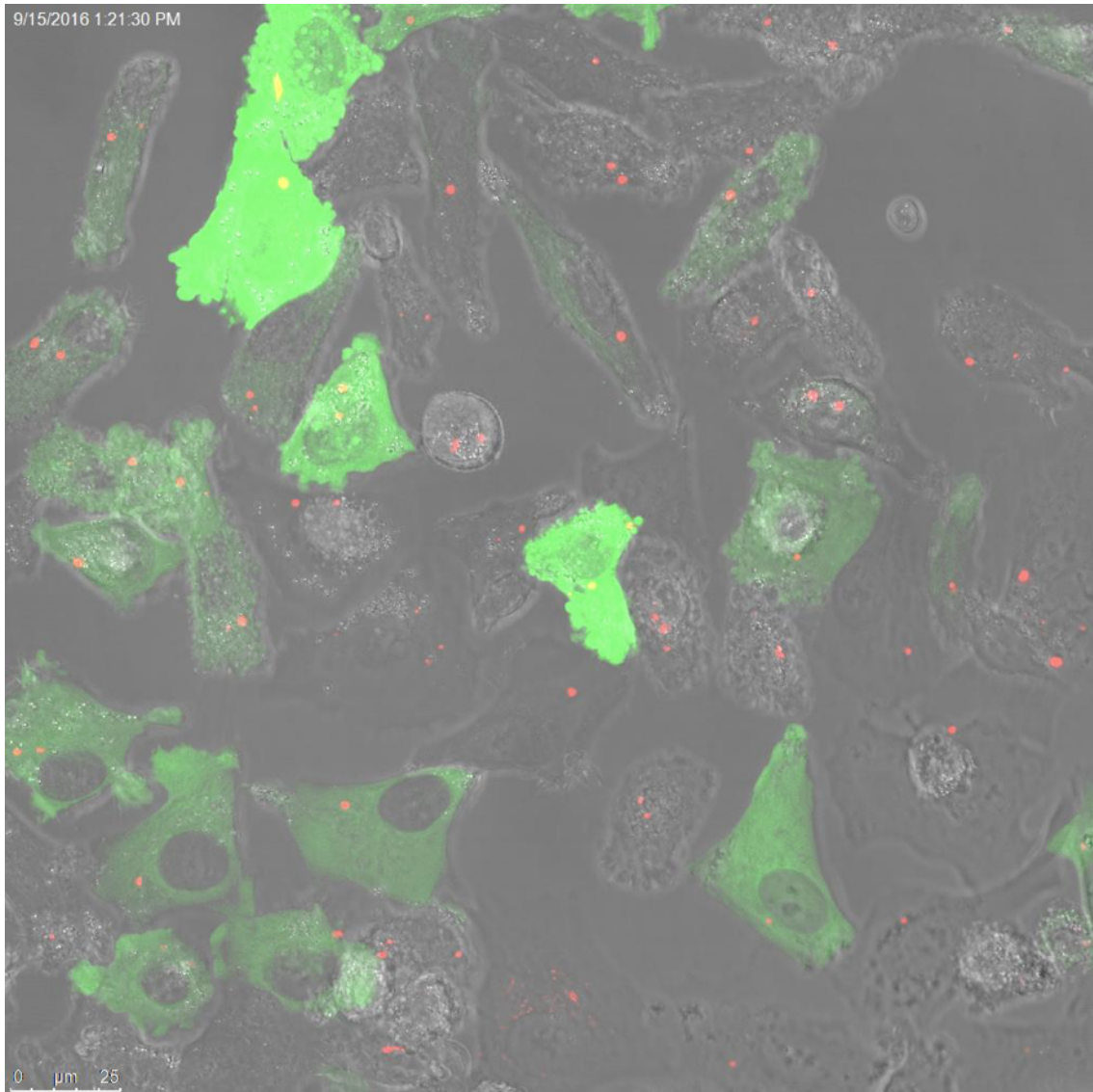


Abbildung 31: *Live Cell Imaging* von ^{125}Lu HA-TRIM9-mCherry exprimierenden Zellen.

^{125}Lu HA-TRIM9-mCherry Zellen wurden in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und über 24 Stunden mit Doxycyclin ($1,0 \mu\text{g/ml}$) induziert. Das Zytoskelett wurde mit LC3 angefärbt. Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop in vier Ebenen über einen Zeitraum von circa 12 Stunden diskontinuierlich aufgenommen und zu einer *Live Cell Imaging* Sequenz zusammengeschnitten. Mittels Tischinkubator wurden CO_2 -Gehalt, Temperatur und Druck konstant gehalten.

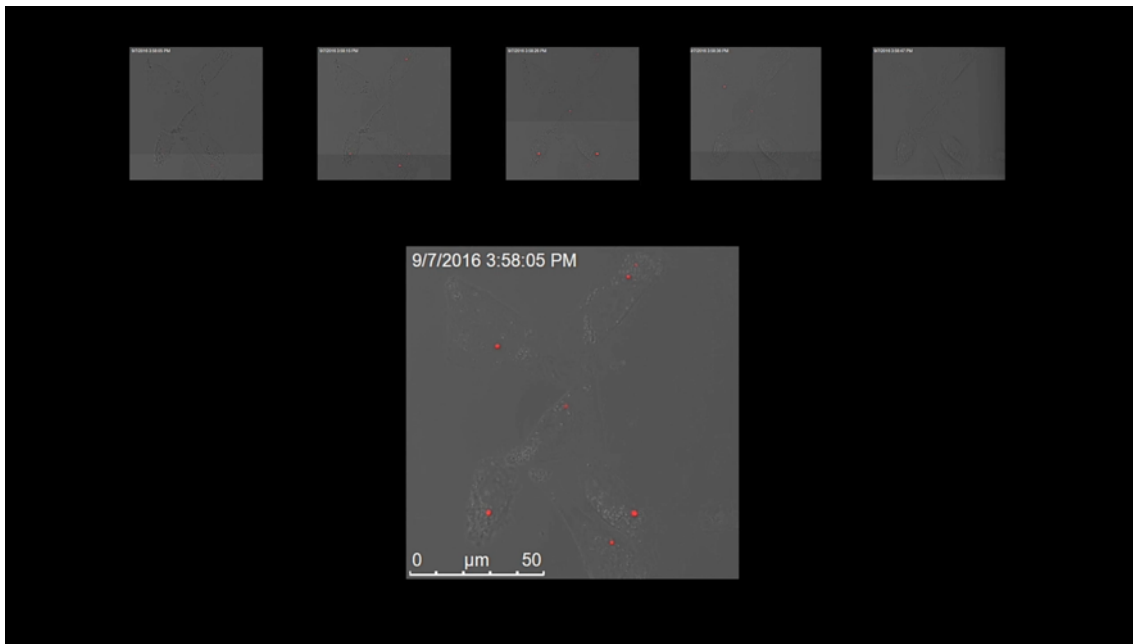


Abbildung 32: *Live Cell Imaging* von ^{125}Lu HA-TRIM9-mCherry exprimierenden Zellen in verschiedenen Z Ebenen.

^{125}Lu HA-TRIM9-mCherry Zellen wurden in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät und über 24 Stunden mit Doxycyclin ($1,0 \mu\text{g/ml}$) induziert. Bilder wurden mit dem Konfokalmikroskop in vier Ebenen über einen Zeitraum von circa 12 Stunden aufgenommen und zu einem Video geschnitten. Mittels Tischinkubator wurden CO_2 -Gehalt, Temperatur und Druck konstant gehalten.

Diskussion

4.1 Ergebnisüberblick

Diese Arbeit diente der Untersuchung und Charakterisierung der Expression, Struktur und Funktion von TRIM9 und seiner langen und kurzen Isoform im Rahmen von viralen Infektionen mit (-)ssRNA und (+)ssRNA Viren.

Anlass für diese Arbeit waren einerseits die in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe herauskristallisierte provirale Funktion von TRIM9 in Signalwegen der angeborenen Immunität und andererseits der bislang unklare Mechanismus, über den genetische Varianten im TRIM9 Gen Einfluss auf die Chronifizierungsrate nach HCV Infektion ausüben.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte die Expression von TRIM9 bereits auf Proteinniveau in Hirnlysaten der Maus mittels Western Blot sowie in der murinen Leber auf RNA-Ebene bestätigt werden. Darüber hinaus gelang nun auch der immunhistochemische Nachweis von TRIM9 im Hirngewebe der Maus sowie in murinen und humanen Leberpräparaten. Im murinen Hirngewebe war v.a. ein Nachweis von TRIM9 im Zytoplasma der Pyramiden-, Korb- und Körnerzellen möglich. Bei den TRIM9 positiven Zellen zeigt sich eine meist gleichmäßig verteilte zytoplasmatische Färbung. In murinen Hepatozyten konnte ebenfalls ein zytoplasmatischer Nachweis von TRIM9 erfolgen (Abb. 21). Insgesamt zeigte sich eine deutlich stärkere Expression des Proteins TRIM9 in murinen Hirnzellen im Vergleich zu Hepatozyten, was auf eine vermehrte Genexpression im murinen Gehirn im Vergleich zur murinen Leber rückschließen lässt. Als humane Präparate standen uns leider keine gesunden oder HCV-infizierten, sondern nur fibrotische, bzw. HCC-infiltrierte Leberpräparate zur Verfügung. Hier war TRIM9 v.a. in den Hepatozyten im Fibrosegewebe im Vergleich zu murinen Hepatozyten und humanen Hepatozyten im HCC-befallenen Gewebe deutlich vermehrt nachzuweisen (Abb. 22). Weiterhin konnten wir das Vorliegen mindestens zweier verschiedener Isoformen von TRIM9 sowohl in der verwendeten humanen Melanomzelllinie 1205Lu als auch in humanen PBMCs und Monozyten bestätigen (Abb. 23). Auffällig waren hier deutliche interindividuelle Unterschiede in der Expression von TRIM9 und dem Verhältnis der beiden Isoformen TRIM9l und TRIM9s.

In Vorarbeiten der AG Rothenfußer konnte außerdem gezeigt werden, dass das Fehlen von TRIM9 zu einer signifikanten Reduktion der Virusreplikation nach Infektion mit (-)ssRNA Viren führt. Dies konnte in 1205Lu WT und TRIM9-defizienten Zelllinien bestätigt werden. Weiterhin konnte belegt werden, dass das Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Melanomzellen und A549 Bronchialepithelzellen auch nach Infektion mit (+)ssRNA Viren YFV17D, EMCV und Mengo Virus zu einer signifikanten Reduktion der Virusreplikation führt (Abb. 24). Durch weiterführende Analyse mittels SDS-PAGE und Fluoreszenzmikroskopie konnte die Kinetik der Virusreplikation und der Immunantwort darauf nach Infektion mit fluoreszenzmarkiertem VSV-Virus genauer untersucht werden. In TRIM9-defizienten Zelllinien war hier keine völlige Inhibition, sondern eher eine Verzögerung der Virusreplikation und verzögerte Aktivierung und Phosphorylierung von IRF3 nachweisbar (Abb. 25).

Ausgehend von dem bestätigten Vorkommen verschiedener Isoformen von TRIM9 wurde außerdem untersucht, welche der beiden Isoformen für die erleichterte Virusreplikation verantwortlich ist. Dies konnte mit Hilfe neu-etablierter TRIM9 Isoform-defizienter Zelllinien sowie der Überexpressionsmodelle der einzelnen TRIM9-Isoformen genauer untersucht werden. Nachgewiesen werden konnte eine signifikante Inhibition der Virusreplikation sowohl in A549 Zelllinien mit KO beider Isoformen als auch in Zelllinien mit Fehlen nur der kurzen oder langen Isoform von TRIM9. Durch Rekonstitution in 1205Lu TRIM9-defizienten Zellen konnte gezeigt werden, dass durch Überexpression nur einer der Isoformen von TRIM9 die Virusreplikationsfähigkeit nicht vollständig der von WT Zellen angeglichen werden konnte. Einzig durch die gleichzeitige Überexpression beider Isoformen von TRIM9 konnte die Virusreplikation im Vergleich zur TRIM9-defizienten Zelllinie wieder signifikant gesteigert und an das WT Niveau angeglichen werden (Abb. 26).

In Bezug auf die Expressionsmuster der langen und kurzen Isoform von TRIM9 zeigte sich, dass diese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion unterschiedliche Expressionsintensitäten aufwiesen (Abb. 28). Im Zeitverlauf konnte eine Abnahme der Expression der kurzen Isoform gezeigt werden, während die relative Expression der langen Isoform auf gleichem Expressionsniveau persistierte. Da wir zeigen konnten, dass sowohl TRIM9l und TRIM9s im Gegensatz zu TRIM9sdel proteasomal degradiert

werden, könnten Unterschiede in der proteasomalen Degradation eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung bieten.

Hinsichtlich der intrazellulären Expression bzw. Lokalisation konnten wir zwei verschiedene Formvarianten von TRIM9 – eine punktförmige sowie eine tubuläre – nachweisen. Mittels *live cell imaging* konnte beobachtet werden, dass TRIM9 vor allem in Form von bis zu drei punktuellen Konglomeraten im Zellzytoplasma mit Orientierung zum Zellkern hin (Abb. 31 und 32), jedoch ohne Kolokalisation mit den Zentromeren oder Mikrotubuli vorliegt. Während der Zellteilung zeigte sich weder ein polarisierendes Verhalten, noch eine Strukturänderung.

Mit der Absicht die Funktion von TRIM9 ebenfalls im Rahmen von HCV Infektionen weiter zu charakterisieren, wurden von unseren Kooperationspartnern der Virologie der TU München unter Leitung von Prof. Protzer weitere Infektions-Assays mit einem *cell-culture derived* HCV Virus (HCVcc) JFH-1 aus Genotyp 2a durchgeführt, welches aus einem japanischen Patienten mit fulminanter HCV Infektion isoliert wurde. Dies ermöglichte die Analyse des kompletten viralen Lebenszyklus *in vitro* in der Hepatomzelllinie Huh7.5.

Mit Hilfe unterschiedlicher methodischer Ansätze konnte auch hier in der Arbeitsgruppe Protzer gezeigt werden, dass die HCV-Virusreplikation in Abwesenheit von TRIM9 supprimiert ist (Abb. 33). Mikroskopisch wurde diese geringere Replikation des HCV Genotyp 2b auch im Sinne eines geringeren Nachweises des nicht-strukturellen HCV-spezifischen Proteins NS3 visualisiert. Es konnte außerdem in TRIM9-KO Zellen eine stärkere TNF- α Expression nach Infektion mit HCV im Vergleich zum WT nachgewiesen werden. Nach Infektion mit HCV zeigte sich außerdem in TRIM9-KO Zellen eine signifikant stärkere Hochregulation der TRIF, MyD88 und p-IRF3 Expression im Vergleich zu infizierten Huh7.5 WT Zellen.

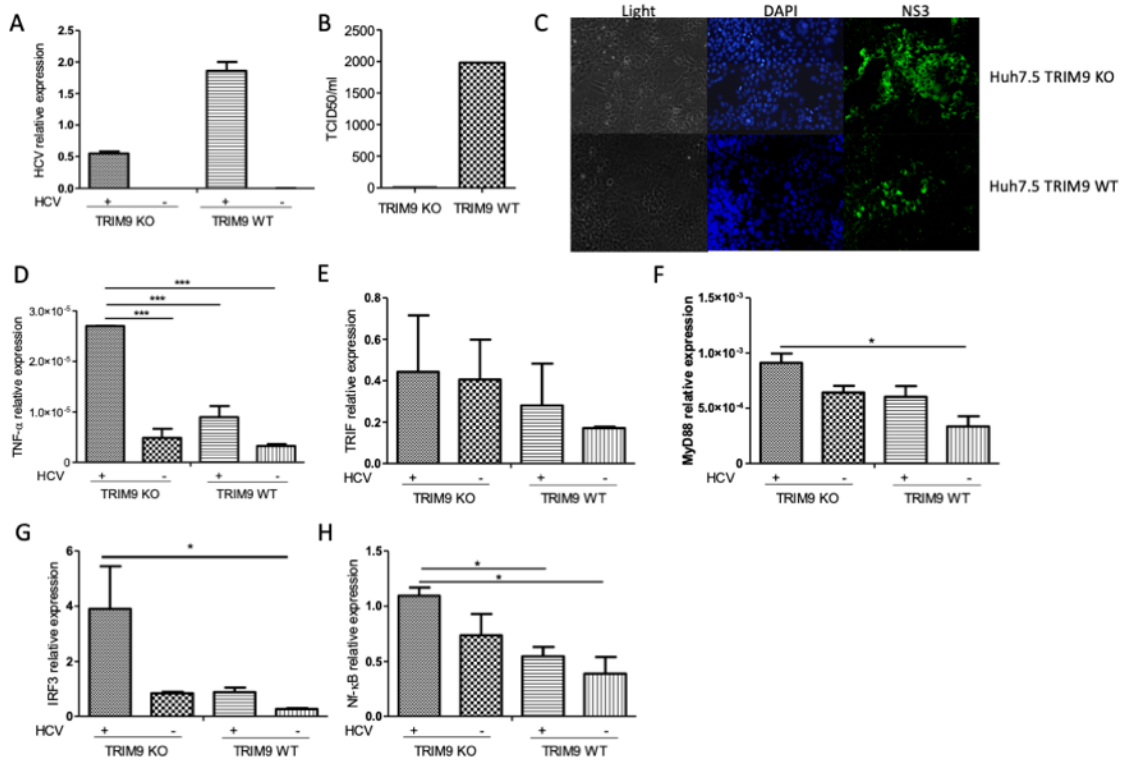


Abbildung 33: Die Abwesenheit von TRIM9 führt zur Inhibition der Virusreplikation nach Infektion mit HCV in Huh7.5 Zellen sowie zu einer stärkeren Induktion des TNF- α und NF- κ B Signalweges.

(A, D, E, F, G, H) Huh7.5 WT und TRIM9-KO Zellen wurden mit HCV Genotyp 2a (JFH-1) (Mol=0,1) über einen Zeitraum von 48 Stunden infiziert. RNA wurde isoliert, um die genomische (A) HCV-, (D) TNF- α -, (E) TRIF, (F) MyD88, (G) IRF3 und (H) NF- κ B Expression zu quantifizieren. (B) Zellüberstände wurden gesammelt und für die Virusreplikationsanalyse mittels TCID50 verwendet. (C) Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit NS3 Antikörper gefärbt. Eine visuelle Analyse mittels Konfokalmikroskop wurde durchgeführt (* für $p < 0,05$, ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$, **** für $p < 0,0001$). Die hier gezeigten Experimente wurden von Hanaa Gaber in der Arbeitsgruppe von Prof. Protzer an der Technischen Universität München durchgeführt.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Gewebsexpression von TRIM9

Bezüglich der Gewebsexpression von TRIM9 war in Vorarbeiten bislang vor allem die Funktion in neuronalem Gewebe beschrieben worden. Hier dient TRIM9 über SNAP25, VAMP und Netrin-1 als wichtiger Modulator der Vesikelfusion und Axonverästelung über die Stabilisierung der Filopodien der Wachstumskegel während der Wendung von Axonen (Menon S 2015, Winkle CC 2014, Winkle CC 2016). Die Funktion von TRIM9 wurde außerdem in murinen und humanen Makrophagen und T-Zellen untersucht wie zuvor beschrieben (Carthagena L 2009, Rajsbaum R 2008). Die Expression im murinen Hirngewebe konnte durch unsere Arbeit bestätigt werden. Zusätzlich konnten wir die

Expression von TRIM9 in humanem und murinem Lebergewebe und humanen Monozyten nachweisen. Wie zuvor beschrieben handelte es sich bei den untersuchten Leberpräparaten um eine zirrhotische Leber, sodass sich keine Aussage zur Expression von TRIM9 in gesundem Lebergewebe treffen lässt. Hier könnten andere Expressionslevel von TRIM9 vorliegen. Im Vergleich zu HCC-Gewebe zeigte sich eine deutlich vermehrte Expression in Hepatozyten des zirrhotischen Gewebes. Im Vergleich zu murinem Lebergewebe schien in den von uns untersuchten Präparaten eine höhere Expression in humanen Hepatozyten vorzuliegen. Hier konnte TRIM9 nur in einigen Zellen der Leber versus in fast allen Hepatozyten in der zirrhotisch veränderten humanen Leber angefärbt werden. Nachweisen konnten wir die Expression von TRIM9 außerdem in humanen Monozyten und in der Melanomzelllinie 1205Lu und Bronchialepithelzelllinie A549. Obwohl Mausmodelle in der Medizin einen beliebten präklinischen Modellorganismus darstellen, sind viele Unterschiede in Bezug auf Genexpression und molekulare Mechanismen vorbekannt v.a. in Bezug auf das angeborene und adaptive Immunsystem (Lin, et al. 2014, Mestas and Hughes 2004). Somit sind einerseits solche Unterschiede in der Expression von Genen zu erwarten und zusätzlich darf nicht einfach angenommen werden, dass die murinen Ergebnisse eins zu eins auf den Menschen übertragbar sind.

4.2.2 Provirale Funktion von TRIM9 und Bedeutung der kurzen und langen Isoform

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe hatte sich in Bezug auf die Infektion mit (-)ssRNA Viren bereits ein proviraler Phänotyp von TRIM9 herauskristallisiert. Dies konnte in eigenen Experimenten bestätigt werden. Nach Infektion mit (-)ssRNA Viren, aber auch (+)ssRNA Viren wie YFV17D, EMCV und Mengo Virus wurde eine eingeschränkte Virusreplikation in TRIM9 KO Zellen nachgewiesen. Wir konnten zeigen, dass das Fehlen von TRIM9 zu einer Verzögerung der Virusreplikation und einer verzögerten Phosphorylierung von IRF3 führt. Außerdem konnte in Kooperation mit der Virologie der Technischen Universität München die provirale Funktion von TRIM9 auch nach Infektion mit HCV bestätigt werden. Hier zeigte sich in TRIM9-defizienten Huh7.5 Zellen nach Infektion mit HCV eine stärkere TNF- α Produktion und geringere HCV-Replikation als in Huh7.5 WT Zellen.

In den hier vorgestellten Experimenten war für die Rekonstitution dieses proviralen Phänotyps in einer Modelinfektion mit dem Gelbfieberimpfvirus 17D die lentivirale

Überexpression beider Isoformen von TRIM9 in 1205Lu Zellen erforderlich. Hier stellt sich die Frage, ob eventuell ein bestimmtes Verhältnis der Expression von langer zu kurzer Isoform von TRIM9 für eine eventuelle Interaktion der beiden Isoformen oder auch wie in *Qin et al, 2016* postuliert für die Balance der antiviral und proviral wirkenden Gegenspieler TRIM9l und TRIM9s benötigt werden, um eine erfolgreiche Rekonstitution des letztendlich proviralen Phänotyps von TRIM9 zu ermöglichen. Allerdings konnten in Experimenten unserer Arbeitsgruppe die Daten von *Qin et al, 2016* bisher nicht bestätigt werden. Die von uns gezeigte ungleiche Stabilität der beiden Isoformen, zumindest nach einer artifiziellen Überexpression, erschweren es allerdings in unserem experimentellen System die natürlichen endogenen Mengen-Verhältnisse zwischen TRIM9l und Trim9s adäquat zu imitieren.

Zusammenfassend konnten wir durch die gezeigten Experimente eine provirale Rolle von TRIM9 in der angeborenen Immunität bestätigen, die in unserem experimentellen System dabei angewiesen ist auf das Vorhandensein und die Interaktion beider Isoformen von TRIM9.

Zur potentiellen Funktion und Wirkungsweise des Proteins in Betracht kommen unter anderem die im Folgenden erläuterten Hypothesen.

In eigenen Arbeiten wurde mittels konfokaler Mikroskopie eine Kolo-kalisation der langen und auch kurzen Isoform von TRIM9 mit viralen Strukturen untersucht, erbrachte aber mit den angewendeten Methoden bisher keinen Hinweis auf eine direkte Interaktion von TRIM9 mit viralen Strukturen. Allerdings wurde diese Untersuchung bisher nur im Infektionsmodell mit dem (-)ssRNA Virus VSV geprüft. Hier sind weitere experimentelle Untersuchungen, die auch andere Infektionsmodelle untersuchen, erforderlich, um auszuschließen, dass nicht eine direkte Interaktion von TRIM9 mit viralen Proteinen oder Strukturen, die für die Virusreplikation direkt benötigt werden, die verringerte Virusreplikation bewirkt. Es ist durchaus sinnvoll, diesen Assay mit verschiedenen Proteinen des YFV zu wiederholen.

Im Alternativen Modell führt das Fehlen von TRIM9 über die Modulation früher antiviraler Signalwege zu einer verstärkten Antwort des angeborenen Immunsystems (z.B. vermehrte TNF- α -Produktion siehe Abb. 33 D) nach Virusreplikation und hemmt damit indirekt über die Verstärkung dieser antiviralen Effektormechanismen die virale Replikation in Zellen. Auch wenn die beschriebene Funktion von TRIM9 als E3 Ligase (Tokarz DA 2016) nahelegt, dass eine modulierende Polyubiquitinierung hierbei eine Rolle spielen könnte, sind die genauen Mechanismen, wie die antiviralen Effekte erzielt werden noch unverstanden.

4.2.3 Kritische Beurteilung der gewählten Methodik

Als Kritikpunkt zu nennen ist die klonale Varianz in Bezug auf die dargestellten Ergebnisse unserer mittels CRIPR-cas9-Geneditierung hergestellten TRIM9 defizienten Zelllinien. Ursächlich ist hier unter anderem die lange Passagedauer von 1205Lu WT und 1205 TRIM9-KO Zellen, die benötigt wird, bis aus den Einzelzellklonen Zelllinien mit Zellzahlen werden, mit denen experimentell gearbeitet werden kann. Nach Infektion von 1205Lu WT und 1205Lu TRIM9-KO Zellen aus Stocks mit längeren Passagezeiträumen mit VSV-eGFP konnte beobachtet werden, dass besonders 1205Lu TRIM9-KO3 Zellen nach längerer Passagedauer beginnen sich wieder dem Phänotyp von 1205Lu WT Zellen anzunähern. Bei Infektion von Zellen mit nur geringeren Passagezyklen, ließ sich in Abwesenheit von TRIM9 weiterhin eine Reduktion der Virus-infizierten Zellen zeigen. Der provirale Phänotyp von TRIM9 blieb hier – in Kontrast zu 1205Lu TRIM9-KO Zellen aus späteren Passagen erhalten.

Auf Grund des Zusammenhangs zwischen Passagedauer der Zellen und dem Phänotyp von TRIM9, lag der Verdacht auf eine generell hohe Mutationsbereitschaft der verwendeten Zelllinie nahe. Ob die Änderung des Phänotyps eventuell auf einer Mutation eines anderen für die virale Abwehr wichtigen Proteins beruht, wurde daher mittels *Whole Exome Sequencing* genauer überprüft. Die Durchführung der Sequenzierungen durch eine externe Arbeitsgruppe ergab, dass in den Zelllinien nach Einzelzellklonierung eine Vielzahl von verschiedenen Mutationen vorliegt, die zufällig über das Genom verteilt erscheinen und keine Häufung an Positionen zeigen, die von Voraussageprogrammen als potentielle Orte für *off-target* Effekte der gRNA vorausgesagt wurden. Sie sind in der Rate eigentlich ausreichend durch die generelle Fehler- und damit Mutationsrate unserer menschlichen Polymerase erklärbar, sowie eine lange Passagedauer bis durch Replikation eine ausreichende Zellzahl erreicht ist.

Somit ist dieses Problem der klonalen Variation durch das Akkumulieren zufälliger Mutationen im Verlauf der klonalen Expansion zusätzlich zur gewollten Geneditierung auch nicht mit der Verwendung der eCas9 mit weniger *off-target* Mutationen zu beheben gewesen. Hier könnte nur die Verwendung von TRIM9 CRSPR-Cas9 KO *bulk* Zellpopulationen helfen dieses Phänomen zu umgehen.

Da die höchste Proteinexpression von TRIM9 bislang in Zellen des zerebralen Kortex und Kleinhirns nachgewiesen werden (Berti C 2002), könnten sich alternativ zu den humanen Tumorzelllinien als ideales Modell zur weiteren Analyse der

Immunmodulatorischen Funktionen des Proteins zum Beispiel murin-extrahierte Neurone eignen. Für diese Annahme spricht auch eine zum Thema Neuroinflammation veröffentlichte Studie. Diese konnte eine hohe TRIM9-Expression im Periinfarktbereich kurz nach ischämischem Schlaganfall nachweisen. Es wurde gezeigt, dass TRIM9 essenziell ist, um NF- κ B abhängige Neuroinflammation zu vermindern und neuronale Reparaturmechanismen nach Schlaganfällen zu verbessern (Zeng J 2019).

Ebenso zeigten sich im Hinblick auf die durchgeführten Infektionsassays Schwierigkeiten. Der in vielen Experimenten verwendete Virus-quantifizierende TCID50-Assay zeigte oftmals eine hohe Standardabweichung auf, die die statistische Auswertung der vorliegenden Daten erschwerte. Die Analyse mittels FACS zeigte sich hier als besser geeignetes Verfahren, um einfach replizierbare statistisch signifikante Datensätze zu generieren.

4.3 Ausblick und Relevanz

In Bezug auf den aktuellen Forschungsstand haben sich die Behandlungsmöglichkeiten der chronischen HCV Infektion seit dem Jahr 2016 durch Zulassung der direkt antiviral wirkenden Substanzen (DAA) Sofosbuvir in Kombination mit Ledipasvir oder Velpatasvir mit konsekutiv über 90-prozentiger Heilungsrate ausschlaggebend verbessert (Deterding K 2017). Dennoch sind mit der Therapie weiterhin hohe Kosten verbunden, sodass Alternativen zu den DAAs für den Großteil der HCV-positiven Weltbevölkerung weiterhin ein relevantes Forschungsziel darstellen. Trotz der geringen Expression von TRIM9 im Lebergewebe im Vergleich zur hohen Expression im Hirngewebe und der sehr unterschiedlichen Expression des Proteins in humanen Zellen verschiedener Spender, konnten wir auch im HCV Infektionsmodell die Hypothese aus den genetisch epidemiologischen Daten bestätigen, dass TRIM9 einen Einfluss auf die HCV-Replikation ausübt. Somit stellt TRIM9 einen interessanten neuen Restriktionsfaktor für HCV dar, der durch pharmakologische Beeinflussung einen potentiellen Therapieansatz in der Therapie der chronischen HCV-Infektion darstellen könnte. Weiterhin konnten wir zeigen, dass TRIM9-defiziente Zellen nicht nur im Rahmen von HCV Infektionen, sondern auch in Bezug auf weitere ssRNA Viren unterschiedlicher Polarität mit einer verminderten Virusreplikation einhergehen. Zwar konnten wir nachweisen, dass eine TRIM9-Defizienz mit einer verzögerten IRF3 Phosphorylierung sowie nach Infektion mit HCVcc JFH-1 mit einer stärkeren TNF- α

Expression und einer signifikant höheren TRIF, MyD88 Expression einhergeht, jedoch bleiben die genauen Mechanismen weiterhin ungeklärt.

Somit gilt es weiter die genauen Molekularmechanismen und Interaktionspartner von TRIM9 zu identifizieren und die Rollen der einzelnen Domänen und Isoformen von TRIM9 im Rahmen von Infektionen mit ssRNA Viren herauszuarbeiten.

Zusammenfassung

Im Jahr 2019 berichtete die *World Health Organization* von 290 000 Todesopfern, bei denen als primäre Todesursache eine chronische HCV Infektion zugrunde lag. Global leiden ungefähr 58 Millionen Menschen an einer chronischen HCV Infektion, mit einer Rate an 1,5 Millionen Neuinfektionen pro Jahr. Seit der Zulassung der direkt antiviral wirkenden Arzneimittel wie Sofosbuvir im Jahr 2016 hat sich die Therapie mit einer Heilungsrate von über 95 % der chronifizierten Infektionen deutlich verbessert, jedoch ist der globale Zugriff auf diese Therapeutika vor allem in Ländern niedrigen Wohlstands noch immer nicht allen Patienten ermöglicht. Somit besteht weiterhin Interesse besonders in diesen Ländern niedrigen Wohlstands mit jedoch häufig stark erhöhter HCV-Inzidenz eine bezahlbare Therapie zu gewährleisten.

Im Rahmen einer bisher unpublizierten GWAS-Studie unseres Kollaborationspartners in der Virologie der Technischen Universität München konnten zwei SNPs in der 3' UTR von TRIM9 identifiziert werden, die mit der Wahrscheinlichkeit eine Hepatitis C Infektion spontan auszuheilen assoziieren. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass das A-T-Allel eines dieser SNPs zu einer gesteigerten Expression von TRIM9 führt. Außerdem wurde eine provirale Funktion von TRIM9 identifiziert. Nach Infektion mit ssRNA-Viren unterschiedlicher Polarität zeigte sich in TRIM9-defizienten Zellen eine signifikant verminderte virale Replikation im Vergleich zu Wildtypzellen sowie Unterschiede in der Virus-induzierten IP-10 Antwort im Vergleich zum Wildtyp. Der bereits publizierte negativ regulatorische Effekt von TRIM9 auf die Aktivierung von NF- κ B konnte in den etablierten TRIM9-defizienten Zelllinien bestätigt werden.

Ob sich die beobachtete provirale Funktion von TRIM9 in Überexpressionsmodellen des Proteins bestätigen lässt, sollte in dieser Dissertation untersucht werden. Dabei stellte sich weiterhin die Frage, ob TRIM9 außerhalb von neuronalem Gewebe auch in humanem Lebergewebe und humanen Monozyten wirklich exprimiert wird. Außerdem wurde analysiert, inwiefern das Fehlen von TRIM9 die Replikation von (+)ssRNA und

(-)ssRNA Viren beeinflusst und ob es dabei sowohl der langen und der kurzen Isoform von TRIM9 bedarf, um die Virusreplikation zu beeinflussen. Weiterhin sollten die Unterschiede im Expressionsmuster, der intrazellulären Lokalisation und der Proteinstabilität zwischen der langen und der kurzen Isoform von TRIM9 untersucht werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten wir TRIM9 sowohl im Hirngewebe der Maus als auch in murinen und humanen Leberpräparaten nachweisen. In TRIM9-positiven Zellen zeigte sich histologisch eine meist gleichmäßig verteilte zytoplasmatische Färbung. Dabei deutete eine deutlich stärkere Expression des Proteins TRIM9 in murinen Hirnzellen im Vergleich zu Hepatozyten auf eine vermehrte Genexpression im murinen Gehirn im Vergleich zur murinen Leber hin. Weiterhin gelang der Nachweis des Vorliegens mindestens zweier verschiedener Isoformen von TRIM9 sowohl in der als Zellmodell verwendeten humanen Melanomzelllinie 1205Lu als auch in humanen PBMCs und Monozyten mit jedoch deutlich interindividuellen Unterschieden in der Expression von TRIM9 und dem Verhältnis der beiden Isoformen TRIM9l und TRIM9s zueinander. Außerdem konnten wir in dieser Arbeit in TRIM9-defizienten Zellen eine signifikante Hemmung der Virusreplikation nach Infektion mit (-)ssRNA Viren (VSV) und (+)ssRNA Viren (YFV17D, EMCV und Mengo Virus) beobachten. Dabei zeigte sich in Abwesenheit von TRIM9 insbesondere zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion sowohl eine Reduktion der viralen Replikationsrate als auch eine geringere virus-induzierte Aktivierung des IRF3-Signalweges. In TRIM9-defizienten Zelllinien konnten wir zeigen, dass die gleichzeitige Überexpression beider TRIM9-Isoformen erforderlich ist, um die Funktion von TRIM9 bezüglich ihrer Wirkung auf die Virusreplikation zu rekonstituieren. Interessanterweise zeigte die lange Isoform von TRIM9 nach Induktion eine hohe Protein-Stabilität, während die kurze Form nach Induktion rasch über einen proteasomalen Mechanismus abgebaut wurde. Beide Isoformen liegen in den untersuchten Zelllinien in zweierlei Gestalt vor: entweder als punktförmige Aggregate oder in einer tubulären Form. Diese Erscheinungsformen blieben auch über Zellteilungen hinweg stabil, ließen sich aber bisher keinen funktionellen Zuständen oder Zellstrukturen zuordnen.

Während wir einen proviralen Phänotyp von TRIM9 in Anwesenheit der langen und kurzen Isoform des Proteins sowie die Beeinflussung des NF- κ B und IRF3 Signalwegs zeigen konnten, bleiben die genauen Mechanismen der Beeinflussung der Virusreplikation weiterhin ungeklärt. Nicht nur in Bezug auf HCV Infektionen, sondern grundsätzlich im Rahmen von Infektionen mit ssRNA Viren unterschiedlicher Polarität

bietet TRIM9 somit sowohl in Hinblick auf die Beeinflussung des Infektionsoutcomes durch genetische Polymorphismen als auch durch direkte Beeinflussung der Virusreplikation entlang spezieller Signalwege ein potentiell neues Wirkstoff-Ziel, welches einen therapeutischen Nutzen auf den Krankheitsverlauf viraler Infektionen bieten könnte.

Summary

In 2019, the World Health Organization reported 290 000 deaths in which the primary cause of death was chronic HCV infection. Globally, approximately 58 million people suffer from chronic HCV infection, with a rate of 1.5 million new infections per year. Since the approval of direct antiviral drugs such as Sofosbuvir in 2016, treatment has improved significantly with a cure rate of over 95% of chronic infections, but global access to these therapeutics is still not available to all patients, especially in low wealth countries. Thus, there is still interest in ensuring affordable therapy, especially in these low-income countries with often increased HCV incidence.

In the context of a previously unpublished GWAS study of our collaboration partner at the division of virology at the Technical University of Munich, two SNPs in the 3' UTR of TRIM9 were identified, which are associated with the probability of spontaneous healing of a HCV infection. Preliminary work by our research group showed that the A-T allele of one of these SNPs leads to increased expression of TRIM9. In addition, a proviral function of TRIM9 was identified. After infection with ssRNA viruses of different polarity, TRIM9-deficient cells showed significantly reduced viral replication compared to wild-type cells as well as differences in the virus-induced IP-10 response compared to wild-type. The previously published negative regulatory effect of TRIM9 on NF- κ B activation could be confirmed in the established TRIM9 deficient cell lines.

Whether the observed proviral function of TRIM9 can be confirmed in overexpression models of the protein was to be investigated in this dissertation. The question also arose as to whether TRIM9 is expressed in human liver tissue and human monocytes outside of neuronal tissue. Furthermore, we analysed to what extent the absence of TRIM9 influences the replication of (+)ssRNA and (-)ssRNA viruses and whether both the long and the short isoform of TRIM9 are required to influence virus replication. Furthermore, the differences in the expression pattern of intracellular localization and protein stability between the long and the short isoform of TRIM9 were investigated.

In the present study, we were able to detect TRIM9 in mouse brain tissue as well as in murine and human liver preparations. Histologically, TRIM9 positive cells showed a mostly evenly distributed cytoplasmic staining. A significantly stronger expression of the TRIM9 protein in murine brain cells compared to hepatocytes indicated an increased gene expression in the murine brain compared to the murine liver. Furthermore, the presence of at least two different isoforms of TRIM9 was detected in the human melanoma cell line 1205Lu used as a cell model as well as in human PBMCs and monocytes with, however, clear interindividual differences in the expression of TRIM9 and the ratio of the two isoforms, TRIM9l and TRIM9s, to each other. Furthermore, in this work we observed a significant inhibition of viral replication in TRIM9-deficient cells after infection with (-)ssRNA viruses (VSV) and (+)ssRNA viruses (YFV17D, EMCV and Mengo virus). In the absence of TRIM9, both a reduction of the viral replication rate and a lower virus-induced activation of the IRF3 signaling pathway were observed, especially at early time points after infection. In TRIM9-deficient cell lines, we demonstrated that simultaneous overexpression of both TRIM9 isoforms is required to reconstitute the function of TRIM9 with respect to its effect on viral replication. Interestingly, the long isoform of TRIM9 showed high protein stability after induction while the short isoform was rapidly degraded via a proteasomal mechanism after induction. Both isoforms are present in the investigated cell lines in two forms: either as punctate aggregates or in a tubular form. These manifestations also remained stable across cell divisions but could not be assigned to any functional states or cell structures so far.

While we were able to show a proviral phenotype of TRIM9 in the presence of the long and short isoform of the protein as well as influences on the NF- κ B- and IRF3-signaling pathway, the exact mechanisms of influencing virus replication remain, however, unclear. Not only regarding HCV infections, but also in the context of infections with ssRNA viruses of different polarity, TRIM9 thus offers a potential new drug target both in terms of influencing the infection outcome through genetic polymorphisms and by directly influencing viral replication along specific signaling pathways, which could offer a therapeutic benefit on the course of viral infections.

Literaturverzeichnis

Ackland-Berglund C. E. and D. A. Leib. Efficacy of tetracycline-controlled gene expression is influenced by cell type.
Biotechniques 1995; 18(2):196-200.

Barrangou R F. C., Deveau H, Richards M, Boyaval P, Moineau S, Romero DA, Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes.
2007; 315(5819):1709-1712.

Berti C M. S., Ballabio A, Reymond A, Meroni G. TRIM9 is specifically expressed in the embryonic and adult nervous system.
Mechanisms of Development 2002; 113(2):159-162.

Carthagena L B. 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(3):e4894.

Chan YK G. M. Viral evasion of intracellular DNA and RNA sensing.
Nature Reviews Microbiology 2016; 14(6):360.373.

Charpentier E D. J. Biotechnology: Rewriting a genome.
Nature 2013; 495(7439):50-51.

Cong L R. F., 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(6121):819-823.

Deterding K S. C., Schott E, Welzel TM, Gerken G, Klinker H, Spengler U, Wiegand J, Schulze Zur Wiesch J, Pathil A, Cornberg M, Umgelter A, Zöllner C, Zeuzem S, Papkalla A, Weber K, Hardtke S, von der Leyen H, Koch A, von Witzendorff D, Manns MP, Wedemeyer H; HepNet Acute HCV IV Study Group. Ledipasvir plus sofosbuvir fixed-dose combination for 6 weeks in patients with acute hepatitis C virus genotype 1 monoinfection (HepNet Acute HCV IV): an open-label, single-arm, phase 2 study.
Lancet Infectious Diseases 2017; 17(2):215-222.

Gossen M. and H. Bujard. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters.
Proc Natl Acad Sci U S A 1992; 89(12):5547-5551.

Goubau D., M. Schlee, S. Deddouche, A. J. Pruijssers, T. Zillinger, M. Goldeck, C. Schuberth, A. G. Van der Veen, T. Fujimura, J. Rehwinkel, J. A. Iskarpatyoti, W. Barchet, J. Ludwig, T. S. Dermody, G. Hartmann and C. Reis e Sousa. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates.
Nature 2014; 514(7522):372-375.

Henderson-Smith A C. J., De Both M, Cuyugan L, Liang WS, Huentelman M, Adler C, Driver-Dunckley E, Beach TG, Dunckley T. Next-generation profiling to identify the molecular etiology of Parkinson dementia.
Neurology: Genetics 2016; 2(3):e75.

Honda K Y. H., Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view.

International Immunology 2005; 17(11):1367-1378.

Hornung V E. J., Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.

Science 2006; 314(5801):994-997.

Howard M W. G. Vesicular Stomatitis Virus RNA Replication: a Role for the NS Protein.

Journal of general Virology 1989; 70(2683-2694).

Ishino Y S. H., Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.

Journal of Bacteriology 1987; 169(12):5429-5433.

James LC K. A., Khan Z, Rhodes DA, Trowsdale J. Structural basis for PRYSPRY-mediated tripartite motif (TRIM) protein function.

PNAS 2007; 104(15):6200-6205.

Jansen R E. J., Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.

Molecular Microbiology 2002; 43(6):1565-1575.

Laurent-Rolle M M. J., Rajsbaum R, Macleod JML, Pisanelli G, Pham A, Ayllon J, Miorin L, Martinez C, tenOever BR, García-Sastre A. The interferon signaling antagonist function of yellow fever virus NS5 protein is activated by type I interferon.

Cell Host & Microbe 2014; 16(3):314-327.

Lazar T. Immunology of Infectious Diseases.

Emerging Infectious Diseases 2002; 8(11):1362-1363.

Lee JK J. E., Lee J, Jung M, Shin E, Kim YH, Lee K, Jung I, Kim D, Kim S, Kim JS. Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity.

Nature Communications 2018; 9(1):3048.

Lin R H. C., Pitha PM, Hiscott J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation.

Molecular Cell Biology 1998; 18(5):2986-2996.

Lin S., Y. Lin, J. R. Nery, M. A. Urich, A. Breschi, C. A. Davis, A. Dobin, C. Zaleski, M. A. Beer, W. C. Chapman, T. R. Gingeras, J. R. Ecker and M. P. Snyder. Comparison of the transcriptional landscapes between human and mouse tissues.

Proc Natl Acad Sci U S A 2014; 111(48):17224-17229.

Mali P Y. L., Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9.

Science 2013; 339(6121):823-826.

Menon S B. N., 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.

Developmental Cell 2015; 35(6):698-712.

Meroni G D.-R. G. TRIM/RBCC, a novel class of 'single protein RING finger' E3 ubiquitin ligases.

BioEssays 2005; 27(11):1147-1157.

Mestas J. and C. C. Hughes. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology.

J Immunol 2004; 172(5):2731-2738.

Mishima C K. N., Matsui S, Tanei T, Naoi Y, Shimoda M, Shimomura A, Shimazu K, Kim SJ, Noguchi S. Promoter methylation of TRIM9 as a marker for detection of circulating tumor DNA in breast cancer patients.

SpringerPlus 2015; 4(635).

Mojica FJ D.-V. C., Soria E, Juez G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria.

Molecular Microbiology 2000; 36(1):244-246.

Napolitano LM J. E., Hay RT, Meroni G. Functional interactions between ubiquitin E2 enzymes and TRIM proteins.

The Biochemical Journal 2011; 434(2):309-319.

Ozato K S. D., Chang TH, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity.

Nature Reviews Immunology 2008; 8(11):849-860.

Qin Y L. 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 β to TBK1.

Cell Research 2016; 26(5):613-628.

Rajsbaum R S. J., O'Garra A. Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells.

European Journal of Immunology 2008; 38(3):619-630.

Rehwinkel J. and M. U. Gack. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing.

Nat Rev Immunol 2020; 20(9):537-551.

Rückel J. Tripartite Motif Family Protein 9: Das genetisch determinierte Expressionsniveau moduliert die angeborene antivirale Immunität und Virusreplikation. .

LMU München: Medizinische Fakultät 2018;

Said-Sadier N. and D. M. Ojcius. Alarmins, inflammasomes and immunity.

Biomed J 2012; 35(6):437-449.

Shi M C. H., Inn KS, Yang A, Zhao Z, Liang Q, Versteeg GA, Amini-Bavil-Olyae S, Wong LY, Zlokovic BV, Park HS, García-Sastre A, Jung JU. Negative regulation of NF- κ B activity by brain-specific TRIPartite Motif protein 9.

Nature Communications 2014; 5(4820).

Short KM C. T. Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding.

The Journal of biological chemistry 2006; 281(13):8970-8980.

Tang D., R. Kang, C. B. Coyne, H. J. Zeh and M. T. Lotze. PAMPs and DAMPs: signal
Os that spur autophagy and immunity.
Immunol Rev 2012; 249(1):158-175.

Tanji K., T. Kamitani, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi and K. Wakabayashi. 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(2):210-218.

Tiyadatah B. N., S. V. Kalavampara, S. Sukumar, G. Mathew, G. K. Pooleri, A. T.
Prasanna, U. A. Gopalakrishnan and S. B. Hattangadi. Bilateral simultaneous
laparoscopic adrenalectomy in Cushing's syndrome: safe, effective, and curative.
J Endourol 2012; 26(2):157-163.

Tokarz DA Y. J. Trim9 mediates macrophage chemotaxis in a RING-dependent manner.
The Journal of Immunology 2016; 196(1).

Tossounidis J. In Preparation.
LMU München: Medizinische Fakultät 2022.

Uhlen M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A.
Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S.
Navani, C. A. Szigyrto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.
H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M.
Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von
Heijne, J. Nielsen and F. Ponten. Proteomics. Tissue-based map of the human
proteome.
Science 2015; 347(6220):1260419.

Urlinger S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard and W. Hillen. Exploring the
sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations
yield expanded range and sensitivity.
Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(14):7963-7968.

Versteeg GA R. R., Sánchez-Aparicio MT, Maestre AM, Valdiviezo J, Shi M, Inn KS,
Fernandez-Sesma A, Jung J, García-Sastre A. The E3-ligase TRIM family of proteins
regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors.
Immunity 2013; 38(2):384-398.

Wiese M., J. Fischer, M. Lobermann, U. Gobel, K. Grungreiff, W. Guthoff, U. Kullig, F.
Richter, I. Schiefke, H. Tenckhoff, A. Zipprich, T. Berg, T. Muller and H. C. V. S. G. East
German. Evaluation of liver disease progression in the German hepatitis C virus (1b)-
contaminated anti-D cohort at 35 years after infection.
Hepatology 2014; 59(1):49-57.

Winkle CC M. L., Valtschanoff JG, Park CS, Maglione C, Gupton SL. A novel Netrin-1-
sensitive mechanism promotes local SNARE-mediated exocytosis during axon
branching.
The Journal of Cell Biology 2014; 205(2):217-232.

Winkle CC O. R., Kim H, Moy SS, Song J, Gupton SL. Trim9 Deletion Alters the
Morphogenesis of Developing and Adult-Born Hippocampal Neurons and Impairs Spatial
Learning and Memory.
The Journal of Neuroscience 2016; 36(18):4940-4958.

Yoneyama M K. M., Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale M Jr, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. *Journal of Immunology* 2005; 175(5):2851-2858.

Yuan B., R. Latek, M. Hossbach, T. Tuschl and F. Lewitter. siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Res* 2004; 32(Web Server issue):W130-134.

Zeng J W. 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 Reports* 2019; 27(2):549-560.

Zumla A. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. *The Lancet. Infectious Diseases* 2010; 10(5):303-304.

Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A-T	Adenosin-Thymin
β-TrCP	<i>beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase</i>
B-Box	<i>b-box type zinc finger domain</i>
BSA	Bovines Serum-Albumin
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>
Cas9	CRISPR associated protein 9
CC	<i>coiled-coil domain</i>
CLR	Typ-C-Lektin-Rezeptor
COS	<i>C-terminal subgroup one signature</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeat</i>
crRNA	CRISPR RNA
CTD	<i>carboxy-terminal domains</i>
DAMP	<i>damage-associated molecular pattern</i>
DCC	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DIKO	<i>double isoform knockout</i>
DLB	<i>dementia with Lewy-bodies</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOE	<i>double isoform overexpression</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
E1	Ubiquitin-aktivierenden-Enzyms
E2	Ubiquitin-konjugierendes-Enzym
E3	Ubiquitin Ligase
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>

EMCV	<i>Encephalomyocarditis Virus</i>
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting/sorter</i>
FCS	Fätales Kälberserum
FcyR	<i>Fc receptor for IgG</i>
FN3	<i>Fibronectin-type-III domain</i>
G-C	Guanosin-Cytosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GLuc	Gaussia Luciferase
GSK3 β	<i>glycogen synthase kinase 3 β</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
hHA	<i>human influenza hemagglutinin</i>
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis-C-Virus
HCVcc	<i>cell-culture derived Hepatitis-C-Virus (JFH-1 strain of genotype 2a)</i>
HR	<i>homologous recombination</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
IκBα	<i>Inhibitor of NF-κBα</i>
IFN- α/β	Interferon-beta
IKK ϵ	I κ B- ϵ Kinase
IL-10	Interleukin-10
IP-10	<i>IFNγ-induced protein 10</i>
IRF3/7	<i>IFN regulatory factor 3/7</i>
ISRE	<i>Interferon Stimulated Response Element</i>
kb	Kilobasenpaar
KO	<i>Knockout</i>
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>

LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>Magnetic Cell Separation</i>
MAVS	<i>adaptor mitochondrial antiviral signalling protein</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDA-5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MOI	Multiplizität der Infektion
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NHEJ	<i>non-homologous end joining</i>
NLR	NOD-like-Rezeptor
OE	Überexpression
Opti-MEM	<i>improved Minimal Essential Medium</i>
PAGE	Polyakrylgelelektrophorese
PAM	<i>proto-spacer adjacent motif</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBMC	Mononukleäre Zelle der peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaquebildenden Einheiten
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
poly I:C	<i>polyinosinic: polycytidylic acid</i>
p.i.	post infectionem
pIRF3	<i>phosphorylated IRF3</i>
PP1 α/γ	Proteinphosphatase-1-alpha/gamma
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVD	Polyvinylidenfluorid
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>

RIPA	<i>Radio-Immuno-Precipitation Assay</i>
RLR	<i>(RIG)-I-like-Rezeptoren</i>
RLU	<i>relative light unit</i>
RNAseq	<i>RNA Sequencing</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
seAP	sekretorische alkalische Phosphatase
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SeV	Sendai Virus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SFV	Semliki Forest Virus
sgRNA	<i>single-guide RNA</i>
SIKO	<i>single isoform knockout</i>
SNAP25	<i>synaptosomal-associated protein of 25 kDa</i>
SNARE	<i>soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
eSpCas9	<i>(enhanced) Streptococcus pyogenes Cas9</i>
SRSR	<i>Short Regularly Spaced Repeats</i>
(-)/ (+)ssRNA	<i>negative-/ positive-sense single-stranded RNA</i>
T7E1	T7-Endonuklease-1
TBK1	TANK-binding Serin/Threonin-Proteinkinase 1
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TCID50	<i>Tissue Culture Infection Dose 50 Assay</i>
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
tracrRNA	<i>trans-acting CRISPR RNA</i>
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
T-reg	regulatorische T-Zelle
<i>TRIM</i>	<i>tripartite motif family</i>
TRIM9s	<i>short isoform of TRIM9</i>
TRIM9sdel	<i>TRIM9 short isoform with deleted 16 amino acids</i>
TRIM9l	<i>long isoform of TRIM9</i>
TRIM9B	<i>TRIM9 both isoforms</i>
<i>TRIS</i>	Tromethamin

UBE2G2	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2 G2</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
VASP	<i>Vasodilator-stimulated phosphoprotein</i>
VSV	<i>Vesicular Stomatitis Virus</i>
WT	Wildtyp
YFV	Yellow Fever Virus 17D

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: RIG-I- und MAVS-gekoppelte Signalkaskade	3
Abbildung 2: TRIM9 Proteine und ihre Domänen.....	6
Abbildung 3: Effekt von TRIM9 auf den IRF3 und NF- κ B Signalweg	8
Abbildung 4: Zusammenhang des Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in TRIM9 3'UTR mit der Chronifizierungsrate von Hepatitis C Virus Infektionen.....	10
Abbildung 5: Das AT-Allel des Einzelnukleotidpolymorphismus rs12879906 in der TRIM9 3'UTR führt zu einer gesteigerten Proteinexpression.....	11
Abbildung 6: TRIM9 hat einen negativ regulatorischen Effekt auf die NF- κ B Signaltransduktion in 1205Lu Zellen.	12
Abbildung 7: Abwesenheit von TRIM9 inhibiert die virale Replikation.....	13
Abbildung 8: Schema der Konfokalmikroskopie	37
Abbildung 9: Graphische Darstellung des pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9-MCS Plasmids in zirkulärer Form.....	43
Abbildung 10: Konfokalmikroskopische Darstellung Doxycyclin-induzierter, mCherry-markierter TRIM9 Konstrukte in 1205Lu Zellen.....	45
Abbildung 11: Die einzelnen Isoformen Trim9l/ TRIM9s/ TRIM9sdel lassen sich in 1205Lu KO3 und KO5 Zellen nach Induktion mit Doxycyclin überexprimieren.	46
Abbildung 12: Die gleichzeitige Überexpression von TRIM9s und TRIM9l in 1205Lu TRIM9-KO3 Zellen resultierte in einem inversen Verhältnis der Expression der beiden Isoformen im Vergleich zum WT.	47
Abbildung 13: Nach lentiviraler Transfektion von 1205Lu TRIM9-KO Zellen mit den Plasmiden pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9s und pLVX-Tight-Puro-HA-TRIM9l im Verhältnis 1:4 konnte das Expressionsverhältnis der beiden Isoformen dem Wildtypverhältnis angeglichen werden.	48
Abbildung 14: Schematische Darstellung des CRISPR/Cas Systems	49
Abbildung 15: Graphische Darstellung des eSpCas9(1.1)-2a-Puro Plasmids in zirkulärer Form.	51
Abbildung 16: Die Klone 1, 5, 7, 23, 31 und 40 stellten sich als positive Knockouts der langen Isoform von TRIM9 in A549 Zellen heraus.	56
Abbildung 17: Die Klone # 2, 5, (8), 13, (16), 26, 28, 30, 37, 42 stellten sich als positive Knockouts der kurzen Isoform von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.....	56
Abbildung 18: Die Klone # 1, 4, (6), 7, 8, 9, 10, 14, 15, 22, 23, 24, 25, 29, 30, (31), 32, 33, (13), 2.2 stellten sich als positive Knockouts der langen Isoform von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.....	57

Abbildung 19: Die Klone # 1, 4, 6, 8, 21, 22, 26, 42, 43, 44 stellten sich als positive Knockouts beider Isoformen von TRIM9 in 1205Lu Zellen heraus.....	58
Abbildung 20: Immunhistochemische Färbung von 1205Lu Wildtyp, 1205Lu TRIM9-KO und 1205Lu TRIM9-OE-Zellen mit TRIM9 Antikörper.	60
Abbildung 21: Immunhistochemische Färbung muriner Hirn- und Leberschnitte mit TRIM9 Antikörper.	61
Abbildung 22: Immunhistochemische Färbung eines teilweise karzinomatösen Leberpräparates mit TRIM9 Antikörper.	62
Abbildung 23: Trim9 kommt in der humanen Melanomzelllinie 1205Lu in zwei Isoformen (TRIM9l und TRIM9s) vor und wird in CD14-positiven primären humanen Monozyten exprimiert.....	64
Abbildung 24: Fehlen von TRIM9 in 1205Lu Melanomzellen und A549 Bronchialepithelzellen hemmt sowohl die Replikation des negativ-Strang RNA Virus VSV als auch der positiv-Strang RNA Viren YFV17D, EMCV und Mengo Virus.....	66
Abbildung 25: Das Fehlen von TRIM9 führt zu einer verzögerten Virusreplikation und verzögerten Aktivierung von IRF3.	68
Abbildung 26: Beide, sowohl die lange als auch die kurze Isoform von TRIM9 sind erforderlich, um die Virusreplikation zu erleichtern.....	70
Abbildung 27: Die Induktion der einzelnen Isoformen von TRIM9 führt zu einer nur minimal gesteigerten Infektion der Zielzellen. Eine Kolo-kalisation von TRIM9 und VSV-eGFP kann nur vereinzelt beobachtet werden.	71
Abbildung 28: Die Isoformen TRIM9l und TRIM9s zeigen nach Induktion mit Doxycyclin und Zugabe frischen Mediums eine unterschiedliche Stabilität.....	72
Abbildung 29: Die Isoformen TRIM9l und TRIM9s zeigen nach Induktion mit Doxycyclin Unterschiede in ihrer Stabilität.....	73
Abbildung 30: Proteasomale Degradation von TRIM9l.	74
Abbildung 31: <i>Live Cell Imaging</i> von 1205Lu HA-TRIM9-mCherry exprimierenden Zellen.....	76
Abbildung 32: <i>Live Cell Imaging</i> von 1205Lu HA-TRIM9-mCherry exprimierenden Zellen in verschiedenen Z Ebenen.....	77
Abbildung 33: Die Abwesenheit von TRIM9 führt zur Inhibition der Virusreplikation nach Infektion mit HCV in Huh7.5 Zellen sowie zu einer stärkeren Induktion des TNF- α und NF- κ B Signalweges.....	81

7.3 Danksagungen

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß, meinem Doktorvater, für die Möglichkeit der Promotion in seiner Arbeitsgruppe, die Diskussion wissenschaftlicher Ideen und die uneingeschränkte Unterstützung während der Promotionsphase herzlich bedanken. Besonders dankbar bin ich auch für den freundlichen und kollegialen Umgang in der gesamten Arbeitsgruppe. Die Phase meiner Promotion war eine wertvolle Zeit, die mich sowohl charakterlich als auch beruflich nachgehend geprägt hat.

Weiterhin möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Stefan Endres herzlich bedanken, der als Abteilungsleiter ein großes Engagement für die wissenschaftliche und berufliche Förderung angehender Mediziner zeigt.

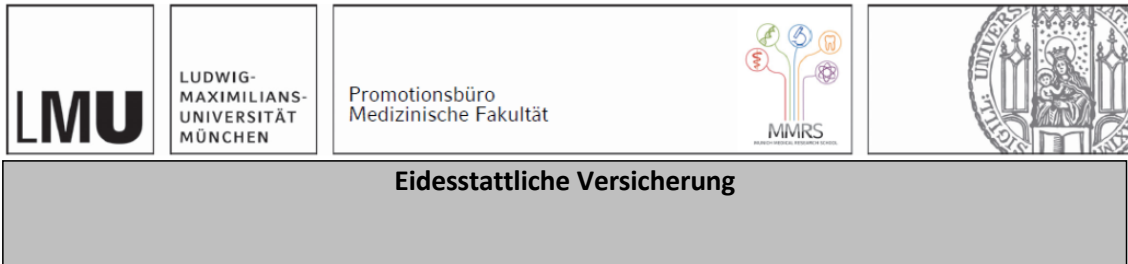
Meinem wissenschaftlichen Betreuer Dr. Dharmendra Pandey, möchte ich für die Unterstützung im Labor danken. Sehr dankbar bin ich vor allem für die breite Methodik, die mein Interesse an der Grundlagenforschung weiter gestärkt hat.

Bedanken möchte ich mich auch für die Promotionsförderung durch FöFoLe und die Möglichkeit der Assoziation an das internationale Doktorandenkolleg „i-Target“ des Elitenetzwerks Bayern.

Weiterhin möchte ich mich bei allen zu meiner Promotionszeit aktiven Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das kollegiale Umfeld bedanken sowie bei unseren Kooperationspartnern Frau Professor Dr. Ulrike Protzer sowie Hanaa Gaber vom Institut für Virologie der Technischen Universität München und auch bei Frau Prof. Dr. med. Doris Mayr vom Pathologischen Institut der LMU für die methodische Unterstützung.

Eine ganz tiefe Dankbarkeit möchte ich außerdem meiner Familie und meinen Freunden aussprechen, besonders meinen Eltern Annette und Peter, meiner Oma Walltraud und meinem Bruder Robert, die mir immer uneingeschränkten Rückhalt geben und mich in jeder Lebenslage und Entscheidung unterstützt haben. Zuletzt möchte ich mich bei Adrian für sein großes Verständnis sowie die gegenseitige Motivation und Wertschätzung bedanken.

7.4 Affidavit



Nowotny, Hanna

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„TRIM9 – dichotome Funktionen in der angeborenen Immunität“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, 05.12.2022

Hanna Nowotny

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand