Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie Klinik der Universität München Direktor: Prof. Dr. Stefan Endres

Tripartite Motif Family Protein 9 Charakterisierung eines neuen Proteins der antiviralen Immunität

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



vorgelegt von Sofía Luisa Antón-Gradel aus München 2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Simon Rothenfußer
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dr. Albrecht von Brunn
	PD Dr. Andreas Moosmann

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. Dharmendra Pandey
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.03.2024

In Dankbarkeit

meinen Eltern Sylvia und Juan meinen Geschwistern Xenia und Julián

und Max

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.	1. Das menschliche Immunsystem	1
	1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität	1
	1.1.2. Antivirale Immunität	2
	1.1.3. Mustererkennungsrezeptoren	3
	1.1.4. Antivirale Immunantwort und Zytokininduktion	5
1.	2. Hepatitis C	6
	1.2.1. Das Hepatitis C-Virus (HCV)	6
	1.2.2. Auswirkung genetischer Variation auf den Verlauf einer HCV-Infektion	8
	1.2.3. Korrelation eines SNPs der 3'UTR von <i>Tripartite-motif-protein 9</i> (TRIM9) mit der Ausgang einer HCV-Infektion	m 9
1.	3. TRIM9	.11
	1.3.1. TRIM-Proteine	.11
	1.3.2. Funktion von TRIM-Proteinen im Immunsystem	.12
	1.3.3. TRIM9 - Stand der Literatur	.13
1.	4. Fragestellung	.15
2. N	laterial und Methoden	.16
2.	1. Material	.16
	2.1.1. Geräte	.16
	2.1.2. Kits und Reagenziensätze	.16
	2.1.3. Chemikalien und Reagenzien	.17
	2.1.4. Zelllinien	.21
	2.1.5. Antikörper	.21
	2.1.6. Plasmide	.22
	2.1.7. PCR-primer	.22
	2.1.8. qRT-PCR: Primer und Sonden	.23
	2.1.9. siRNAs	.23
	2.1.10. Stimulantien	.23
	2.1.11. Viren	.24
	2.1.12. Software	.24
2.	2. Zellulär-immunologische Methoden ¹	.25
	2.2.1. Zellkultur	.25
	2.2.2. Transfektion und Stimulation	.25
	2.2.3. Knock-down mittels siRNA-Interferenz	.27
	2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und western-blot	.28

2.2.5. Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay (ELISA)	29
2.2.6. Bestimmung von Virustitern mittels TCID50	29
2.2.7. Luciferase- <i>assay</i>	30
2.2.8. Konfokale Mikroskopie	31
2.2.9. Immunfluoreszenz	32
2.2.10. Live-cell-imaging	32
2.2.11. Entnahme und Lyse von Mausorganen	33
2.3. Molekularbiologische Methoden	34
2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion	34
2.3.2. Ethidiumbromid-Gelelektrophorese	35
2.3.3. Restriktionsenzymverdau	35
2.3.4. Bakterientransformation	35
2.3.5. Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien (Miniprep und Maxiprep)	36
2.3.6. DNA-Sequenzierung	36
2.3.7. RNA-Aufreinigung	36
2.3.8. cDNA-Umschrieb (Reverse Transkription)	37
2.3.9. Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)	37
2.4. Statistik	38
. Ergebnisse	39
3.1. Einfluss eines verminderten TRIM9-Expressionsniveaus auf die RLH-abhäng Immunantwort	gige 39
3.1.1. Etablierung eines transienten knock-downs mittels siRNA-Interferenz	
3.1.2. Ein transienter <i>knock-down</i> von TRIM9 führt zu einer verringerten Expre RIG-I, INF- β und IP-10 nach Stimulation der RLHs mit synthetischen Ligander	ession von 141
3.1.3. Ein transienter <i>knock-down</i> von TRIM9 führt zu einer verringerten Expre RIG-I, INF-β und IP-10 nach Infektion mit ss(-)RNA- und (+)ssRNA-Viren	ession von 43
3.1.4. Ein transienter <i>knock-down</i> von TRIM9 führt zu einer geringeren Virusre nach Infektion mit ss(+)RNA- und ss(-)RNA-Viren	plikation 48
3.2. Einfluss eines erhöhten TRIM9-Expressionsniveaus auf die RLH-abhängige Immunantwort	49
3.2.1. Etablierung einer transienten Überexpression	49
3.2.2. Eine transiente Überexpression von TRIM9 führt zu einer gesteigerten E von RIG-I und INF-β nach Stimulation mit pI:C	Expression
3.2.3. Ein gesteigertes Expressionsniveau von TRIM9 führt zu einer gesteigert Aktivierung des ISRE-Promotors mit und ohne Voraktivierung	en 51
3.3. Detektion der Expression von endogenem TRIM9	54
3.3.1. Expressionslevel von TRIM9 in unterschiedlichen Zelllinien	54
3.3.2. Expressionslevel von TRIM9 in verschiedenen Mausorganen	56

3.4. Intrazelluläre Lokalisation von TRIM958
3.4.1. Intrazelluläre Verteilungsmuster von überexprimiertem TRIM958
3.4.2. Änderung intrazellulärer Verteilungsmuster von TRIM9 im live-cell-imaging60
4. Diskussion
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse62
4.2. Diskussion der Ergebnisse64
4.2.1. TRIM9 – immunstimulatorisches oder immunsuppressives Protein?64
4.2.2. TRIM9 – provirale oder antivirale Wirkung?66
4.2.3. Kritische Betrachtung der Methodik69
4.3. Ausblick
4.4. Relevanzbeurteilung72
5. Zusammenfassung73
6. Literaturverzeichnis
7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme81
8. Veröffentlichungen
8.1. Abstracts und Poster84
8.2. Vorträge84
9. Danksagung
10. Affidavit

1. Einleitung

1.1. Das menschliche Immunsystem

Virale Erkrankungen sind eine relevante Gefährdung für den menschlichen Organismus. In den letzten Jahren ist dies nie so deutlich geworden, wie in der Sars-CoV2-Pandemie, welche auf der ganzen Welt nicht nur viele tragische Todesopfer gefordert hat, sondern für jeden einzelnen einen massiven Einschnitt in das gewohnte und geplante Leben darstellte. Wenn Erkrankungen mit hoher Infektiosität und möglichem tödlichen Verlauf sich über die gesamte Welt verbreiten, wird so rasch wie möglich von der Wissenschaft eine Lösung im Sinne einer effektiven Therapie oder eines Impfstoffs gefordert. Eine so schnelle Entwicklung wie sie hier mehreren Unternehmen gelungen ist, ist nicht zuletzt auf ein in den letzten Jahren deutlich zunehmendes Verständnis antiviraler Immunantworten, sowie durch Grundlagenforschung möglich gemachte neue Impfstofftechnologien zurückzuführen. Der weiter bestehende Mangel an therapeutischen Optionen, macht jedoch deutlich, wie hochkomplex unser Immunsystem ist und wie schwierig es ist, einzelne Angriffspunkte zu identifizieren, um eine gezielte Abwehrreaktion auszulösen, ohne dem menschlichen Organismus dabei erheblichen Schaden zuzufügen.

Ähnlich gestaltet sich die Situation bei schon viel länger bekannten viralen Erkrankungen wie Masern oder Hepatitis B. Für beide sind Impfstoffe vorhanden, jedoch kein wirksames Therapeutikum. Umgekehrt wird seit Jahren erfolglos versucht ein Impfstoff gegen HIV oder Hepatitis C zu entwickeln, therapeutisch sind hier in den letzten Jahrzehnten jedoch bahnbrechende Erfolge gelungen. Dies verdeutlicht wie unterschiedlich und individuell angepasst jedes Virus in unserem Immunsystem erkannt und auf es reagiert wird und wie viele verschiedene Mechanismen Viren zur Immunevasion entwickelt haben.

In dieser Arbeit soll ein einzelner potenziellen Akteur in einem der vielen verschiedenen immunologischen Signalwege näher charakterisiert werden. Die Versuche in dieser Arbeit sind zwischen März 2013 und März 2014 entstanden, die Fragestellungen und Hypothesen basieren also auf bis zu diesem Zeitpunkt publizierten Daten. Bezug auf einige für die Fragestellung relevante, später publizierte Arbeiten wird in der Diskussion genommen.

1.1.1. Angeborene und erworbene Immunität

Grundlegend werden eingedrungene Erreger jedweder Art im menschlichen Organismus zunächst vom unspezifischen, angeborenen Immunsystem erkannt. Im weiteren Verlauf wird durch das adaptive Immunsystem eine spezifische Immunantwort in Form spezifischer T- und B-Zellen sowie spezifischer Antikörperbildung ausgelöst. Eine wichtige Komponente der Ersterkennung durch das angeborene Immunsystem ist zunächst die Unterscheidung zwischen körpereigenen Strukturen und eingedrungenen Pathogenen, damit eine Immunreaktion nur auf körperfremde Eindringlinge erfolgt und nicht im Sinne einer Autoimmunreaktion auf körpereigene Strukturen. Hierbei spielen ubiquitär exprimierte Mustererkennungsrezeptoren - *pattern recognition receptors* (PRRs) eine zentrale Rolle. Diese erkennen pathogene Strukturen, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPS) und *damage associated molecular patterns* (DAMPs), die für Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten typisch sind, im infektfreien, menschlichen Körper normalerweise jedoch nicht vorkommen (Akira, Uematsu et al. 2006).

1.1.2. Antivirale Immunität

Die virale Erkennung wird dadurch erschwert, dass Viren den körpereigenen Metabolismus zur Replikation nutzen. Im Gegensatz zu Bakterien weisen sie also keine spezifisch "fremden" Modifikationen an Proteinen, Lipiden oder Kohlehydraten auf. Die Ersterkennung von Viren erfolgt also meist über virusspezifische Strukturen der genetischen Information.

Zu Beginn einer Virusinfektion, also zu Beginn eines viralen Replikationszyklus, steht die Adsorption eines Virus in die Wirtszelle, durch Interaktion mit Oberflächenmolekülen. Diese Interaktion ist aufgrund der Molekülstruktur teils sehr spezifisch, wodurch sich erklärt, warum viele Viren nur in bestimmte Zellarten eindringen können. Die anschließende Aufnahme erfolgt meist durch Endozytose, hierauf folgt bei behüllten Viren die Fusion und das sogenannte *uncoating.* Hierbei wird das Virus aus dem Aufnahmevesikel freigesetzt, es zerfällt das Viruskapsid und virale Nukleinsäuren werden nach intrazellulär freigesetzt. Anschließend folgt die eigentliche Replikation. Hier nutzt das Virus die in der Zelle zur Verfügung stehenden Mechanismen zur Synthese neuer viraler Nukleinsäuren, sowie zur Proteinbiosynthese. Aus den hierbei entstehenden Struktur- und Funktionsproteinen werden neue Viruspartikel zusammengebaut, welche anschließend aus der Wirtszelle austreten. Entweder durch *budding*, wobei Membranbestandteile der Wirtszelle als Virushülle mitgenommen werden, oder durch Lyse der Wirtszelle und Freisetzung unbehüllter Viruspartikel.

Viren werden in der modernen Taxonomie nach verschiedenen Kriterien klassifiziert. Hierzu zählt die Größe und Struktur des Kapsids, das Vorhandensein einer Lipidhülle, sowie die Natur des viralen Genoms. Die Untereinteilung anhand des Genoms erfolgt im Rahmen der Baltimore-Klassifikation. Hierbei wird unterschieden, ob das genetische Material einzelsträngig (ss) oder doppelsträngig (ds) und als Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure (RNA) vorliegt. Einzelsträngige RNA kann außerdem positiv (+) oder negativ (-) orientiert vorliegen (Baltimore 1971).

Funktionell hat die Art des vorliegenden genetischen Materials vor allem Einfluss auf die Form der Replikation. DNA-Viren können die Polymerasen der Wirtszelle zur Replikation nutzen, da auch das menschliche Genom primär als DNA vorliegt. Im Gegensatz dazu brauchen RNA-Viren eine eigene RNA-abhängige DNA-Polymerase oder eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, um entweder ihr eigenes Genom direkt zu replizieren oder in einem zweiten Schritt die Enzyme der Wirtszelle zu nutzen. (+)ssRNA-Viren können ihre genomische RNA bereits ohne Zwischenschritt als *messenger* RNA (mRNA) nutzen.

Das virale Genom unterscheidet sich vom körpereigenen durch atypische Ribonukleinsäuren, die entweder besondere Strukturmerkmale oder eine untypische Lokalisation aufweisen. Diese dienen dem Immunsystem häufig als PAMP, das endosomal von transmembranären PRRs oder auch von zytosolischen PRRs detektiert werden kann (Kumar, Kawai et al. 2011).

1.1.3. Mustererkennungsrezeptoren

Zu den wichtigsten PRRs der Viruserkennung gehören die transmembranären *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), sowie die zytosolischen *RIG-I-like*-Helikasen (RLHs).

TLRs sind als transmembranäre Rezeptoren in der äußeren Plasmamembran oder intrazellulär in Membranen unterschiedlicher Zellorganelle, wie Endosomen, Lysosomen oder dem endoplasmatischen Retikulum, lokalisiert. Virale Nukleinsäuren, die nach dem uncoating entweder endosomal oder zytosolisch vorkommen, werden deshalb vor allem von letzterer Subgruppe detektiert (Kawasaki, Kawai et al. 2011). Hierbei ist eine gewisse Spezifität zwischen Rezeptor und Ligand zu beobachten, wobei (endolysosomale) dsRNA als Ligand von TLR3 und (endolysosomale) ssRNA als Ligand von TLR7 und TLR8 beschrieben sind (Takeda and Akira 2015). Die meisten, durch Bindung an ihre Liganden, aktivierten TLRs rekrutieren anschließend das Adapterprotein Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), welches anschließend über eine Signalkaskade zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren interferon regulatory factor 7 (IRF7), sowie Nuclear factor-κB (NF-κB) führt. Aktivierter TLR3 bindet hingegen an TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (TRIF) und führt hierüber, zusätzlich zu IRF7 und NF- κ B, zu einer Aktivierung von IRF3 (Kawasaki, Kawai et al. 2011).

Zu den zytosolischen RLHs gehört der namensgebende Vertreter *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I). Des Weiteren werden *melanoma differentiation association gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) dazu gezählt. (Rothenfusser, Goutagny et al. 2005, Yoneyama, Kikuchi et al. 2005, Takeuchi and Akira 2009). RLHs sind durch strukturelle Gemeinsamkeiten gekennzeichnet. Alle drei bestehen aus einer C-terminalen *regulatory/repressor domain* (RD), sowie einer *DExD/H-box helicase domain* mit ATPase

Aktivität, weshalb sie zu den *superfamily 2 (SF2) helicases/ATPases* gezählt werden (Gorbalenya, Koonin et al. 1988, Gorbalenya, Koonin et al. 1989). RIG-I und MDA5 haben zusätzlich am N-Terminus zwei *caspase activation and recruitment domains* (CARDs) zur Induktion von nachgeschalteten Signalwegen.



Abb. 1.1. Die RLR- und TLR-induzierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

Ebenso wie TLRs, haben RLHs spezifische Liganden. Als von RIG-I erkanntes PAMP, ist eine Triphosphatmodifikation am 5'-Ende der RNA und eine diesem Ende naheliegende doppelsträngige Sequenz von mindestens zehn Basenpaaren beschrieben (Hornung, Ellegast et al. 2006, Schmidt, Schwerd et al. 2009). Diese Modifikation ist in Wirtszellen durch posttrankriptionelle Modifikation normalerweise nicht frei zugänglich. Als synthetischer Ligand ist analog dazu Triphosphat-RNA (5'ppp-dsRNA, 5'-pppRNA, 3pRNA) mit den beschriebenen Modifikationen etabliert. Das Auftreten dieses PAMPs ist vor allem bei Infektionen mit (-)ss-RNA-Viren wie dem Influenza-Virus, dem Rabies-Virus, dem *Vesicular-stomatitis*-Virus (VSV) oder dem Sendai-Virus (SeV) beschrieben (Kato, Sato et al. 2005, Rehwinkel, Tan et al. 2010), aber auch bei (+)ssRNA-Viren wie dem Hepatitis C-Virus (HCV) (Saito, Owen et al. 2008, Schnell, Loo et al. 2012). MDA5 hingegen wird (deutlich stärker als RIG-I) durch längere dsRNA aktiviert. Diese wird vor allem von (+)ssRNA-Viren wie den Picornaviridae, zum Beispiel dem Enzephylomyokarditis-Virus (EMCV), oder dem Norovirus produziert. Ebenso wird die synthetische Polyinosinpolycytosinsäure (pI:C) von MDA5 detektiert (Kato, Takeuchi et al. 2006, McCartney, Thackray et al. 2008, Pichlmair, Schulz et al. 2009).

RIG-I und MDA5 induzieren nach Bindung an oben beschriebene PAMPs weiterführende Signalwege. Zunächst erfolgt über die CARDs die Interaktion mit mitochondrial activator of virus signaling MAVS. MAVS befindet sich in der äußeren Membran des Mitochondriums und interagiert hier mit TNF receptor-associated factor 2, 3, 5 und 6 (TRAF2, 3, 5 und 6). Hierüber werden die Proteinkinasen TANK-binding kinase 1 (TBK-1) und Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon (IKKE, IKK-i) aktiviert, welche über Phosphorylierung die Transkriptionsfaktoren IRF3 und IRF7, sowie NF-kB aktivieren. Nach Translokation in den Zellkern, führen diese zur Transkription multipler Gene der angeborenen, direkten antiviralen der Interferone, aber auch anderer inflammatorischer Immunität, insbesondere Signalmoleküle. (Seth, Sun et al. 2005, Goubau, Deddouche et al. 2013). LGP2 wird vor allem eine regulatorische Funktion zugeschrieben. Eine Interaktion mit viralen Nukleinsäuren ist gezeigt, der weitere Wirkmechanismus und Effekt bisher noch unbekannt. (Rothenfusser, Goutagny et al. 2005, Yoneyama, Kikuchi et al. 2005).

1.1.4. Antivirale Immunantwort und Zytokininduktion

Durch die oben beschriebene Signalkaskade und die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen PRRs zur Produktion verschiedenster Proteine. Ein Großteil davon hat entweder proinflammatorische Wirkung, löst also an der Wirtszelle und benachbarten Zellen eine Immunreaktion, teils bis hin zum eigenen Zelltod aus, oder entfalten direkt antivirale Wirkung und hindern das Virus an der weiteren Replikation. Besonders wichtig sind hierbei Interferone (IFNs), sekretorische Proteine, die vielfältige Effekte auf die Immunreaktion haben. Interferone werden in drei Klassen, Typ I-III, unterteilt. Zentral in der angeborenen, antiviralen Immunantwort sind die Typ-I-Interferone. Hierzu gehören beim Menschen 13 verschiedene IFN- α , sowie je ein IFN- β , IFN- κ , IFN- ϵ und IFN- ω . (Isaacs and Lindenmann 1957, Darnell, Kerr et al. 1994, Carrero 2013). Typ-I-Interferone binden an den IFN-α-Rezeptor (IFNAR), der aus zwei Untereinheiten besteht, die nach Bindung an ihren Liganden und aneinander den JAK-STAT-Signalweg aktivieren. Dieser führt unter anderem zur Bildung des Komplexes IFNstimulated-gene-factor-3 (ISFG3), welcher erneut als Transkriptionsfaktor aktiv ist und über die Bindung an das interferon stimulated response element (ISRE) in deren Promotorregionen zur Expression hunderter durch Interferon stimulierbarer Gene (ISGs), zu denen auch abermals die RLHs zählen, führt (Taylor and Mossman 2013). Durch die Induktion von ISGs wird die Immunreaktion amplifiziert. Zahlreiche von ihnen besitzen direkte antivirale Aktivität, degradieren virale Nukleinsäuren oder hemmen die virale Proteinsynthese (Yan and Chen 2012). ISFG3 führt jedoch neben der Expression von ISGs auch erneut zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF7, der erneut die Bildung von Typ-I-Interferonen induziert. Hiermit entsteht ein Feedback-loop, mit dem sich die Typ-I-Interferon-basierte Immunantwort selbst aufrechterhält und verstärkt (Lu, Au et al. 2000, Génin, Morin et al. 2003).

1.2. Hepatitis C

Der rasante Fortschritt in Diagnostik und Therapie der Hepatitis C-Infektion ist eine der großen Erfolgsgeschichten der medizinischen Forschung der letzten Jahrzehnte. Auch deshalb wurde für die Entdeckung des Hepatitis C-Virus im Jahr 2020 der Nobelpreis für Medizin verliehen.

Das Hepatitis-C Virus führt vorrangig zu einer Entzündung der Leber. In etwa 50-70 Prozent der Fälle nimmt sie einen chronischen Verlauf, wobei die Zahlenangaben in der Literatur hier stark schwanken (Micallef, Kaldor et al. 2006). Etwa jeder dritte bis fünfte chronisch HCV-Infizierte entwickelt eine Leberzirrhose. Auf Boden einer HCV-assoziierten Leberzirrhose entwickeln etwa drei bis sechs Prozent ein hepatozelluläres Karzinom (HCC). Aufgrund des häufig chronischen Verlaufs, ist HCV eine der häufigsten Ursachen für Lebertransplantationen.

Trotz rascher Entwicklung effektiver Testmöglichkeiten, stellt die virale Hepatitis weiterhin ein weltweit relevantes gesundheitliches Problem dar. Zwischen 1990 und 2013 schaffte es die virale Hepatitis vom 10. auf den 7. Platz der weltweiten Todesursachen zu steigen, vor HIV, Malaria und Tuberkulose, mit etwa 1,45 Millionen HCV-assoziierten Todesfällen pro Jahr (Stanaway, Flaxman et al. 2016). Auch 2015 starben noch 1,34 Millionen Menschen an den Folgen einer HCV-Infektion, wobei 71 Millionen mit einer chronischen Infektion lebten (WHO 2017). Grund dafür war einerseits der fehlende Fortschritt bei der Entwicklung einer Impfung, bis heute gibt es kein wirksames Vakzin. Auch therapeutisch gelang lange Zeit kein Fortschritt. Bis 2011 wurde die HCV-Infektion, genau wie schon seit 1998, mit pegyliertem-Interferon-a und Ribavirin (ein virostatisch wirkendes Nukleosid-Analogon) behandelt. Dies zeigte nur begrenzte Therapieerfolge und ging meist mit massiven Nebenwirkungen einher. 2011 wurden schließlich die ersten direct antiviral agents (DAAs) zugelassen und haben sich seitdem in der Therapie der akuten und chronischen Hepatitis C durchgesetzt. Nach aktuell geltender deutscher Leitlinie (Sarrazin, Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie et al. 2018), sollte die Therapie der chronischen Hepatitis C nun ohne das nebenwirkungsreiche IFN erfolgen. Stattdessen kommt eine Kombinationstherapie aus mehreren DAAs zum Einsatz. Diese können oral appliziert werden, zeigen nur geringe Nebenwirkungen und erreichen hohe Ansprechraten mit meist dauerhafter Viruselimination. Auf Boden dieser Entwicklungen hat sich die WHO das Ziel gesetzt, Hepatitis C bis 2030 weltweit zu eliminieren (WHO 2017).

1.2.1. Das Hepatitis C-Virus (HCV)

Das Hepatitis C-Virus (HCV) gehört zur Familie der Flaviviridae und ist ein ss(+)RNA-Virus (Kim and Chang 2013). Das Genom ist umgeben von einem Nukleokapsid mit einer Hülle aus Wirtsmembran und integrierten viralen Glykoproteinen. Die Viren lassen sich unter dem Elektronenmikroskop als sphärische Partikel mit 50nm Durchmesser darstellen (Kaito,

Watanabe et al. 1994). Das HCV-Genom besteht aus 9,6kb, hierin befindet sich eine hochkonserviert 5'-*untranslated region* (5'UTR), ein langer *open reading frame* (ORF), sowie eine 3'UTR. Nach Transkription und Translation entsteht aus der ORF-Sequenz zunächst ein Vorläuferprotein aus etwa 3000 Aminosäuren. Virale und zelluläre Proteasen spalten dieses in zehn verschiedene Polypeptide (Grakoui, McCourt et al. 1993, Grakoui, Wychowski et al. 1993). Hierbei wird in der Benennung zwischen strukturellen (Core, E1, E2) und nichtstrukturellen Proteinen (NS 2-5) unterschieden (Lauer and Walker 2001).

Pro Tag werden im infizierten Wirtsorganismus etwa 10¹² Virionen produziert. Diese hohe Viruslast führt früh zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Aufgrund der vorrangig extranukleären Replikation, wird HCV vor allem von zytosolischen Rezeptoren erkannt. Hierüber kommt es zu einer PRR-abhängigen Expression von Typ-I-Interferonen. Hierbei agieren vor allem RIG-I, MDA-5 und TLR3 als primäre PRRs. Die als Ligand von RIG-I und TLR3 beschriebene 5'ppp-dsRNA, sowie bisher nur im Falle von HCV beschriebene U/UC-reiche Sequenzen (pU/UC HCV genomic RNA), dienen als PAMP (Saito, Owen et al. 2008, Schnell, Loo et al. 2012, Chow, Gale et al. 2018).

Um diese Immunaktivierung zu umgehen, besitzt HCV zahlreiche Immunevasions-Strategien (Ortega-Prieto and Dorner 2017). So hat zum Beispiel HCV-Protease NS3/4a zusätzlich zur Spaltung des Vorläuferproteins in Strukturproteine, die Fähigkeit MAVS und TRIF zu spalten, was eine Aktivierung des weiteren RLR- und TLR-Signalwegs verhindert (Li, Foy et al. 2005, Li, Sun et al. 2005). Außerdem kann HCV mit *Suppressor of cytokine signalling 1* (SOCS1) und SOCS3 interagieren, welches über Regulierung des JAK/STAT-Signalwegs die Interferonausschüttung reduzieren kann (Yao, Waggoner et al. 2005). Auch kann das NS4b-Protein die Aktivierung von TBK1 verhindern und auch hierüber die Expression von Interferonen verringen (Ding, Cao et al. 2013).

Ein Grund für stark variierende Ausheilungs- und Chronifizierungsraten, aber auch für unterschiedliches Ansprechen auf Therapeutika, ist unter anderem die sehr heterogene Viruspopulation. Die HCV-Polymerase besitzt keine Korrekturlesefunktion und ist somit sehr fehleranfällig. Durch Einzelnukleotid-Substitutionen im Rahmen der Replikation kommt es zu Mutationen. Einige davon haben keine Konsequenz, andere wirken sich nachteilig aus, und manche sind für das Virus von Vorteil und begründen so neue Viruspopulationen. Nach dem Grad ihrer genetischen Verwandtschaft lassen sich Viren in unterschiedliche Genotypen, oder nach ihrer Reaktivität gegenüber Antikörpern in Serotypen unterteilen. Für HCV sind aktuell sechs relevante Genotypen bekannt (Simmonds 2001). Mit 40-80 Prozent stellt Genotyp 1 insgesamt weltweit den häufigsten Genotyp dar. Die Bestimmung der Genotypen ist insbesondere aufgrund des unterschiedlichen Ansprechens und der Resistenzbildung auf die

aktuellen Therapeutika von zunehmender Relevanz (Sarrazin, Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie et al. 2018).

1.2.2. Auswirkung genetischer Variation auf den Verlauf einer HCV-Infektion

Die durchschnittliche Rate an Spontanausheilungen einer HCV-Infektion wird in verschiedenen Studien, je nach Kollektiv, mit Werten zwischen 20 und 50 Prozent beziffert. Signifikante Unterschiede zeigen sich hier aufgrund von viralen Eigenschaften, wie Genotyp und Infektionsdosis, aber auch aufgrund diverser Faktoren innerhalb der infizierten Patienten, wie Geschlecht, ethnische Abstammung, Begleiterkrankungen und genetischen Polymorphismen (Lehmann, Meyer et al. 2004, Micallef, Kaldor et al. 2006, Grebely, Raffa et al. 2007).

Unter genetischen Polymorphismen versteht man die auftretenden Variationen zwischen den Genomen zweier Individuen der gleichen Spezies. Am häufigsten kommt es im menschlichen Genom zum Austausch einzelner Basen. Wird eine Base an einer bestimmten Stelle, bei mindestens einem Prozent einer Bevölkerungsgruppe gegen immer die gleiche Base ausgetauscht, so wird diese Mutation als *single nucleotide polymorphism* (SNP) bezeichnet. SNPs können in der gesamten DNA, also sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Bereichen vorkommen. Hat ein SNP keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz, wird er "synonymer" SNP genannt. "Nicht-synonyme" SNPs führen meist zu einer veränderten Proteinstruktur und so zu potenziellen Fehlfunktionen. Inzwischen weiß man, dass auch "synonyme" SNPs einen Einfluss auf den Phänotyp haben können. Da das menschliche Genom zu einem Großteil aus nicht kodierenden Bereichen besteht, ist hier auch die Häufigkeit von SNPs relevant höher. Auch wenn sie hier keine direkte Änderung in der Aminosäuresequenz nach sich ziehen, so haben SNPs hier doch oft einen Einfluss auf die Genfunktion, durch Änderung der Promotor-Aktivität, der mRNA-Konformation, oder der Translationseffizienz (Shastry 2009).

Mit einer unterschiedlichen Chronifizierungsrate der HCV-Infektion wurden bisher unter anderem Polymorphismen im Bereich der Gene TLR3 (Lee, Brown et al. 2013), MDA5 (Hoffmann, Schmidt et al. 2015) und *Interleukin 28B* (IL-28B) (EI Awady, Bader El Din et al. 2013, da Silva Conde, Soares Monteiro et al. 2014) assoziiert.

In einer genomweiten Assoziationsstudie konnten außerdem in einer großen europäischen Kohorte zwei Gene, die in der Apoptose eine Rolle spielen (MERTK und TULP1) mit einem rascheren Fortschreiten der Leberfibrose bei HCV-Infektion assoziiert werden (Patin, Kutalik et al. 2012). Eine Assoziation mit dem Progress der Fibrose konnte in unterschiedlichen Studien außerdem für *Patatin-like phospholipase domain-containing protein* (PNPLA),

transmembrane 6 superfamily 2 protein (TM6SF2), IL-28B, chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1), DEP domain containing protein 5 (DEPCD5) und Vitamin-D-Rezeptor beschrieben werden. Eine Aussage über die Prognose ist im Einzelfall jedoch schwierig, da die Fibrosierung der Leber nicht linear verläuft (Thein, Yi et al. 2008).

1.2.3. Korrelation eines SNPs der 3'UTR von *Tripartite-motif-protein* 9 (TRIM9) mit dem Ausgang einer HCV-Infektion

In einer Vorarbeit durch eine Kooperationsgruppe¹, konnte in einer genomweiten Assoziationsstudie, neben dem bekannten SNP in IL-28B, ein SNP in der 3'UTR von TRIM9 (SNP rs12879906, Basenposition 1379 der TRIM9-3'UTR) identifiziert werden, welcher mit unterschiedlichen Raten der Chronifizierung einer HCV-Infektion korrelierte. Das untersuchte Patientenkollektiv waren hier Frauen, die zwischen 1978 und 1979 in der Deutschen Demokratischen Republik im Rahmen der Anti-D-Immunprophylaxe iatrogen mit HCV infiziert wurden. Diese Kohorte konnte inzwischen, insbesondere Aufgrund der ausgeprägten Homogenität hinsichtlich Alter, Geschlecht und Infektionsdosis, sowie dem inzwischen knapp vierzigjährigen Beobachtungszeitraums, in prospektiven Studien untersucht werden.

TRIM9-3'UTR-SNP rs12879906	Homozygot G/C n=223	Heterozygot n=31	Homozygot A/T n=7	Summe N=261
Chronifizierung (n)	173	13	5	191
Spontanausheilung (n)	50	18	2	70
Ausheilungsrate (%)	22,4	58	28,5	26,8

Abb. 1.2. Der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs12879906 in der TRIM9-3'UTR ist mit unterschiedlichen Spontanausheilungsraten einer HCV-Infektion assoziiert (modifiziert nach Rückel 2018).

In der durchgeführten Assoziationsstudie, wurde aus oben beschriebener Kohorte, der Genotyp der 261 Patientinnen bestimmt, deren individuelle Verläufe hinsichtlich einer Chronifizierung der HCV-Infektion bekannt waren. Im untersuchten Kollektiv zeigte sich eine Spontanheilungsrate von 26,8 Prozent, also eine Chronifizierung der Infektion in 73,2 Prozent der Fälle (191 von 261 Patientinnen). Diese Raten entsprechen in etwa den bisher in der Literatur beschriebenen Krankheitsverläufen (Micallef, Kaldor et al. 2006).

In der Gruppe der Patientinnen, die an Position des SNPs in der TRIM9-3'UTR, den Genotyp "homozygot G/C" (n=223) aufwiesen, zeigte sich phänotypisch der höchste Anteil an chronisch verlaufenden Infektionen, mit 77,6 Prozent, somit lediglich einer Ausheilungsrate von 22,4 Prozent. Die Patientinnen mit dem Genotyp "heterozygot" (n=31) zeigten nur in 42 Prozent eine Chronifizierung, somit eine Ausheilungsrate von 58 Prozent. Die Gruppe "homozygot A/T" zeigte mit nur 7 Patientinnen eine geringe genotypische Prävalenz. Vernachlässigt man diese Gruppe, so scheint der Austausch eines G/C-Basenpaars durch ein A/T, im Rahmen des SNPs, eine deutlich höhere Spontanausheilungsrate der HCV-Infektion zur Folge zu haben.

¹ Die SNP-Assoziationsanalyse wurde durch die Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Protzer durchgeführt (Institut für Virologie der Technischen Universität München).

1.3. TRIM9

1.3.1. TRIM-Proteine

TRIM9 gehört zur Gruppe der TRIM-Proteine, welche insgesamt 79 Mitglieder hat. Gemeinsam ist allen die N-terminale Grundstruktur aus einer *really interesting new gene* (RING)-Domäne, einer oder zwei *B Box (BB)*-Domänen, und einer *coiled coil (CC)*-Domäne.



Subgruppe	TRIM-Proteine	Variable Domänen
I	1, 9, 18, 36, 46, 67	COS-FN3-PRY/SPRY
II	54, 55, 63	COS
III	42	COS-FN3
IV	4-7, 10, 11, 15, 17, 21, 22, 25-27, 34, 35, 38, 39, 41, 43, 47-50,	PRY/SPRY
	53, 58, 60, 62, 64, 65, 68, 69, 72, 75	
V	8, 19, 31, 40, 52, 56, 61, 73, 74	-
VI	24, 28, 33	PHD-BR
VII	2, 3, 32, 71	Filamin-NHL
VIII	37	MATH
IX	23	ARF
Х	45	Filamin
XI	13, 59	TM

Abb. 1.3. Klassifikation der TRIM-Proteine. Alle TRIM-Proteine bestehen aus einem konservierten N-Terminus, aus einer *RING*-Domäne, zwei *B-Box*-Domänen und einer *coiled-coil*-Domäne. Die TRIM-Proteine der Subgruppen II, VIII und XI verfügen lediglich über eine *B-Box*-Domäne. Anhand der unterschiedlichen C-terminalen Domänen, lassen sich die TRIM-Proteine in 11 Subgruppen unterteilen (modifiziert nach Versteeg, Rajsbaum et al. 2013).

Für einige TRIM-Proteine konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie, analog zu anderen Proteinen mit RING-Domäne, eine von dieser Zinkfingerdomäne vermittelte E3-ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzen (Lorick, Jensen et al. 1999, Diaz-Griffero, Li et al. 2006, Ishikawa, Tachikawa et al. 2006, Gack, Shin et al. 2007). Auch die BB-Domänen sind Zinkfingerdomänen, welche in einigen TRIM-Proteinen einen regulatorischen Einfluss haben. CC-Domänen sind auch in einer Vielzahl anderer Proteine für Interaktionen mit anderen Proteinen und Bildung von Proteinkomplexen relevant (Ozato, Shin et al. 2008).

Anhand ihrer variablen Domänen am C-terminalen Ende, lassen sich die TRIM-Proteine in elf Untergruppen unterteilen (Short and Cox 2006, Ozato, Shin et al. 2008). TRIM9 gehört zur Gruppe I und hat somit genau wie TRIM1, 18, 36, 46 und 67 eine Cos-Domäne, eine FN3-Domäne, sowie eine PRY/SPRY-Domäne. Die Cos-Domäne kommt in vielen Proteinen vor und vermittelt typischerweise die Bindung an Mikrotubuli (Short and Cox 2006). PRY- und SPRY-Domänen kommen in TRIM Proteinen einzeln oder fusioniert vor und haben vermutlich meist eine Funktion als Bindungsdomäne für andere Proteine (D'Cruz, Babon et al. 2013).

Bioinformatischen Analysen legen nahe, dass eine Mehrzahl der TRIM-Proteine durch alternatives Spleißen, welches in etwa der Hälfte der Fälle zum Verlust einer oder mehrere Proteindomänen führt, in verschiedenen Isoformen exprimiert werden (Versteeg, Rajsbaum et al. 2013). Einige unterschiedliche Isoformen konnten inzwischen auch experimentell nachgewiesen werden (Gack, Kirchhofer et al. 2008, Cuchet, Sykes et al. 2011).

1.3.2. Funktion von TRIM-Proteinen im Immunsystem

Die Zahl der TRIM-Proteine ist im Laufe der Evolution rasch gestiegen. Bei einem Großteil lassen sich in der Entwicklung Parallelen zu Immunrezeptoren im Laufe der Evolution ziehen. Inzwischen ist nicht nur bei mehreren TRIM-Proteinen eine genaue Rolle im angeborenen Immunsystem charakterisiert, es gibt auch systematische Untersuchungen, die eine solche Rolle für fast alle bekannten TRIM-Proteine nahelegen (Versteeg, Rajsbaum et al. 2013, Rajsbaum, Garcia-Sastre et al. 2014). Für 17 von 28 untersuchter TRIM-Gene konnte nach einer Virusinfektion, eine gesteigerte Expression gezeigt werden (Ozato, Shin et al. 2008, Rajsbaum, Stoye et al. 2008). In humanen Immunzellen konnte sogar für 27 von 72 TRIM-Proteinen eine Änderung der Expression nach Stimulation mit Interferon festgestellt werden (Carthagena, Bergamaschi et al. 2009). Im Promotor von TRIM5 α konnte ein ISRE nachgewiesen werden und sowohl für TRIM5 α , als auch für TRIM19 und TRIM22 ein direkter Einfluss von Typ-I-IFN auf deren Expression gezeigt werden (Regad, Saib et al. 2001, Asaoka, Ikeda et al. 2005, Sakuma, Noser et al. 2007, Barr, Smiley et al. 2008).

TRIM-Proteine erfüllen vielfältige Funktionen. So agieren einige als direkte virale Restriktionsfaktoren, andere regulieren antivirale Signalwege. Viele nutzen hierfür ihre Funktion als E3-Ubiquitin-Ligasen und vermitteln durch K48- oder K63-verkettete Polyubiquitinierung eine Änderung der Proteinaktivität, oder den proteasomalen Abbau (Davis and Gack 2015).

Als direkter Restriktionsfaktor wurde zum Beispiel TRIM19 während Infektionen mit Influenza-A, Ebola, Lassafieber und HIV beschrieben (Turelli, Doucas et al. 2001, Nisole, Stoye et al. 2005). Im Kontext retroviraler Infektionen, insbesondere mit HIV, scheinen einige TRIM- Proteine als Restriktionsfaktoren zu agieren. TRIM5α bindet an das Viruskapsid des HI-Virus und verhindert dessen *uncoating*. TRIM11, TRIM22 und TRIM32 unterdrücken die Expression verschiedener Gene. TRIM22 und TRIM15 hemmen die Produktion von Viruspartikeln (Nisole, Stoye et al. 2005, Sebastian and Luban 2005, Javanbakht, Yuan et al. 2006, Barr, Smiley et al. 2008, Ozato, Shin et al. 2008, Uchil, Quinlan et al. 2008).

Wie oben und in der Arbeit von J. Rückel (Rückel 2018) beschrieben, legte das systematische Screening von Versteeg et al., einen Einfluss von etwa der Hälfte aller TRIM-Proteine auf die Typ-I-IFN-basierte Immunantwort nahe (Versteeg, Rajsbaum et al. 2013). Mögliche Mechanismen, sind bisher nur für einzelne TRIM-Proteine untersucht. TRIM6 synthetisiert beispielsweise unverankerte Polyubiquitinketten, die zur verstärkten Immunantwort mittels Typ-I-IFN führen (Rajsbaum, Garcia-Sastre et al. 2014). TRIM25 ist durch Typ-I-IFN induzierbar und scheint eine K63-verkettete-Polyubiquitinierung der CARD-Domänen von RIG-I zu vermitteln, wodurch die Interaktion von RIG-I mit MAVS, und somit die weitere Aktivierung des Signalwegs, verstärkt wird (Gack, Shin et al. 2007). Auch TRIM4 scheint einen ähnlichen Effekt zu katalysieren (Yan, Li et al. 2014). TRIM44 scheint den K-48-Polyubiquitinvermittelten Abbau von MAVS zu inhibieren und damit einen verstärkenden Effekt auf den Signalweg der RLHs zu haben (Yang, Wang et al. 2013). Für TRIM11 konnte eine Inhibition der RIG-I-assoziierten IFN-β-Produktion auf Ebene von TBK1 gezeigt werden (Lee, Song et al. 2013). Einige TRIM-Proteine agieren auf Ebene der Typ-I-IFN-induzierenden Transkriptionsfaktoren. Für TRIM21 konnte ein stabilisierender Einfluss auf IRF3 demonstriert werden (Yang, Shi et al. 2009), wohingegen TRIM30α NF-κB zu inhibieren scheint (Shi, Deng et al. 2008).

1.3.3. TRIM9 - Stand der Literatur

Wie oben beschrieben, gehört TRIM9 zur Untergruppe I der TRIM-Proteine, hat neben den typischen Domänen also am C-Terminus eine COS-Domäne, eine FN3-Domäne, sowie eine PRY/SPRY-Domäne. Die Untersuchungen von Versteeg et al. legen nahe, dass TRIM9 ebenso wie andere TRIM-Proteine, in unterschiedlichen Isoformen exprimiert wird (Versteeg, Rajsbaum et al. 2013). Hierüber liegen zu Beginn dieser Arbeit jedoch keine weiteren Daten vor.



Abb. 1.4. Schematische Darstellung der Protein-Domänen von TRIM9. Neben den konservierten Domänen, besteht TRIM9 als Mitglied der Subgruppe I aus einer Cos-Domäne, einer FN3-Domäne, sowie einer PRY/SPRY-Domäne.

Bis 2013 ist die Literatur über TRIM9 sehr begrenzt und legt vor allem eine Rolle im neurowissenschaftlichen Kontext Nahe. Beispielsweise detektiert eine Expressionsanalyse auf mRNA-Ebene TRIM9 in der Embryonalentwicklung von Mäusen vor allem im zentralen Nervensystem (Berti, Messali et al. 2002). Des Weiteren scheint TRIM9 während einer Parkinson-Erkrankung und einer Lew-Body-Demenz in seiner Expression reduziert zu sein (Tanji, Kamitani et al. 2010). Mechanistisch ist für TRIM9 dabei bisher eine Rolle in der synaptischen Exozytose durch Interaktion mit dem SNARE-Komplex beschrieben (Li, Chin et al. 2001). Des Weiteren soll TRIM9 eine Rolle bei der axonalen Verzweigung von neuronalen Zellen spielen (Hao, Adler et al. 2010).

Außerdem scheint TRIM9 auch im immunologischen Kontext Relevanz zu haben, auch wenn bisher widersprüchliche Rollen beschrieben sind. Carthagena et al. demonstrieren zwar eine geringe Reduktion der Expression von TRIM9 nach Stimulation durch Interferon, zeigen aber auch eine deutliche Steigerung der Expression von TRIM9 in Makrophagen nach Aktivierung durch Immunkomplexe (Carthagena, Bergamaschi et al. 2009). In dem systematischen Screening von Versteeg at al. hat, eine Überexpression aller TRIM-Proteine der Gruppe I (TRIM1, 9, 18, 36, 67), außer TRIM 46, eine Steigerung der Promotoraktivität von Typ-I-IFN und IRSE zur Folge. Außerdem wird hier in *loss-of-function*-Experimenten mit *small-hairpin*-RNAs (shRNA) eine fördernde Wirkung von TRIM9 auf die Sendai-Virus-induzierte Expression von IFN-β demonstriert (Versteeg, Rajsbaum et al. 2013).

Experimente unserer eigenen Arbeitsgruppe konnten bisher zeigen, dass TRIM9 in 1205Lu-Zellen durch die Stimulation mit Interferon- β nicht induzierbar ist¹.

¹ Diese Daten wurden von Frederike Saathoff erhoben und sind bisher unveröffentlicht.

1.4. Fragestellung

Auf Boden der bisher beschriebenen Vorarbeiten, soll diese Arbeit die Rolle von TRIM9 in der antiviralen Immunität näher untersuchen. Die genomweite Assoziationsstudie, in der ein SNP in der 3'UTR von TRIM9 Einfluss auf Spontanausheilungsraten einer HCV-Infektion hatte, führte zu der Hypothese, dass TRIM9 in einem hierbei relevanten Signalweg eine Rolle spielt. Da HCV das angeborene Immunsystem vornehmlich über RIG-I, MDA-5 und TLR3 aktiviert, soll hier die Hypothese untersucht werden, dass TRIM9 einen Effekt auf die RIG-I-induzierte Immunantwort hat. Außerdem soll ein möglicher Mechanismus näher eingegrenzt werden. Hieraus ergeben sich folgende konkrete Fragestellungen:

- Hat eine Änderung des Expressionsniveaus von TRIM9 einen Einfluss auf die RLHabhängige Immunantwort nach Stimulation oder Virusinfektion?
- Wo wird TRIM9 endogen exprimiert?
- Wo ist TRIM9 innerhalb der Zelle lokalisiert?
- Besteht eine direkte Interaktion zwischen TRIM9 und Proteinen des RLH-Signalwegs oder Virusbestandteilen wären einer Infektion?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Alpha Imager HP CO2-Begasungsbrutschrank BBD 6220 CELLview Zellkulturschale mit Glasboden Eismaschine Gefrierschrank (-80°C) Image Reader LAS-4000 Konfokalmikroskop Leica TCS SP5 Kühl-, Gefrierschränke (4°C, -20°C) Lamin Air Flow Werkbank HB 2448 Lichtmikroskop Axio Vert25 LightCycler 480 II Mithras LB940 Microplate Reader Multi-well-Platte Nanodrop 2000c Spectrophotometer Neubauer Zählkammer pH-Meter SB70P Spannungsgerät PowerPac Basic/Pac200 Thermo Cycler T3 Thermomixer **UV-Transilluminator** Vortexer Waage LP 6209 Waage SBC 21 Wärmeschrank B290 Wasser-Inkubationsbad Zentrifuge gekühlt 5415R Zentrifuge 5424 Zentrifuge Multifuge 3L-R Zentrifuge Sepatech Omnifuge

2.1.2. Kits und Reagenziensätze

Bio-Plex Lysis *Kit* Humanes IP-10 ELISA *Set Luciferase-Assay Kit MaxiPrep Kit* NucleoBond Xtra Maxi Plus EF peqGOLD *Total RNA Kit* peqGOLD Gel *Extraction Kit Plasmid Miniprep Kit* QuickExtractTM DNA *Extraction Solution* Fa. Alpha Innotech, San Leandro (USA) Fa. Heraeus, Hanau (D) Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen (DE) Fa. Ziegra (DE) Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA) Fa. Fujifilm, Minato (Japan) Fa. Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DE) Fa. Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe (DE) Fa. Heraeus, Hanau (DE) Fa. Zeiss, Oberkochen (D) Fa. Roche Diagnostics, Mannheim (DE) Fa. Berthold Technologies, Bad Wildbad (D) Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA) Fa. Optik Labor Frischknecht, Balgach (DE) Fa. SympHony VWR, Darmstadt (DE) Fa. Biorad, Hercules (USA) Fa. Biometra, Göttingen (D) Fa. Eppendorf, Hamburg (DE) Fa. LKB Bromma, (Schweden) Fa. Janke & Kunkel, Staufen (DE) Fa. Sartorius, Göttingen (DE) Fa. Scaltec Instruments, Heiligenstadt (DE) Fa. Heraeus, Hanau (D) Fa. GFL, Burgwedel (D) Fa. Eppendorf, Hamburg (DE) Fa. Eppendorf, Hamburg (D) Fa. Heraeus, Hanau (DE)

Fa. Heraeus, Hanau (DE)

Fa. Biorad, Hercules (USA)
Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
Fa. BioThema, Handen (S)
Fa. Quiagen, Hilden (D)
Fa. Macherey-Nagel, Düren (D)
Fa. Peqlab, Erlangen (D)
Fa. Peqlab, Erlangen (D)
Fa. Fermentas, St. Leon-Roth (D)
Fa. Epicentre, Madison (USA)

2.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Zellkultur

Aqua ad iniectabilia	Fa. Braun, Melsungen (DE)
Calciumchlorid	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ciprofloxacin	Fa. Stada, Bad Homburg (DE)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Fetal calf serum (FCS)	Fa. Gibco Life Technologies, Carlsbad (USA)
L-Glutamin	Fa. Lonza, Basel (CH)
Natriumchloridlösung (0,9 %)	Fa. B. Braun, Melsungen (D)
Opti-MEM (Minimal Essential Medium)	Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA)
Phosphate-buffered saline (PBS)	Fa. Lonza, Basel (CH)
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	Fa. PAA, Pasching (AT)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Trypsin 10x	Fa. Lonza, Basel (CH)
Tryptose-Phosphat-Broth-Lösung (29,5 g/l)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
VLE RPMI 1640 Medium	Fa. Biochrom, Berlin (DE)

DMEM-Vollmedium	RPMI-Vollmedium	BHK-Medium
10 Vol.% FCS	100 IU/ ml Penicillin	10 Vol.% FCS
2 mM L-Glutamin	100 µg/ ml Streptomycin	2 mM L-Glutamin
10 mg/l Ciprofloxacin	1,5 mM L-Glutamin	10 mg/l Ciprofloxacin
in DMEM	10 Vol. % FCS	1 Vol.% Tryptosephosphat-Lösung (29,5 g/l)
	in RPMI 1640 Medium	in DMEM

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

Transfektionsreagenzien	
GeneJuice	Fa. Merck Novagen, Darmstadt (D)
Lipofectamine-2000	Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA)
Lipofectamine RNAiMax	Fa. Invitrogen, Carlsbad (USA)
TransIT-X2	Fa. Mirus, Madison (USA)

Western-blot

Acrylamidstammlösung (30 %)
Ammonium Persulfat (10 %)
β-Mercaptoethanol
Blotting paper
Bovines Serum Albumin (BSA)
Bromphenolblau

Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Fa. Biorad, München (DE)
Fa. Schleicher & Schuell, Dassel (DE)
Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Fa. Roth, Karlsruhe (D)

- Dithiothreitol Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) Glycerol Glycin Methanol Milchpulver Natriumchlorid Natriumlaurylsulfat (SDS) Natriumorthovanadat (Na3VO4) Nitrocellulose membrane Prestained protein molecular weight marker plus Protease Inibitor Cocktail P8340 Tetramethylethylendiamin (TEMED) Transfermembran, Porengröße 45 µm Tromethamin (TRIS) Tween-20 SuperSignal West Femto Sensitivity Substrate SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate
- Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Merck, Darmstadt (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) Fa. Amersham, Little Chalfont (GB) Fa. Fermentas, St. Leon-Roth (DE) Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Merck, Darmstadt (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Roth, Karlsruhe (D) Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA) Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)

Laufpuffer (1x)

192 mM Glycin 25 mM Tromethamin (TRIS) 3,47 mM Natriumlaurylsulfat in Wasser

Transferpuffer (1x)

100 mM Glycin 10 mM Tromethamin (TRIS) 20 Vol.% Methanol in Wasser

TBST-Puffer (1x)

50 mM Tromethamin (TRIS) 150 mM Natriumchlorid 0,1 Vol.% Tween-20 Einstellung pH 7.6 in Wasser

Resolving-Gel-Puffer (4x)

1,5 M Tromethamin (TRIS) 13,87 mM Natriumlaurylsulfat Einstellung pH 8,8 (HCL) in Wasser *filtriert, Porengröße 0,45 μm

Stacking-Gel-Puffer (4x)

250 mM Tromethamin (TRIS) 13,87 mM Natriumlaurylsulfat Einstellung pH 6,6 (HCL) in Wasser *filtriert, Porengröße 0,45 μm

Laemmli-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

Zelllysepuffer (RIPA)

150 mM Natriumchlorid 25 mM TRIS-HCL Proteaseinhibitor P8340, 1:100 2 mM Na3VO4 0.1 Vol.% SDS

ELISA

Bovine serum albumin (BSA)	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Natriumhydrogencarbonat NaHCO3	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Natriumcarbonat Na2CO3	Fa. Merck, Darmstadt (D)
Natriumhydroxid NaOH	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Schwefelsäure	LMU Klinikapotheke, München (D)
Tetramethylbenzidin / Hydrogenperoxid	Fa. BD Biosciences, Heidelberg (D)
Tween-20	Fa. Roth, Karlsruhe (D)

<u>Assay-Diluent</u>

10 Vol.% FCS in PBS

Waschpuffer 0,05 Vol.% Tween-20 in PBS

Coating-Puffer

0,1 M Natriumcarbonat Einstellung pH 9,5 (NaOH) in Wasser

Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

6x DNA Loading Dye	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Agarose	Fa. Sigma-Aldrich St. Louis (USA)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Formamide	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Gene Ruler DNA Ladder Mix	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Tris-Borat-EDTA (TBE)	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Urea	Fa. Roth, Karlsruhe (D)

TAE-Puffer (50x)

242,3 g/l Tromethamin (TRIS) 17,51 Vol.% Essigsäure 18,61 g/l EDTA-2Na-2H2O (Titriplex III) in Wasser

Dualer Luciferase Assay

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

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

Enzyme

Die Enzyme wurden in den entsprechend mitgelieferten Puffern verwendet. Bei zeitgleicher Anwendung mehrerer Restriktionsenzyme, wurde der Puffer gemäß der Plattform "DoubleDigest" (Fa. ThermoScientific) ausgewählt.

Alkalische Phosphatase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Phusion High-Fidelity Polymerase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym ASCI	Fa. New England Biolabs, Ipswich (USA)
Restriktionsenzym BAMHI	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym EcoRI	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Restriktionsenzym FSEI	Fa. New England Biolabs, Ipswich (USA)
Reverse Trankriptase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
T4-DNA-Ligase	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Trypsin 10x	Fa. Lonza, Basel (CH)

Bakterienkultur

Ampicillin	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Calciumchlorid-Dihydrat	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Kaliumchlorid	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
LB-Medium / LB-Agar	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
Manganchlorid-Tetrahydrat	Fa. Roth, Karlsruhe (D)
PIPES	Fa. Sigma-Aldrich, St. Louis (D)

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

Sonstiges

Desoxynucleotidtriphosphate	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
Hoechst33342 200 µg/ml	Fa. ImmunoChemistry, Bloomington (USA)
KAPA Probe Fast Universal (qRT-PCR)	Fa. Peqlab, Erlangen (D)
Oligo(dT)- <i>primer</i>	Fa. Metabion, Martinsried (D)
RNAse-Inhibitor RiboLock	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
VECTASHIELD Eindeckmedium	Fa. Vector Laboratories, Burlingame (CA)

2.1.4. Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	
HEK293	Humane, embryonale Nierenzelllinie	Bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
1205Lu	Humane Melanomzelllinie, isoliert aus einer Lungenmetastase	Zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Besch (Ludwig-Maximilians-Universität München)
A549	Humane Adenokarzinomzelllinie (Lungenepithel)	Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, USA)
HeLa	Humane Zervixkarzinomzelllinie	Bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)
Hepa 1.6	Murine Lebertumorzelllinie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Ulrike Protzer (Technische Universität München) und Prof. Charles M. Rice (Rockefeller University New York City, USA)
Huh 7.5	Humane hepatozelluläre Karzinomzelllinie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Ulrike Protzer (Technische Universität München) und Prof. Charles M. Rice (Rockefeller University New York City, USA)
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomzelllinie	Zur Verfügung gestellt vom Institut für Immunologie (Ludwig-Maximilians-Universität München)
THP-1	Humane Monozyten AML FAB M5-Zellinie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Marion Subklewe (Ludwig-Maximilians-Universität-München)
BHK21	Embryonale Nierenfibroblastenzelllinie vom Hamster	Bezogen von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA)

2.1.5. Antikörper

Erkanntes Protein		Ursprung	
TRIM9	polyklonal	Hase	Fa. Abcam, Cambridge (UK)
			Artikelnummer: ab82675
TRIM9	monoklonal	Maus	Fa. Novus Biologicals, Littleton (USA)
			Artikelnummer (Klon): NBP2-03794 (2D6)

HA- <i>tag</i> RIG-I	polyklonal monoklonal	Hase Maus	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA) Enzo <i>Life Sciences</i> , Inc., Farmingdale (USA)
β-Aktin-HRP	monoklonal	Maus	Fa. Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA) Artikelnummer (Klon): SC-47778 (C4)
2°Maus Fc(IgG)-HRP	polyklonal	Ziege	Fa. Biorad, Hercules (USA) Artikelnummer: 1721011
2°Hase Fc(IgG)-HRP	polyklonal	Ziege	Fa. Biorad, Hercules (USA) Artikelnummer: 1706515 / 1721019
2°Maus Fc(IgG)-alexa fluor 680	polyklonal	Ziege	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)
2°Hase Fc(IgG)-alexa fluor 488	polyklonal	Ziege	Fa. Thermo Scientific, Waltham (USA)

2.1.6. Plasmide

Gen	Vektorrückgrat	Promotor	Resistenzgen
TRIM9-GFP (n-term. Tag)	pcDNA3X(+)MyEGFP	CMV	Amp.
TRIM9-HA (n-term. <i>Tag</i>)	pcDNA3X(+)HA	CMV	Amp.
mCherry	pcDNATM5/FRT/TO	CMV	Amp.
RIG-I-CARD-Domänen	efBos	CMV	Amp.
IRF3-5D	pcDNA 3.1	CMV	Amp.
Firefly-Luciferase	pGL3	ISRE-Promotor	Amp.
Renilla-Luciferase	pRL	SV-40	Amp.
	pcDNA3.1 (Leervektor)	CMV	Amp.

2.1.7. PCR-primer

Verwendungszweck	Primer $(5' \rightarrow 3')$
Klonierung Trim9	ATTAGGCCGGCCGATGGAGGAGATGGAAGAGGA (for)
(FSCI/ASCI)	TAATGGCGCGCCGGGCTATTGATGCTCTGCTGG (rev)
Klonierung Trim9	CGCGGATCCATGGAGGAGATG (for)
(BamHI/EcoRI)	GACGAATTCTTAGGCTATTGATGCTCTG (rev)
Klonierung Trim9-mCherry	CGCGGATCCATGGAGGAGATGGAAGAG (for)
(BamHI/XhoI)	CGTACTCGAGTTACTTGTACAGCTCGTCC (rev)

Alle primer stammen von der Firma Metabion, (Martinsried, D).

2.1.8. qRT-PCR: Primer und Sonden

Ziel-mRNA	UPL-Sonde	Primer $(5' \rightarrow 3')$
Inteferon-β	25	CGACACTGTTCGTGTTGTCA (I)
		GAGGCACAACAGGAGAGCAA (r)
RIG-I	69	TGGACCCTACCTACATCCTGA (I)
		GGCCCTTGTTGTTTTTCTCA (r)
TRIM9 (end.) ¹	67	CCTGAACAGGAACGTGCAG (I)
		CACGGCACATCCTTAGGC (r)
TRIM9 (exog.) ²	55	TGGATTTCGTGCAAGTGAAA (I)
		CCAGCTGTAGGATAGGGGTTG (r)
β -Aktin	64	CCAACCGCGAGAAGATGA (I)
		CCAGAGGCGTACAGGGATAG (r)
GAPDH	60	GCCACATCGCTCAGACAC (I)
		GCCCAATACGACCAAATCC (r)
HPRT	73	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC (I)
		CGAGCAAGACGTTCAGTCCT (r)

¹ Ein *primer* (r) ist komplementär zu einer Intron-Sequenz von TRIM9, sodass nur endogenes TRIM9 und nicht transfiziertes TRIM9 auf mRNA-Ebene detektiert wird.

² Beide *primer* sind komplementär zu Exon-Sequenzen von TRIM9, sodass auch transfiziertes TRIM9 auf mRNA-Ebene detektiert wird.

Die Hybridisierungssonden mit den entsprechenden Nummern wurden der "*Universal Probe Library*" der Firma Roche (Basel, CH) entnommen. Die *primer* stammen von der Firma Metabion (Martinsried, D).

2.1.9. siRNAs

Name	Ziel-mRNA Sequenz (5' \rightarrow 3')
Co4-RNA	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
si-TRIM9 (#58)	CUGGACAAGAUGAGCCUAU
si-TRIM9 (#95)	CUGGACAAGAUGAGCCUAUUU

Die Co4-RNA ist eine Kontroll-RNA ohne Target-Sequenz im humanen Genom. Alle siRNAs stammen von der Firma Metabion (Martinsried, D).

2.1.10. Stimulantien

Stimulanz	Beschreibung / Sequenz (5' \rightarrow 3')	
5'-pppRNA	GGCAUGCGACCUCUGUUUGA	Hergestellt durch in vitro
	UCAAACAGAGGUCGCAUGCC	Transkription
Hochmolekulares poly(I:C)	1,5 – 8,0 kb	Fa. InvivoGen, San Diego (USA)
Co4-RNA	GCGCUAUCCAGCUUACGUA	Fa. Metabion, Martinsried (D)

Co4-RNA ist eine Kontroll-RNA (dsRNA, ohne Modifikationen) ohne komplementäre Sequenz im humanen Genom.

2.1.11. Viren

Virus	Gattung	Polarität	Besonderheiten	
Vesicular- stomatitis- Virus	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	-	Zur Verfügung gestellt von Prof. Anne Krug, Ludwig-Maximilians- Universität München
Vesicular- stomatitis- Virus M51R	Rhabdoviridae	(-)ssRNA	M51R-Mutation	Zur Verfügung gestellt von Dr. Oliver Ebert, Technische Universität München
Sendai-Virus	Paramyxoviridae	(-)ssRNA	-	Chales River Laboratories, Wilmington (USA)
Semliki-forest- Virus	Togaviridae	(+)ssRNA	-	Zur Verfügung gestellt von Dr. Jovan Pavlovic, Universität Zürich

2.1.12. Software

Adobe Illustrator	Adobe Systems (San Jose, USA)
Adobe Photoshop	Adobe Systems (San Jose, USA)
EndNote Library	Thomson Reuters (New York City, USA)
GraphPad	GraphPad Software Inc. (California, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmont, USA)

2.2. Zellulär-immunologische Methoden¹

2.2.1. Zellkultur

Sämtliche Zelllinien wurden in Brutschränken (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, (CO2)-Gehalt 5%) in Zellkulturflaschen (75 cm²) in DMEM-Vollmedium (BHK21-Zellen in BHK-Medium) kultiviert. Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten an einer Werkbank unter sterilen Bedingungen. Die Morphologie und Vitalität der Zellen wurde bei jeder Passage lichtmikroskopisch überprüft. Auf Befall mit Mykoplasmen wurde regelmäßig getestet. Zur Aufbewahrung wurden Zellen in fetalem Kälberserum (FCS) mit 10% DMSO auf Dauer in Flüssigstickstoff oder zeitweise bei -80 °C eingefroren.

Die Zellen wurden je nach Art und entsprechender Wachstumsgeschwindigkeit bei einer Konfluenz von 80-100% zwei bis drei Mal pro Woche passagiert. Nach Entfernung des Mediums, wurde einmal mit sterilem PBS gespült um Überreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung je nach Zelltyp eine bis fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und aufgenommen. Die benötigte Zellzahl wurde in eine neue Zellkulturflasche gesetzt oder für Versuche in der geplanten Anzahl in 6- bis 96-*well*-Flachbodenplatten ausgesät, der Rest verworfen. Zur Zellzählung wurden Zellen mit Tryptanblau angefärbt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Beim Auszählen unter dem Mikroskop wurden nur farblose und somit lebende Zellen gewertet.

2.2.2. Transfektion und Stimulation

Die Transfektion und Stimulation von Zellen erfolgte nach Anwachsen der Zellen in 6- bis 96*well*-Flachbodenplatten. Je nach Größe der *wells* erfolgte dies in 200µl (96-*well*), 1 ml (24-*well*) oder 2 ml Medium (6-*well*), je nach Zelllinie und Teilungsrate in einer entsprechenden Zellzahl. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion, wobei Transfektionsreagenzien ein liposomenartiges Vesikel um die Nukleinsäuren bilden, das dann mit der Zellmembran der Zielzellen fusioniert um den Inhalt in das Zytoplasma freizusetzen. Entsprechend der Herstellerangaben wurde der Transfektionsansatz unter Beibehaltung des vorherigen Gesamtvolumens (durch vorherige Abnahme einer entsprechenden Menge), auf das vorbestehende Medium gegeben.

¹ Sämtliche Methoden, bis auf neu etablierte, wurden nach Standardprotokollen der Arbeitsgruppe durchgeführt, weshalb von analogen Beschreibungen in vorangegangenen Doktorarbeiten derselben Arbeitsgruppe auszugehen ist.

Transfektion von DNA (Plasmide)

Je nach Zelllinie Plasmid wurden und für die Transfektion verschiedene in verschiedenen Konzentrationen Transfektionsreagenzien entsprechend der Herstellerangaben, sowie nach individuellen Titrationsversuchen zur Optimierung der Transfektionsrate verwendet. Die Transfektion erfolgte nach 24 Stunden Kultivierung der Zellen in *well*-Platten Es kamen *GeneJuice* (2-3 µl/µg DNA) nach dem Protokoll von Roche, Lipofectamine 2000 (3 µl/µg DNA) nach dem Protokoll von Invitrogen, sowie TransIT-X2 (3 µl/µg DNA) nach dem Protokoll von Mirus zum Einsatz. Zunächst erfolgte die Lösung der Plasmid-DNA, sowie des Transfektionsreagenz gemäß Herstellerangaben getrennt in Opti-MEM, anschließend die Vermischung und gemeinsame Inkubation, schließlich die Zugabe zu den Zellen.

Transfektion von RNA

Sowohl zur Transfektion von *small-interfering*-RNA (siRNA) zum *knockdown* von Genen, als auch von immunstimulatorischer RNA (3pRNA, pl:C) wurde das Transfektionsreagenz *Lipofectamine RNAiMax* gemäß dem Protokoll der Firma Invitrogen genutzt. Der *Knock-down* mittels siRNA erfolgte das erste Mal direkt nach Aussäen der Zellen und ein zweites Mal nach 24 Stunden. Im Falle von 24-*well*-Platten, wurden 1x10⁵ 1205Lu-Zellen ausgesät, analog in anderen Größen. Pro 24-*well* kamen hier nach Titrationsversuchen 50nmol siRNA und 1µl *Lipofectamine RNAiMax* zum Einsatz. Diese wurden jeweils in der gleichen Menge Opti-MEM gelöst, dann vermischt, gemeinsam inkubiert und zum Medium der kultivierten Zellen hinzugefügt. Die Stimulation von Zellen erfolgte im 24-*well* analog mit 1500 ng 3pRNA und 500 µg pl:C sowie jeweils 1 µl *Lipofectamine RNAiMax*.

Die Transfektionseffizienz wurde jeweils im Rahmen der Auswertung mittels *western-blot* auf Proteinebene oder qRT-PCR auf mRNA-Ebene als erfolgreiche Überexpression oder *Knock-down* des entsprechenden Zielgens gemessen.

Virusinfektion

Zur Infektion mit Viren, wurde die gewünschte Virusmenge in Frischmedium gegeben und das Zellkulturmedium hierdurch ersetzt. Bei Infektion mit plaquebildenden Viren wurde die Virusmenge anhand der Zellzahl berechnet. Die *multiplicity of infection* (MoI) betrug bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen 1 und gibt das Verhältnis zwischen *plaque forming units* (PFUs) und Zellzahl an. Bei nicht plaquebildenden Viren (Sendai-Virus) erfolgt die Infektion nach Bestimmung der Konzentration im Medium mit 20-40 U/ml.

2.2.3. Knock-down mittels siRNA-Interferenz

Um Bedingungen zu simulieren, in denen ein Protein (in dieser Arbeit TRIM9) in der Wirtzelle nicht mehr, oder nur auf sehr niedrigem Niveau exprimiert wird, wurde ein *knock-down*-Modell mittels siRNA-Interferenz etabliert. Hierbei wird der in Säugetieren konservierte Mechanismus der RNA-Interferenz genutzt, bei dem die Endoribonuklease *Dicer* virale dsRNA zu Fragmenten spaltet, welche anschließend den RNA-*induced silencing complex* (RISC) aktivieren, der die Degradierung von komplementärer RNA katalysiert (Hammond, Bernstein et al. 2000, Bernstein, Caudy et al. 2001, Haasnoot, Westerhout et al. 2007). Synthetisch eingebrachte siRNA imitiert diese viralen RNA-Fragmente mit einer Länge von 21 bp und einem 3^c-Überhang von zwei Nukleotiden. Im physiologischen Setting ist dieser virale Erkennungsmechanismus bei Säugetieren nicht mehr aktiv, *Dicer* spielt stattdessen bei der Prozessierung von *micro*-RNAs eine Rolle (Bartel 2004, He and Hannon 2004).

Im experimentellen Setting binden siRNAs jedoch unverändert an RISC und vermitteln so den Abbau der, zum Leitstrang der siRNA komplementären, mRNA (Elbashir, Harborth et al. 2001, Elbashir, Martinez et al. 2001). Hierdurch findet eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene durch Verhinderung der Translation statt (Schlee, Hornung et al. 2006). Da die Produktion des Ziel-Proteins nicht vollständig inhibiert wird, spricht man von einem *knock-down*. In dieser Arbeit erfolgte das Einbringen von siRNAs in die Zielzellen durch Lipofektion mit *Lipofectamine RNAiMax* nach Protokoll des Herstellers (siehe Abschnitt 2.2.2.).



Abb 2.1. Prinzip der RNA-Interferenz.

2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und western-blot

Wie schon in der Arbeit von J. Rückel (Rückel 2018) ausgeführt, wurden in der SDS-Polyacrylamidgelektrophorese Proteine aus Zelllysaten mittels elektrischer Ladung in einem Polyacrylamidgel ihrer Größe nach aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Übertragung auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) mittels *western-blot* und darauf die Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper und Chemolumineszenz.

Die Zellen wurden erst in RIPA-Puffer lysiert um dann im *Bradford-assay* nach Herstellerangaben der Firma Biorad, die Proteinkonzentration in den Zelllysaten zu bestimmen und anzugleichen. Anschließend wurde Laemmli-Puffer und Mercaptoethanol (5 Vol.-%) hinzugefügt. Das enthaltene Natriumlaurylsulfat (SDS) führt zu einer negativen Ladung aller Proteinseitenketten, weshalb nun die Auftrennung der Proteine nach Größe unabhängig ihrer eigenen Ladung möglich ist. Dann wurden die Proben für zehn Minuten auf 95 °C erhitzt. Durch die Hitze, werden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgelöst und somit weitere Störeinflüsse vermieden. Die Proteinauftrennung erfolgte durch Auftragen der Proben in ein zehnprozentiges Polyacrylamidgel und die Anlage einer Spannung von 100-150 V in einer Kammer umgeben von *SDS-PAGE-running*-Puffer. Als Referenz für Proteingrößen, wurde der *PageRuler Prestained Protein Ladder* der Firma Invitrogen mit aufgetragen.

Der Proteintransfer auf die, durch Methanol aktivierte, PVDF-Membran erfolgte mittels *wetblot*. Das Gel und die Membran wurden in einem *wetblot*-System in *western-blot*-Transferpuffer für zwei Stunden mit einer konstanten Spannung von 110 V versetzt. Die Proteine bleiben hierbei aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der PVDF-Membran haften.

Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine mittels spezifischer Antikörper. Hierbei bindet der Primärantikörper an das Zielprotein. Anschließend bindet ein Sekundärantikörper an den konstanten Teil des Primärantikörpers. Am Sekundärantikörper hängt an das Enzym Meerettichperoxidase (HRP). Durch Umsatz des Enzymsubstrats von HRP (z.B. Luminol) kann das Protein schließlich mittels Chemolumineszens örtlich auf der Membran nachgewiesen werden. Hierfür wurden zunächst freie Bindungsstellen an der Membran durch Inkubation in TBST-Puffer mit 5 Vol.-% Milchpulver, für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C geblockt. Nach dreimal zehnminütigem Waschen mit TBST-Puffer, erfolgte die Inkubation im Primärantikörper für 12-24 Stunden bei 4 °C (TRIM9-Antikörper 1:500 verdünnt in TBST-Puffer inklusive 5 % BSA). Nach erneutem Waschen, erfolgte eine Stunde die Inkubation im Sekundärantikörper bei Raumtemperatur (Anti-Maus-IgG: 1:10.000 verdünnt in TBST-Puffer mit 5 % BSA). Schließlich erfolgt nach erneuten drei Waschgängen,

die Zugabe des Substrats aus dem *ECL-Plus chemiluminescence kit* der Firma Amersham BioScience und die Auswertung der Chemolumineszenz im *alpha imager HP-system*.

Zusätzlich zum nachzuweisenden Protein erfolgte anschließend als Ladungskontrolle immer die Detektion des Genprodukts eines *Housekeeping*-Gens (β-Aktin-Antikörper 1:10000 verdünnt in TBST-Puffer mit 5 % BSA).

2.2.5. Enzyme-linked Immunoabsorbant Assay (ELISA)

Mittels Enzyme-linked immunoabsorbant assays (ELISA) wird die Konzentration von (sekretorischen) Proteinen bestimmt. In dieser Arbeit wurde in Überständen die Konzentration des Zytokins IP-10 je 24 oder 48 Stunden nach Stimulation oder Virusinfektion bestimmt. Auch hier erfolgt der Proteinnachweis über spezifische Antikörper. Die praktische Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben der verwendeten ELISA-*kits* von BD Bioscience, wobei pro well nur 50% der angegebenen Volumina zum Einsatz kamen, was sich in unserem Labor als Standard etabliert hatte, nachdem sich diese Reagenzienmengen in vorherigen Vergleichsversuchen, als ausreichend gezeigt hatten.

Zunächst wurde eine Polystyren-96-well-Platte über Nacht mit dem Coating-Antikörper inkubiert. Nach Waschen und Puffern, wurden die zu messenden Zellüberstände, als Verdünnungsreihen hinzugegeben. Als Vergleichsgröße wurde rekombinantes Protein in bekannter Konzentration nach Standard in assay-diluent als Verdünnungsreihe aufgetragen. Nach Inkubation zur Bindung der Proteine an den Coating-Antikörper, wurde nach erneutem Waschen ein Detektionsantikörper hinzugegeben, welcher an ein anderes Epitop des Proteins bindet. Dieser ist entweder direkt oder per Streptavidin-Biotin-Bindung an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt. Nach erneuter Inkubation und Waschschritten, erfolgte die Substratzugabe, wobei nach Inkubation im Dunkeln, ein HRP-vermittelter Farbumschlag zu detektieren ist. Dieser Farbumschlag wird durch Hinzufügen von Schwefelsäure gestoppt um dann die konzentrationsabhängige Farbintensität der verschiedenen Verdünnungsreihen photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm zu bestimmen. Vergleich mit der Standardverdünnungsreihe Im bekannter Proteinkonzentrationen, kann eine Umrechnung mit Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgen.

2.2.6. Bestimmung von Virustitern mittels TCID50

Virustiter wurden in dieser Arbeit mittels *tissue culture infective dose 50%* (TCID50)-Endpunktverdünnung-*assays* bestimmt. Hierfür wurden virussensitive BHK21-Zellen in zwölfstufigen Verdünnungsreihen mit den virushaltigen Überständen inkubiert. Zunächst wurden 10.000 BHK21-Zellen pro 96-*well* in BHK21-Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium jeweils in acht Replikaten durch verschiedene Verdünnungen virushaltigen Zellüberstands, ebenfalls in BHK21-Medium, ersetzt. Nach zwei bis fünf Tagen erfolgte lichtmikroskopisch die Bestimmung der letzten Verdünnung, welche noch zytopathische Effekte hervorrief. Hieraus kann mittels des *Spearman*-und-*Kärber*-Algorithmus die ursprüngliche Viruskonzentration berechnet werden (Hierholzer and Killington 1996). Verwendet wurde hierfür ein bei der Universität Heidelberg verfügbares Excel-*sheet* (https://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Downloads.126386.0.html).

2.2.7. Luciferase-assay

Mittels dualer Luciferase-assays kann die Aktivierung von Promotoren durch Chemolumineszenz zeitlich kumulativ gemessen werden. In dieser Arbeit kamen hierfür zwei Reporterplasmide zum Einsatz, die einerseits für eine *Firefly*-Luciferase unter Kontrolle eines durch Transkriptionsfaktoren aktivierbaren Promotors kodieren (hier ISRE-Reporterplasmid), andererseits für eine *Renilla*-Luciferase unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven *CMV*-Promotors, der innerhalb des *assays* als Kontrolle zum Ausgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen dient. In dem eingesetzten ISRE-Reporterplasmid ist der *Firefly*-Luciferase ein Promotor ähnlich dem endogener ISGs vorgeschaltet, welcher durch die Transkriptionsfaktoren pSTAT1/pSTAT2 und ISFG3 reguliert wird.

Luciferase-assays erfolgten in HEK293-Zellen, wobei hier 25.000 Zellen pro 96-well ausgesät wurden. Nach 24 Stunden erfolgte in Triplikaten die Transfektion der Plasmide mittels GeneJuice nach Protokoll des Herstellers. Bei einer Gesamtmenge von 120 ng Plasmid-DNA kamen 0,2 ml GeneJuice pro well zum Einsatz. Zu je 40 ng der beiden Reporterplasmide, wurden insgesamt 40 ng Plasmid-DNA kotransfiziert. Hierzu zählten einerseits 20ng eines bekannten Aktivators des IRSE-Promotors (hier RIG-I und IRF3-5D), sowie TRIM9 in verschiedenen Konzentrationen (0-20 ng). Als Negativkontrolle, sowie zum Auffüllen auf gleiche DNA-Menge, kam ein Leervektor zum Einsatz. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und die Zellen durch Inkubation bei Raumtemperatur in Passive Lysis Buffer für 15 Minuten lysiert. Anschließend wurden in zwei getrennten Ansätzen zu 20 µl Zelllysat je 20 µl der luciferasespezifischen Substrate hinzugefügt. Als Substrat der Firelfly-Luciferase kam hier Luciferin zum Einsatz, als Substrat der Renilla-Luciferase Coelenterazin 1:800 in Wasser verdünnt. Hierdurch wurde die Lumineszenzreaktion gestartet, wobei die Substrate von ihren Enzymen unter Verbrauch von ATP und Sauerstoff, sowie der Emission von Lichtsignalen umgesetzt werden. Die Intensität dieser Lichtemission wurde anschließend im Mithras LB949 Microplate Reader detektiert und erlaubt Rückschlüsse auf die hierzu proportionale, synthetisierte Menge des Reporters, welche durch die entsprechenden Promotorkonstrukte induziert wurde. Es erfolgte anschließend die Normalisierung des transkriptionsfaktorabhängigen Firefly-Luciferase-Signals auf die Intensität des Lichtsignals der konstitutiv exprimierten Renilla-Luciferase, um den Assay von Störeinflüssen wie
verschiedene Transfektionseffizienzen zu bereinigen. Das Ergebnis wurde in *relative light units* (RLU) angegeben.

2.2.8. Konfokale Mikroskopie

Um die intrazelluläre Proteinlokalisation dazustellen, wurden analog zur Arbeit von J. Rückel (Rückel 2018) fluoreszenzmarkierte Fusionsproteine (in dieser Arbeit Fusion mit GFP), oder über Immunfluoreszenz (siehe 2.2.1.8) mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper detektierte Proteine, in der konfokalen Mikroskopie sichtbar gemacht. Bei einem Konfokalmikroskop handelt es sich um ein besonderes Lichtmikroskop, das zwar zu jedem Zeitpunkt nur einen kleinen Teil des gesamten Präparats beleuchtet, jedoch anschließend eine digitale Rekonstruktion des Bildes erlaubt. Eine zusätzliche Lochblende in der Zwischenbildebene ist konfokal zum Beleuchtungspunkt, wodurch bei gleichem Brennpunkt von Lochblende und Beleuchtungspunkt, Schnittbilder mit hohem Kontrast entstehen. Außerdem können Fluoreszenz-markierte Präparate mit vier verschiedenen Lasern angeregt werden. Das emittierte Licht kann dann in unterschiedlichen Wellenlängen detektiert werden. Zunächst wird hierbei eine zweidimensionale Ebene im Probenmaterial definiert, welche anschließend durch einen Laserstrahl in definierter Wellenlänge abgerastert wird, der die Fluorochrome im Probenmaterial zur Fluoreszenzemmission anregt.

Um möglichst viele Zellen in einer exakten Ebene anwachsen zu lassen, wurden die Zellen in dieser Arbeit auf sterilen Deckgläsern im 24-well-Format ausplattiert. Hier kamen aufgrund ihrer guten Adhärenz und des großvolumigen Intrazellulärraums ca. 50.000 HeLa-Zellen pro well zum Einsatz. Am Folgetag erfolgte die Transfektion mit dem für TRIM9-GFP kodierenden Expressionsplasmid. Nach 6-24 Stunden wurde das Medium mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) abgewaschen. Dann wurden, die auf dem Deckglas adhärenten Zellen, mit vierprozentiger Formaldehydlösung (auf PBS-Basis) zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Durch Inkubation in Hoechst33342 (Verdünnung 1:10.000 in PBS), einem DNA-Interkalator, für zehn Minuten bei Raumtemperatur, wurden die Zellkerne gefärbt. Nach erneuten drei Waschgängen mit PBS, wurde das Deckglas mit den anhaftenden Zellen durch Einbringen von Eindeckmedium Vectashield auf einem Objektträger fixiert. Anschließend erfolgte die konfokale Mikroskopie am Mikroskop "Leica TCS SP5". Die durch den Laserstrahl angeregten Fluorochrome, setzten hierbei Fluoreszenzemission frei, welche dann detektiert und örtlich zugeordnet werden kann, was die Rekonstruktion eines Bildes der abgerasterten Ebene ermöglicht. Durch die spezifische Wellenlänge (GFP 450 nm, Hoechst 350 nm, Alexafluor-488 450 nm, Alexafluor-680 680 nm), die zur Anregung von Fluorochromen mit unterschiedlichen Emissionsspektren nötig ist, können in einer Probe mehrere detektiert und in unterschiedlichen Farben visualisiert werden.

2.2.9. Immunfluoreszenz

Um Proteine ohne direkte Fluoreszenzmarkierung darzustellen (zum Beispiel endogenes TRIM9 oder überexprimiertes TRIM9 mit HA-tag) können diese mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper ebenfalls in der konfokalen Mikroskopie sichtbar gemacht werden. Analog zum oben beschriebenen Procedere wurden auch hierfür HeLa-Zellen auf Deckgläser im 24-well-Format ausgesät. Am Folgetag wurde erneut, falls geplant, die Transfektion mit entsprechenden Plasmiden durchgeführt. Dann erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten die Fixierung in vierprozentiger Formaldehydlösung. Vorteil der Fixierung mit Paraformaldehyd ist die hierbei erhalten bleibende Zellmorphologie mit Ausbildung eines cross-links zwischen Proteinen. Um ein Eindringen von Antikörpern ins Zytoplasma zur Detektion von intrazellulären Proteinen zu ermöglichen, folgte nun die Permeabilisierung durch Inkubation in 0,1% Triton-x-100 verdünnt in PBS für zehn Minuten. Nach erneuten Waschgängen mit PBS und Blocken mit dreiprozentigem BSA in PBS für ein bis zwei Stunden, wurde nach erneutem Waschen der Primärantikörper (hier zum Beispiel anti-TRIM9) hinzugegeben. Nach Inkubation mit dem Nacht, folgten weitere Waschschritte vor Primärantikörper über Zugabe des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers und Inkubation für eine Stunde. Auch hier erfolgte eine Anfärbung des Zellkerns mit Hoechst33342 (Verdünnung 1:10.000 in PBS) und dann die Visualisierung der Fluoreszenzemission nach Anregung, wie oben beschrieben, durch konfokale Mikroskopie.

2.2.10. Live-cell-imaging

Beim *live-cell-imaging* zur in-vivo Verfolgung der intrazellulären Lokalisation von TRIM9-GFP kamen HeLa-Zellen zum Einsatz. Diese wurden in speziell hierfür geeigneten Flachboden*wells* mit Glasboden ausplattiert, welche eine direkte konfokale Mikroskopie der *Platte*, ohne Fixierung zulassen. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit dem Expressionsplasmid für TRIM9-GFP. Nach weiteren 12 Stunden wurde mit dem *live-cell-imaging* begonnen. Hierbei wurden die Zellen in ihrer Kulturplatte in einer *live-cell-imaging*-Box inkubiert, in der Bedingungen analog zu einem Brutschrank herrschten (37°C, 95% Luftfeuchtigkeit, CO2-Gehalt von 5%). Dann wurden durch konfokale Mikroskopie erfolgreich transfizierte Zellen mit sichtbarem TRIM9-GFP lokalisiert und 10 Felder definiert, die über die nächsten 6 Stunden in festgelegten Zeitintervallen (alle 20 Minuten) wiederholt automatisch mit konfokaler Mikroskopie abgerastert und somit "gefilmt" wurden.

2.2.11. Entnahme und Lyse von Mausorganen

In diesem Projekt wurden bereits bestehende Organlysate einer einzelnen Maus verwendet, die als Kontrolle Teil eines projektfremden Experimentes war. Dort wurde jedoch jeweils nur ein Teil der Organlysate benötigt, sodass aus dem Rest der jeweiligen Organlysate die hier erfolgte Bestimmung von TRIM9 erfolgen konnte.

Die Erstellung der Organlysate durch die Kollegen erfolgte wie hier beschrieben. Weibliche C57Bl/6 stammten von Charles River (Deutschland). Die Mäuse wurden im Alter von 8 Wochen geliefert und wurden nach 7 Tagen Anpassungszeit als versuchsbereit gewertet. Die Mäuse wurden unter Isofluran-Anästhesie durch Bruch des Genicks getötet.

Organe wurden direkt nach Tötung entnommen und in flüssigen Stickstoff getaucht. Im Anschluss wurden die Organe mit Mörser und Pistill so lange verarbeitet, bis sie zu einer homogenen pulverartigen Masse wurden. Diese wurde dann in einem Eppendorf-Gefäß mittels Lysepuffer des Bio-Plex Lysis Kit der Firma Biorad gelöst. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten, anschließend wurde die Masse auf dem Vortexer gemischt und dann 15 Minuten bei maximaler Zentrifugalkraft zentrifugiert. Der Proteingehalt wurde anschließend mit dem *Bradford-assay* bestimmt.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Polymerase-Kettenreaktion

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) kann ein doppelsträngiges DNA-Fragment amplifiziert werden. Um dieses Fragment zu definieren, kommen spezifische Primer zum Einsatz, einer *upstream* und einer *downstream* der gewünschten Nukleotidsequenz. Ein Primer ist 15-30 Basen lang, der Guanosin- und Cytosin-Gehalt sollte 40-60% betragen. Mit einer normalen PCR können DNA-Fragmente von maximal 10.000 Basen amplifiziert werden. Eine PCR erfolgt in mehreren Zyklen, wobei in jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA-Menge stattfindet. Hier kam die *Phusion-High-Fidelity*-DNA-Polymerase von Fermentas zum Einsatz um Mutationen zu vermeiden. Diese Polymerase hat zusätzliche eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität und somit eine geringere Fehleranfälligkeit als andere Polymerasen.

Ansatz für PCR 100ng DNA template 1µl dNTPs 10 mM 2x1µl Primer 5µl 10x PfuUltra II Reaction Buffer 0,5-1U Phusion-High-Fidelity-DNA-Polymerase ddH₂O ad 50µl

Dieser Reaktionsansatz durchläuft, nach folgendem Temperaturprotokoll 35 Wiederholungen der Schritte 2-4:

1) DNA-Denaturierung 600 Sekunden bei 94 °C - 98 °C

- 2) DNA-Denaturierung 30 Sekunden bei 94 °C 98 °C
- 3) Hybridisierung der primer 10-30 Sekunden bei primer-spezifischer Temperatur
- 4) Polymerisation template-spezifisch bei 72 °C
- 5) Polymerisation unvollständiger Stränge 600 Sekunden bei 72 °C
- 6) Probenkühlung bei 4 °C

Die Hybridisierungstemperatur in der *Annealing*-Phase ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer. Die polymerasespezifische Synthesegeschwindigkeit, sowie die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments bestimmen die Dauer der Elongationsphase (Polymerisation).

2.3.2. Ethidiumbromid-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente nach PCR-Amplifikation oder Restriktionsenzymverdau wurden längenabhängig mittels Gelelektrophorese voneinander getrennt. Hierfür wurde ein 1-2% Agarose-Gel aus 1-2g Agarose und 100-200ml TAE-Puffer hergestellt. Nach Aufkochen und Abkühlen, wurden 10-20µg Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in seine Kammer gegossen. Beim Abkühlen bildet sich im Gel ein Polymer aus, welches das Auftrennen von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe ermöglicht. Die DNA wurde mit DNA loading dye versetzt und in die vorgesehenen Gelkammern gefüllt. Da DNA negativ geladen ist, wandert sie bei Applikation eines elektrischen Feldes vom negativem zum positiven Pol. Zur Auftrennung verschieden großer DNA-Fragmente erfolgte die Applikation von 100 V für 30-60 min. Zur Bestimmung der Größe, wurde eine Kammer mit einem Referenzmarker (DNA ladder) beladen. Zur Darstellung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde das Gel anschließend auf einem UV-Tisch fotografiert. Zur Klonierung wurden die entsprechenden Banden mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA-Extraktion erfolgte hieraus mittels pegGOLD Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben.

2.3.3. Restriktionsenzymverdau

Zur Analyse von Klonierungsprodukten, oder Klonierung von DNA-Sequenzen in neue Vektoren, erfolgte der Verdau durch Restriktionsenzyme, welche an spezifischen Gensequenzen DNA schneiden. Hierbei entstehen je nach Enzym unterschiedliche Endstücke, die anschließend an hierzu komplementäre Endstücke ligiert werden können. Hierzu wurden 0,2-2 µg der zu analysierenden Plasmid-DNA in einem passenden Puffer mit je 1 µl eines oder mehrerer Restriktionsenzyme versetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 37°C für eine Stunde. Nach Verdau, wurden die Proben via Gel-Elektrophorese aufgetrennt und mittels *Gel Extraction Kit* extrahiert oder direkt mittels *JETQuick Purification Kit* aufgereinigt. Die extrahierte DNA-Menge wurde photometrisch bestimmt.

2.3.4. Bakterientransformation

Zur Amplifizierung von Plasmiden wurde eine Hitzeschocktransformation verwendet. Dazu wurde zu chemisch kompetente *E. coli*-Bakterien des *DH5a*-Stammes, die bei -80°C gelagert wurden, die gewünschten Menge des entsprechenden Plasmids hinzugegeben. Anschließend wurden diese zehn Minuten auf Eis angetaut. Die Aufnahme des Plasmids in die Bakterien wurde mit einem Hitzeschock von 42°C über 45 Sekunden erreicht, die Bakterien wurden anschließend sofort wieder auf Eis zwischengelagert. Nach Hinzufügen von 150µl LB-Medium ohne Antibiotika wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 100µl dieser Kultur auf eine antibiotikahaltige LB-Agar-Platte

aufgetragen, die der Antibiotikaresistenz auf dem zu amplifizierenden Plasmid entspricht, und über Nacht bei 37°C bebrütet. Nach 12-16 Stunden, konnten entstandene Bakterienkolonien zur Weiterarbeit verwendet werden. Dafür wurden einzelne Kolonien mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte gepickt und abermals über Nacht in 3ml LB-Medium mit Antibiotikum bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

2.3.5. Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien (Miniprep und Maxiprep)

Die Extraktion der amplifizierten Plasmid-DNA aus Bakterien wurde mit dem "GeneJet Plasmid Miniprep Kit" nach dem Protokoll des Herstellers Thermo Fisher durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde, die über Nacht inkubierte Bakteriensuspension eine Minute bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Nach Resuspension erfolgte die Lyse der Bakterien, anschließend die Zugabe des Neutralisationspuffers und dann abermals die Zentrifugation. Der nun DNA-haltige Überstand wurde auf DNA-bindende Säulen übertragen, zentrifugiert und zweimal gewaschen. Zu guter letzte wurde die DNA in 50 µl Elutionspuffer gelöst. Die dabei erzielte Plasmid-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. Zur Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das "Plasmid Maxi Kit" nach Protokoll des Herstellers Qiagen verwendet.

2.3.6. DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung wurde die aufgereinigte DNA in entsprechenden Teströhrchen nach Protokoll des Anbieters Biontech, je einmal mit 2 µl des entsprechenden Primers des 3'- bzw. 5'-Endes der zu betrachtenden Sequenz in einer Konzentration von 10 µM versetzt. Je nach Art und Länge des zu sequenzierenden Produkts unterschied sich die Menge der beizufügenden DNA. Zur Komplettierung des erforderlichen Gesamtvolumens wurde destilliertes Wasser eingesetzt. Die Probe wurden anschließend an den Anbieter gesendet und das Ergebnis online abgefragt.

2.3.7. RNA-Aufreinigung

Zur Quantifizierung der durch Stimulation, Transfektion oder *knock-down* erreichten Effekte in immunologischen Signalwegen wurde in dieser Arbeit neben Auswertungen auf Proteinebene (*western-blot*, ELISA), die Analyse auf mRNA-Ebene gewählt. Dafür erfolgte zunächst die Isolation der Gesamt-RNA aus den Zellen, anschließend der Umschrieb mit mRNA spezifischen Primern in cDNA und letztendlich die Analyse mittels *quantitativer Reverse Transkriptase-PCR* (qRT-PCR).

Die Aufreinigung von RNA aus Zellen wurde nach dem entsprechenden Protokoll mit dem *peqGOLD Total RNA Kit* von PEQLAB durchgeführt. Zunächst wurden hierfür die Zellen lysiert und das Lysat über DNA- und proteinbindende Säulen laufen gelassen. Das hierbei gewonnene RNA-haltige Filtrat wurde mit 70% Ethanol und RNAse-freiem Wasser gemischt. Dieses Gemisch wurde anschließend auf RNA-bindende Säulen gegeben und anschließend dreimal mit den entsprechenden Puffern gewaschen und zentrifugiert. Zuletzt wurde die RNA in je 50µl RNAse-freiem Wasser eluiert und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C aufbewahrt.

2.3.8. cDNA-Umschrieb (Reverse Transkription)

Der Umschrieb der relevanten mRNA in komplementäre cDNA erfolgte mittels reverser Transkription mit zum Poly-A-Schwanz der mRNA kompatiblen Oligo-dT-Primern.

Ansatz für cDNA-Umschrieb 1µg RNA 4µl 5x Reverse-Transkriptase-Puffer 2µl dNTP Mix 10 mM 2µl Oligo-dT18 0,5µ RiboLock RNAse-Inhibitor 0,2µl RevertAid H Minus Reverse Transkriptase 10000U ddH₂O ad 20µl

Die Transkription erfolgte im T3-Thermocycler für 60 Minuten bei 42°C, gefolgt von zehn Minuten bei 72°C zu Enzyminaktivierung und anschließender Kühlung auf 4°C.

2.3.9. Quantitative Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) beruht auf der normalen PCR mit je zwei Primern für das zu amplifizierende Gen und einer Polymerase. Die Quantifizierung der vorhandenen cDNA gelingt dabei durch die Zugabe von Hybridisierungssonden. Diese Sonden bestehen aus *locked nucleid acids* (LNAs) Oligonukleotiden mit einer Länge von 8-9 Nukleotiden, die eine 2'O-4'C-verbindende Methylenbrücke an jedem Ribosemolekül besitzen. Am 5'-Ende sind die mit einem Fluoreszenzdonor (Fluoreszein) und am 3'-Ende mit einem Fluoreszenzakzeptor (*quencher*) gekoppelt. Die Zuckermodifikation erhöht einerseits die Hybridisierungstemperatur zum cDNA-*template*, sodass diese annäherungsweise der der deutlich längeren Primer entspricht, andererseits erhöht sie auch die Bindungsspezifität. Analog zu den Primern lagert sich die Hybridisierungssonde also in der *Annealing*-Phase der PCR an einen cDNA-Sequenzabschnitt zwischen den Primern an. Während der darauffolgenden Elongationsphase wird die Amplifikation der cDNA zwischen den beiden Primern durch die DNA-Polymerase katalysiert, welche die dazwischenliegende Sonde mittels 5'-3'-Exonukleaseaktivität abbaut, wodurch das Fluoreszin und der *quencher* voneinander getrennt werden. Durch den Verlust des

Fluoreszenzakzeptors, nimmt die Fluoreszenzemission also nach jeder Elongationsphase zu. Die Intensität des Fluoreszenzsignals ist somit proportional zur Konzentration der cDNA am Anfang des jeweiligen Amplifikationszyklus. Primer und Sonde wurden gemäß der *Universal Probe Library* der Firma Roche mit Hilfe der *Probe Finder Assay Design Software* ausgewählt.

Die qRT-PCR erfolgte jeweils in Triplikaten in folgendem 10µl-Ansatz:

<u>qPCR-Ansatz:</u> 50ng cDNA 5µl KAPA PROBE Fast Universal MasterMix 2x0,2µl Primer 0,1µl Sonde ddH₂O ad 10µl

Es erfolgten 45 Zyklen der Schritte 2-3, nach folgendem Temperaturprotokoll:

1) 600 Sekunden bei 95 °C
2) 10 Sekunden bei 95 °C
3) 30 Sekunden bei 60 °C
4) 30 Sekunden bei 40 °C

Die Detektion der Fluoreszenz und die Quantifikationsanalyse erfolgte in weißen 96-*well*-Platten im *Lightcycler 480 II* der Firma Roche. Die Quantifikation erfolgte auf Basis des *threshold cycle* (CT-Wert), welcher dem Amplifikationszyklus entspricht, der den Beginn der exponentiellen Reaktionsphase darstellt, in dem die Fluoreszenzintensität also erstmals signifikant über dem Hintergrundrauschen messbar ist. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, erfolgte die Darstellung als relative Quantifizierung, wobei als Referenzgröße verschiedene *Housekeeping*-Gene (β -Aktin, HPRT, GAPDH), zeitgleich aus derselben Probe gemessen, dienten.

2.4. Statistik

Bei Experimenten, die in Replikaten durchgeführt, aber nicht vollständig unabhängig wiederholt wurden, ist lediglich der Mittelwert angegeben. Bei vollständiger Wiederholung der Experimente, sind diese durch Angabe der Wiederholungen gekennzeichnet. Hier erfolgt die Fehlerangabe durch Darstellung des Mittelwertes +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Eine Signifikanzanalyse erfolgte bei mindestens drei Wiederholungen durch einen zweiseitigen, wenn möglich, gepaarten Student t-Test unter Verwendung der üblichen Signifikanzniveaus p<0,05 (*), p<0,01 (**) und p<0,001 (***). Alle Auswertungen erfolgten mit der Software *GraphPad Prism*.

3. Ergebnisse

3.1. Einfluss eines verminderten TRIM9-Expressionsniveaus auf die RLHabhängige Immunantwort

3.1.1. Etablierung eines transienten knock-downs mittels siRNA-Interferenz

Zur Untersuchung des möglichen Einflusses von TRIM9 auf die RLH-induzierte Immunantwort, sollte die RLH-induzierten Immunantwort in Bedingungen mit unterschiedlichen Expressionsniveaus von TRIM9 verglichen werden. In dieser Arbeit erfolgte jeweils eine transiente Änderung des Expressionsniveaus mittels *knock-down* oder Überexpression. In weiteren Schritten wurden stabile *knock-out*- und Überexpressions-Modelle generiert¹.

Zunächst erfolgte die Etablierung eines transienten *knock-downs* durch siRNA-vermittelte RNA-Interferenz (siehe Abschnitt 2.2.3.). In dieser Arbeit erfolgte das Einbringen von siRNAs in die Zielzellen durch Lipofektion mit *Lipofectamine RNAiMax* nach Protokoll des Herstellers (siehe Abschnitt 2.2.2.). Die beste *knock-down*-Effizienz auf 21% der Kontrollprobe, konnte nach Titrationsversuchen in verschiedenen Zelllinien (A549, HEK923, 1205Lu) in 1205Lu-Zellen mit 50 nM siRNA bei zweimaliger Transfektion mit 24 Stunden Abstand erzielt werden (siehe Abbildung 3.1.2.). Die Zelllinie 1205Lu ist aus einer Lungenmetastase eines Melanompatienten generiert und zur Untersuchung der Interferonabhängigen Immunantwort gut etabliert und beschrieben. (Sie reagiert einerseits sensitiv auf Stimulation des Interferon-Signalwegs und produziert hierbei eine gut messbare Menge an Interferon, ist andererseits jedoch sehr robust und erhält dabei die zelluläre Integrität ohne ein frühzeitiges Versterben wie es beispielsweise bei HEK293-Zellen der Fall ist.) Deshalb wurden für die meisten der folgenden Experimente 1205Lu-Zellen verwendet.

Im Vergleich der Referenzgene β -Aktin und GAPDH zeigte sich kein Unterschied in der *knockdown*-Efiizienz. Es wurde in allen folgenden Versuchen β -Aktin (in allen Abbildungen nur als Aktin bezeichnet) als Referenzgen gewählt.

Für die Detektion im *western-blot* stand zu Beginn dieser Arbeit nur der Anti-TRIM9-Antikörper der Firma Abcam zur Verfügung, der deshalb hier zum Einsatz kommt. Die damit detektierte Bande bei etwa 65 kDa (knapp unterhalb der 70 kDa Bande des eingesetzten Markers) entspricht zwar den Angaben des Herstellers, nicht jedoch der in der Literatur für TRIM9 angegebenen Proteingröße von 79 kDa. Bei erfolgreicher Detektion des *knock-downs* und kongruenten qRT-PCR-Ergebnissen, wurde hier von einer adäquaten Spezifität gegen TRIM9 ausgegangen.



Abb. 3.1.1. Zelllinie 1205Lu: Titration siRNA-Menge zur der transienten Etablierung eines knock-down-Systems. Die Etablierung des knock-downs erfolgte nach Ausplattierung von 100.000 1205Lu-Zellen in einem 24-well-Format durch Transfektion der TRIM9-spezifischen siRNA (#58) mit Lipofectamine RNAiMAx nach Herstellerangaben einmal direkt nach Ausplattieren der Zellen, sowie einmal nach 24 Stunden jeweils in

den angegebenen Konzentrationen. Als Kontrolle, sowie zum Auffüllen auf die gleiche RNA-Menge in allen Bedingungen, erfolgte die methodisch gleiche Transfektion einer Kontroll-siRNA ohne Zielsequenz im humanen Genom (siCo4). Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen, sowie die Aufreinigung der RNA, der Umschrieb in cDNA und die Quantifizierung der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zu β -Aktin als *housekeeping*-Gen. Die qRT-PCR wurde stets in Duplikaten durchgeführt, hier ist der Mittelwert angegeben, n=1.



Abb. 3.1.2. Vergleich Referenzgene ßder Aktin und GAPDH in der qRT-PCR zur Kontrolle der knock-down-Effizienz. Methodisch analog zum Vorversuch erfolgte der knock-down TRIM9 von nach etabliertem Protokoll mit 50nM TRIM9spezifischer siRNA (#58) und der Kontroll-siRNA (siCo4). Anschließend erfolgte nach 24 Stunden

die Zelllyse und Aufteilung der Proben zur Durchführung einer qRT-PCR zur Quantifizierung der TRIM9-Expression auf mRNA-Ebene, sowie eines *western-blots* zur Quantifizierung auf Protein-Ebene. In der qRT-PCR zeigte sich im Vergleich zu den Referenzgenen β -Aktin (in allen Abbildungen nur als Aktin bezeichnet) und GAPDH ein vergleichbarer *knock-down* auf 26% und 27% des Expressionsniveaus in der Kontrollbedingung. Die qRT-PCR wurde stets in Duplikaten durchgeführt, hier ist der Mittelwert angegeben, n=1.

Zur Evaluation möglicher off-target-Effekte erfolgte der *knock-down* in den folgenden Experimenten mit zwei, gegen verschiedene Sequenzstücke von TRIM9 gerichteten siRNAs (#58, #95). Als Negativkontrolle erfolgte mit gleicher Methodik die Transfektion der KontrollsiRNA (siCo4). Die Überprüfung der *knock-down*-Effizienz erfolgte 24 Stunden nach der letzten Transfektion mittels qRT-PCR und *western-blot*. Es konnte mit beiden siRNAs sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene eine vergleichbare *knock-down*-Effizienz von etwa

70% erzielt werden (siehe Abbildung 3.1.4). Lichtmikroskopisch zeigten sich die Zellen mit und ohne *knock-down* intakt und ohne deutlich erkennbare strukturelle Unterschiede zu 1205Lu-Zellen ohne jegliche Intervention.



Abb. 3.1.3. Vergleichbare knock-down-Effizienz mit zwei verschiedenen siRNAs auf mRNA- und Protein-Ebene. Methodisch idem zum Vorversuch erfolgte hier die Transfektion von je 50 nM zwei verschiedener siRNAs (#58 und #95), sowie gleicher Konzentration der Kontroll-siRNA (siCo4) in 1205Lu-Zellen. Die Evaluation der knock-down-Effizienz erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Der Versuch erfolgte in Duplikaten, sodass ein well nach Lyse der Zellen erneut einer Quantifizierung per gRT-PCR relativ zu β-Aktin als *housekeeping*-Gen zugeführt werden konnte. Die gRT-PCR erfolgte in Duplikaten, hier ist der Mittelwert angegeben, n=1. Das andere well wurde jeweils nach Lyse und Messung der Gesamt-

Proteinkonzentration mittels *Bradford-assay* mit Laemmli-Puffer versetzt und zur Quantifizierung mittels *western-blot* verwendet. Die Detektion von TRIM9 erfolgte mit dem polyklonalen Anti-TRIM9-Antikörper der Firma Abcam, sowie dem HRP-gekoppelten Anti-Hase-Sekundärantikörper der Firma Biorad und kommt hier im Vergleich zum Marker als Bande auf Höhe von 65 kDa zur Darstellung. Als Ladungskontrolle kam hier ebenfalls β-Aktin zum Einsatz.

3.1.2. Ein transienter *knock-down* von TRIM9 führt zu einer verringerten Expression von RIG-I, INF- β und IP-10 nach Stimulation der RLHs mit synthetischen Liganden

Um den Effekt einer verringerten Expression von TRIM9 auf die RLR-abhängige Immunantwort zu untersuchen, erfolgte 24 Stunden nach oben beschriebenem knock-down die Stimulation des RLH-Signalwegs. Zur Stimulation kamen gut charakterisierte Liganden der RLHs zum Einsatz. Einerseits erfolgte zur Aktivierung von RIG-I, die Transfektion des synthetischen RIG-I-spezifischen Liganden 5'-pppRNA durch Lipofektion. Andererseits erfolgte die Stimulation durch pl:C, einem beschriebenen synthetischen Liganden von MDA5. Intrazellulär aktiviert pI:C vor allem MDA5, extrazellulär und in höheren Konzentrationen kommt es auch zur Aktivierung von TLR3. Um eine möglichst spezifische Aktivierung von MDA5 zu erreichen, erfolgte auch hier die Übertragung mittels Lipofektion, damit pI:C vor allem intrazellulär wirken konnte. Weder Ligand noch Mechanismus von LGP2 waren bis dato bekannt, weshalb auch keine Stimulation dieser RLH erfolgte. Als Negativkontrolle erfolgte erneut die methodisch gleiche Transfektion einer Kontroll-RNA (Co4).



Abb 3.1.4. Änderung des Expressionsniveaus von RIG-I, IFN-β und IP-10 nach *knock-down* von TRIM9. Der *knock-down* erfolgte wie in Absatz 3.1.1. beschrieben direkt nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu Zellen im 24-*well*-Format, sowie nach 24 Stunden. Die Stimulation mit 1000ng/ml pl:C (D-G) und 3000 ng/ml 5'-pppRNA (H-K) erfolgte nach weiteren 24 Stunden durch Lipofektion. In der Kontrollbedingung ohne Stimulation (A-C) erfolgte methodisch analog die Transfektion der gleichen Menge Kontroll-RNA (Co4). Die Zelllyse zur Auswertung des mRNA-Expressionsniveaus von TRIM9, RIG-I und IFN-β mittels qRT-PCR, sowie die Analyse der Überstände mittels humanem IP-10-ELISA erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Die Expressionsniveaus der mRNA von RIG-I (C/F/J) und IFN-β (B/E/I) sind relativ zum *housekeeping*-Gen β-Aktin angegeben. Die *knock-down* Effizienz von TRIM9 (A/D/H) ist zusätzlich relativ zur Kontrollbedingung in % angegeben. Die Menge des im ELISA gemessenen humanen IP-10 ist absolut in pg/ml angegeben (G/K). Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, n=2. Alle Werte sind als Mittelwert +SEM, zur Darstellung der Varianz zwischen den unabhängigen Versuchen, angegeben.

Die Evaluation der Immunantwort erfolgte weitere 24 Stunden nach Stimulation. Hierfür wurden die Zellen lysiert um mittels qRT-PCR erneut die *knock-down*-Effizienz in allen Bedingungen zum selben Zeitpunkt zu kontrollieren. Mittels qRT-PCR wurde auf mRNA-Ebene das Expressionsniveau von RIG-I und INF-β analysiert. Mit IFN-β wurde hier einerseits der Endpunkt des RLH-Signalwegs als Parameter gewählt, andererseits mit RIG-I, der zuständige Rezeptor, dessen Expression durch Aktivierung als selbstverstärkender Mechanismus ebenfalls hochreguliert wird. Andererseits wurden die Zellüberstände verwendet, um die

Expression des durch Interferon induzierten ISGs IP-10 auf Proteinebene mittels ELISA zu messen.

Es konnte in allen Bedingungen eine adäquate *knock-down*-Effizienz, mit reduziertem Expressionsniveau von TRIM9 auf 24% bis 48% im Vergleich zur Kontrollbedingung, nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.1.5. A/D/H). In den Bedingungen ohne Stimulation (Abbildung 3.1.5. A-C) ließ sich lediglich eine sehr geringe Menge mRNA von IFN- β und RIG-I, ohne relevante Unterschiede zwischen Kontroll- und *knock-down*-Bedingung nachweisen. Ohne Stimulation, lagen die IP-10-Werte unterhalb der Nachweisgrenze, weshalb diese hier nicht dargestellt sind. Nach Stimulation mit pI:C (Abbildung 3.1.5. E-H) zeigte sich die erwartbare Induktion von RIG-I und IFN- β . Durch den *knock-down* von TRIM9 schien diese deutlich verringert zu werden. Auf Proteinebene zeigte sich IP-10 in den *knock-down*-Bedingungen ebenfalls im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger exprimiert. Nach Stimulation mit 5'-pppRNA (Abbildung 3.1.5. H-K) ließ sich der gleiche Effekt der reduzierten Expression der immunaktiven Proteine bei *knock-down* von TRIM9 beobachten.

Dies ließ vermuten, dass TRIM9 zur Aktivierung der Interferon-abhängigen Immunantwort zwar nicht essenziell ist, aber doch bei Abwesenheit eine relevante Dämpfung dieser Immunantwort zur Folge hat, also insgesamt eine aktivierende Rolle einnimmt. Dieser Effekt stellte sich sowohl bei Aktivierung von RIG-I als auch von MDA5 dar, was eine rezeptorunabhängige Funktion *up*- oder *downstream* der RLRs vermuten lässt.

3.1.3. Ein transienter *knock-down* von TRIM9 führt zu einer verringerten Expression von RIG-I, INF- β und IP-10 nach Infektion mit ss(-)RNA- und (+)ssRNA-Viren

Die beobachteten Effekte in einer Stimulation mit synthetischen Liganden, sollten nun in einer realen Virusinfektion überprüft werden. Hierzu erfolgte im selben, bereits beschriebenen transienten *knock-down*-System in 1205Lu-Zellen die Infektion mit verschiedenen Viren. Zur Verkleinerung des Versuchsansatzes, kam bei bisheriger Bestätigung der Effekte, nur eine siRNA (#58) zum *knock-down* zum Einsatz, als Vergleich erneut die Kontroll-siRNA (Co4). Der Einfachheit halber wurden schon im Labor zur Verfügung stehende und zur Untersuchung der Interferon-abhängigen Immunität gut etablierte Viren eingesetzt. Hierzu zählten drei (-)ssRNA-Viren und ein (+)ssRNA-Virus.

Die (-)ssRNA-Viren waren *Vesicular-stomatitis-*Virus (VSV), *Vesicular-stomatitis-*Virus-M51R (VSV M51R) und Sendai-Virus (SeV). VSV gehört zur Familie der Rhabdoviridae und kann über Tröpfcheninfektion Säugetiere und Menschen infizieren. Symptomatische Erkrankungen

als Folge einer VSV-Infektion sind bisher nur in Nutztieren wie Kühen, Schweinen und Pferden ähnlich der Maul-und-Klauen-Seuche beschrieben. Im Menschen führt VSV allenfalls zu einer milden grippeähnlichen Symptomatik. Die Infektion mit VSV funktioniert jedoch auch bei fast allen Zelllinien in-vitro sehr gut, weshalb dieser Virus zu den meist verwendeten und am Besten charakterisierten im experimentellen Setting zählt und bereits zu zahlreichen wissenschaftlichen Erkenntnissen über Virusinfektionen und die Immunantwort beigetragen hat. Nach Eintritt in die Wirtszelle mittels rezeptorvermittelter Endozytose, wird das Virusgenom zur Transkription und Translation pH-anhängig in das Zytoplasma freigesetzt. Hier wird die Virus-RNA von PRRs detektiert und die Interferon-abhängige Immunität aktiviert. Die Abwehr von VSV ist Interferon-abhängig, so können beispielsweise Interferon-defiziente Mäuse keinerlei Abwehr gegen VSV bilden und versterben rasch an einer Infektion (Whelan 2008). VSV bildet, wie andere Viren auch, verschiedene Immunevasionsmechanismen aus. Hierzu zählt die Suppression der Genexpression infizierter Wirtszellen durch das M-Protein, wodurch unter anderem die Interferon-Produktion inhibiert wird. Die Virusvariante VSV M51R ist durch eine M51R-Mutation gekennzeichnet, welche ebendiese Funktion des M-Proteins verhindert und so zu einer gesteigerten Interferon-Produktion und verstärkten Immunantwort der infizierten Zellen führt (Kim and Kang 2006).

SeV gehört zur Familie der Paramyxoviridae und ist eng verwandt mit dem humanen Parainfluenzavirus 1. Im Gegensatz zu diesem, ist SeV jedoch nicht humanpathogen, sondern infiziert über Tröpfcheninfektion vor allem kleine Nagetiere wie Mäuse, Ratten und Meerschweinchen und führt hier zu einem ähnlichen respiratorischen Symptomkomplex wie der humane Parainfluenzavirus 1 beim Menschen. In der Literatur wird SeV deshalb auch gelegentlich als muriner Parainfluenzavirus bezeichnet. *In vitro* infiziert SeV jedoch auch diverse humane Zelllinien sehr effektiv. Im Gegensatz zu VSV bringt SeV sein Genom und seine Proteine direkt durch Fusion der eigenen membranösen Hülle mit der Zellmembran ins Zytoplasma. Nach SeV-Infektion ist eine deutliche Induktion von IP-10 beschrieben (Cassano, Rasmussen et al. 2012).

Der Semliki-forest-Virus (SFV) kam als einziger (+)ssRNA-Virus zum Einsatz und gehört zur Familie der Togaviridae. In der Natur vor allem durch Mücken übertragen, kann SFV Säugetiere und Menschen infizieren. Beim Menschen meist asymptomatisch mit gelegentlich leichten grippeähnlichen Symptomen, führt SFV in der Maus meist zu einer schweren demyelinisierenden Meningoenzephalitis. In vitro infiziert SFV diverse humane Zelllinien. Auch hier erfolgt der Viruseintritt meist über rezeptorvermittelte Endozytose und anschließende Freisetzung in das Zytoplasma mit dortiger Detektion der PAMPs über PRRs und Induktion einer antiviralen Immunantwort (Baxter and Heise 2020).



Abb. 3.1.5. Nachweis der *knock-down*-Effizienz in allen Infektionsbedingungen durch Messung des Expressionsniveaus von TRIM9 auf mRNA- und Protein-Ebene. Nach etabliertem Protokoll erfolgte direkt nach Ausplattieren von 100.000 1205Lu-Zellen im 24-*well*-Format die Transfektion der TRIM9-spezifischen siRNA (#58), sowie erneut nach 24 Stunden. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Infektion mit den unterschiedlichen Viren. Bei Infektion mit plaquebildenden Viren (VSV, VSV M51R, SFV) erfolgte die Infektion mit einer Mol von 1. Bei nicht plaquebildenden Viren (SeV) erfolgte die Infektion nach Bestimmung der Konzentration im Medium mit 40 U/ml. Als Kontrolle erfolgte die Gleichbehandlung der Zellen im Sinne einer Scheininfektion (*mock*) ohne Viruszugabe. 24 Stunden nach Infektion erfolgte die Abnahme der Überstände, sowie die Zelllyse zur weiteren Analyse. Hier ist das Expressionsniveau von TRIM9 auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zum housekeeping-Gen β-Aktin dargestellt, in der *knock-down*-Bedingung relativ zur jeweiligen Kontroll-Bedingung in Prozent. Darüber ist die Expression von TRIM9 auf Proteinebene im western-blot dargestellt. Die Detektion von TRIM9 erfolgte mit dem Primärantikörper der Firma Abcam, die Bande komm bei etwa 65 kDa zur Darstellung. Als Ladungskontrolle wurde β-Aktin verwendet.

Es erfolgte die Kontrolle der *knock-down*-Effizienz in allen Bedingungen mittels qRT-PCR und *western-blot*. Hier konnte auf mRNA-Ebene in allen *knock-down*-Bedingungen ein auf 23% bis 44% reduziertes Expressionsniveau im Vergleich zur jeweiligen Kontrollbedingung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse ließen sich auch auf Proteinebene im *western-blot* reproduzieren (siehe Abbildung 3.1.6). Zur Evaluation der antiviralen Immunantwort erfolgte erneut die Bestimmung von RIG-I- und IFN-β-mRNA mittels qRT-PCR, sowie von humanem IP-10 mittels ELISA.





Infektionsbedingungen sind in dieser Abbildung in Zeilen untereinander dargestellt: die Scheininfektion (A-C), Infektion mit VSV (D-F), Infektion mit VSV M51R (G-I), Infektion mit SFV (J-L) und Infektion mit SeV (M-O). In den ersten beiden Spalten ist die Quantifizierung der Expression von RIG-I und IFN- β auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR relativ zum *housekeeping*-Gen β -Aktin dagestellt (A/B, D/E, G/H, J/K, M/N). In der rechten Spalte ist die Quantifizierung von humanem IP-10 mittels ELISA dargestellt. Bei großem Unterschied des Basis-Expressionsniveaus von IP-10 zwischen den unabhängigen Versuchen in absoluten Werten in pg/ml erfolgte hier zunächst die Normierung auf den mit "n" markierten Wert der jeweiligen Einzelexperimente zur Darstellung als *fold induction* (C/F/I/L/O). Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, n=3. Alle Werte sind als Mittelwert +SEM, zur Darstellung der Varianz zwischen unabhängigen Versuchen, angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem gepaartem Student t-Test bestimmt und sind als (*) = p<0.05 und (**) = p<0.01 angegeben.

In den Bedingungen ohne Infektion (Abbildung 3.1.7. A-C) ließ sich wie erwartet keine Expression von RIG-I, IFN-β oder IP-10 nachweisen. In den Bedingungen nach Infektion kam es je nach Virus zur in der Literatur beschriebenen, unterschiedlich starken Induktion. So zeigte sich nach Infektion mit VSV M51R die mit Abstand höchste Induktion von IFN-β (Abbildung 3.1.7. H) und IP-10 (Abbildung 3.1.7. I) und bei Infektion mit SeV trotz deutlich geringerer Induktion von IFN-β (Abbildung 3.1.7. N) eine sehr hohe Induktion von IP-10 (Abbildung 3.1.7. O). Nach knock-down ließ sich in fast allen Bedingungen eine deutliche Reduktion der Expression von RIG-I, IFN-β und IP-10 im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Besonders ausgeprägt konnte dieser Effekt in den Bedingungen mit insgesamt hohem Expressionsniveau gezeigt werden. Der Infektion mit VSV M51R folgte eine reduzierte Expression von IFN-β und IP-10 nach knock-down (Abbildung 3.1.7. H/I). RIG-I zeigte sich ebenfalls deutlich reduziert (Abbildung 3.1.7. G). Nach Infektion mit VSV zeigten sich wie erwartet die gleichen Effekte wie nach Infektion mit VSV M51R, nur auf geringerem Expressionsniveau, weshalb die Unterschiede weniger ausgeprägt ausfielen (Abbildung 3.1.7. D-F). Nach Infektion mit SeV zeigte sich auf Ebene von IFN-ß und IP-10 ebenfalls ein deutlicher Effekt des knock-downs (Abbildung 3.1.7. N/O). Auf die Expression von RIG-I schien dieser hier jedoch kaum Einfluss zu haben (Abbildung 3.1.7. M). Bei Infektion mit SFV kam es knock-down stellten sich allenfalls dezent dar (Abbildung 3.1.7. J-L).

Insgesamt schienen die hier gewonnenen Ergebnisse nach Virusinfektion die Ergebnisse nach Stimulation zu bestätigen und eine relevante Rolle für TRIM9 in der Interferon-abhängigen Immunantwort nahe zu legen. Erneut schien die verminderte Expression von TRIM9 eine verminderte Induktion von RIG-I, IFN-β und IP-10 zur Folge zu haben. Ob der allenfalls minimale Effekt im Falle der Infektion mit SFV als einzigem untersuchten (+)ssRNA-Virus eine Zuordnung der Funktionalität von TRIM9 zur antiviralen Immunität bei Infektion mit (-)ssRNA-Viren zulässt, ist unsicher und ist Grundlage weiterführender Experimente.

3.1.4. Ein transienter *knock-down* von TRIM9 führt zu einer geringeren Virusreplikation nach Infektion mit ss(+)RNA- und ss(-)RNA-Viren

Zur weiteren Evaluation des *knock-down*-Effektes nach Virusinfektion erfolgte aus den Überständen des in Abschnitt 3.1.3. beschriebenen Versuches im Falle der Infektion mit plaquebildenden Viren (VSV, VSV M51R, SFV) ein Plaqueassay mit Berechnung der *tissue culture infective dose 50%* (TCID50) zur Quantifizierung der vitalen Virusmenge, wie in Abschnitt 2.2.5. beschrieben.



Abb. 3.1.7. Nachweis einer geringeren Virusmenge in den Überständen der infizierten Zellen nach knock-down von TRIM9. Nach Durchführung des Versuchs mit *knock-down* und Virusinfektion wie in Abbildung 3.1.5 beschrieben, wurde die Menge an vitalen Viruspartikeln in den Zellüberständen bestimmt. Hierfür wurden die Überstände in Verdünnungsreihen in acht Replikaten auf BHK-1.Zellen pipettiert. Nach zwei bis fünf Tagen erfolgte lichtmikroskopisch die Bestimmung der letzten Verdünnung, welche noch zythopatische Effekte hervorrief. Hieraus konnte mittels des Spearman-und-Kärber-Algorithmus die ursprüngliche Viruskonzentration berechnet werden. Der Versuch wurde drei Mal unabhängig durchgeführt, n=3. Die Ergebnisse sind als Mittelwert der drei Versuche +SEM als Angabe der Varianz zwischen unabhängigen Experimenten angegeben

Hier zeigte sich nach *knock-down* unabhängig vom Virus reproduzierbar eine verringerte Virusmenge in den Überständen (siehe Abbildung 3.1.8.). Geht man davon aus, dass die antivirale Immunantwort durch den *knock-down* von TRIM9 weniger ausgeprägt stattfindet, wäre hier eine stärkere Virusreproduktion mit genau dem gegenteiligen Effekt zu erwarten gewesen. Eine andere mögliche Hypothese wäre jedoch, dass TRIM9 schon vorgeschaltet eine regulierende Funktion auf die Virusreplikation ausübt, sodass es zu geringerer Virusmenge und infolgedessen zu geringerer Aktivierung der Immunantwort kommt. Die Ergebnisse bleiben zu diskutieren und in weiterführenden Versuchen zu evaluieren.

3.2. Einfluss eines erhöhten TRIM9-Expressionsniveaus auf die RLHabhängige Immunantwort

3.2.1. Etablierung einer transienten Überexpression

Analog zur Untersuchung der Immunantwort bei reduziertem Expressionsniveau von TRIM9, sollte die Interferon-abhängige Immunantwort bei erhöhtem Expressionsniveau untersucht werden. Hierfür standen zwei Expressionsplasmide für TRIM9 zur Verfügung. Eines kodierte für TRIM9 mit N-terminalem HA-*tag* (TRIM9-HA), das andere für TRIM9 mit N-terminalem GFP-*tag* (TRIM9-GFP). Da ein HA-*tag* deutlich kleiner (9 Aminosäuren) als ein GFP-*tag* (238 Aminosäuren) ist, wurde für funktionelle Versuche zur Vermeidung der Verfälschung von Effekten durch Einfluss der Markierung auf die Proteinkonformation, TRIM9-HA gewählt. In Titrationsversuchen konnte in 1205Lu-Zellen mit 250 ng und 500 ng pro 24-*well* mit Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *GeneJuice* eine gute Transfektionseffizienz erreicht werden. Die Zellen schienen lichtmikroskopisch nach TRIM9-Überexpression bei höheren Dosierungen ab 1µg DNA jedoch eine erhöhte Zellsterblichkeit aufzuweisen, weshalb diese Bedingungen hier nicht ausgewertet sind.



Abb. 3.2.1. Transiente Überexpression von TRIM9-HA in 1205-Lu-Zellen. Nach Ausplattieren 100.000 von 1205Lu-Zellen im 24-well-Format erfolgte nach 24 Stunden die Transfektion von je 250ng und 500ng Expressionsplasmid für TRIM9-HA durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz GeneJuice. Als Kontrolle erfolgte die Transfektion der gleichen Menge des Leervektors pcDNA 3.1. mit aleicher Methodik. Niedrigere Konzentrationen wurden jeweils mit Leervektor auf die gleiche Gesamt-DNA-Menge aufgefüllt. Nach nochmal 24 Stunden folgte je nach

Versuch eine Stimulation, hier mit 1000ng/ml pI:C mittels Lipofektion, wie in vorangegangenen Versuchen beschrieben. Als Kontrolle hierfür diente eine Kontroll-RNA (Co4). Die Zelllyse zur weiteren Auswertung erfolgte nach weiteren 24 Stunden. Der Versuch erfolgte in Duplikaten, sodass je ein *well* zur Messung der Expressionsniveaus auf mRNA-Ebene mittels qPCR verwendet werden konnte und das andere zur Messung der Proteinkonzentration mittels *western-blot*. Die Darstellung der qPCR-Ergebnisse erfolgen relativ zum *housekeeping*-Gen β-Aktin. Die Detektion von TRIM9-HA im *western-blot* erfolgte hier mit dem Anti-HA-Primärantikörper der Firma Thermo Scientific. TRIM9-HA kommt auf Höhe der 70 kDa-Bande des verwendeten Markers zur Darstellung.

Die Überexpression ließ sich sowohl auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR, als auch auf Proteinebene mittels *western-blot*, nachweisen (siehe Abbildung 3.2.1). Im *western-blot* kam hier der HA-Antikörper der Firma Thermo Scientific zum Einsatz. Hiermit stellte sich das überexprimierte TRIM9-HA etwas oberhalb der bisher detektierten Bande des endogenen TRIM9, etwa auf Höhe der 70 kDa Bande des verwendeten Markers dar (siehe Abbildung 3.2.1). Dieser geringe Größenunterschied wurde am ehesten als Effekt des zusätzlichen HA-*tags*, sowie im Rahmen der Messungenauigkeit gewertet.

3.2.2. Eine transiente Überexpression von TRIM9 führt zu einer gesteigerten Expression von RIG-I und INF-β nach Stimulation mit pI:C

Zur Untersuchung des Effekts einer transienten Überexpression von TRIM9 auf die Interferonabhängige Immunität, erfolgte zunächst die oben beschriebene Transfektion des Expressionsplasmids für Trim9-HA in zwei verschiedenen Dosierungen. Als Kontrollen diente hier der Leervektor pcDNA 3.1. Anschließend erfolgte nach 24 Stunden die Stimulation durch den synthetischen Liganden pI:C, methodisch analog zum Experiment in Abschnitt 3.1.2. durchgeführt, hier diente als Kontrolle erneut die Kontroll-RNA Co4.



Abb. 3.2.2. Änderung des Expressionsniveaus von RIG-I und INF- β nach Überexpression von TRIM9-HA und Stimulation mit pI:C. Es erfolgte 24 Stunden nach Ausplattieren von 100.000 1205-Lu-Zellen pro 24-*well* die Transfektion mit je 250 ng und 500 ng Expressionsplasmid für TRIM9-HA. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pcDNA 3.1 eigesetzt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Stimulation durch Transfektion von 1000 ng/ml pI:C. Als Kontrolle wurde die Kontroll-RNA Co4 eingesetzt. Nach nochmal 24 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen und das Expressionsniveau von RIG-I und INF- β wurde auf mRNA-Ebene mittels qPCR gemessen. Der Versuch wurde dreimal unabhängig wiederholt. Es ist jeweils der Mittelwert zwischen den drei Exprimenten +SEM angegeben.

Die Evaluation der die Interferon-abhängigen Immunantwort erfolgte auf mRNA-Ebene von Rig-I und IFN-β mittels qRT-PCR. In den unstimulierten Bedingungen zeigte sich wie zu erwarten keine relevante Expression von Rig-I und IFN-β. In den mit pI:C stimulierten Bedingungen, zeigte sich eine deutliche Induktion von Rig-I und IFN-β. Nach Überexpression von TRIM9-HA in unterschiedlichen Dosierungen schien sich, mit steigender Dosis, auch eine steigende Expression von Rig-I und IFN-β zu zeigen (Abbildung 3.2.2.). Das würde erneut für eine aktivierende Wirkung von TRIM9 auf die Interferon-abhängige Immunität und somit eine immunstimulatorische Funktion von TRIM9 sprechen. (Dieser Effekt zeigte nach dreimaliger Reproduktion zwar einen Trend, war jedoch nicht statistisch signifikant). Inwiefern die beobachtete erhöhte Zellsterblichkeit bei höheren Konzentrationen mit einer Wirkung von TRIM9 oder einer Immunstimulation als Ursache oder Wirkung im Gegensatz zu einer direkten toxischen Wirkung der Transfektion von zu viel DNA zusammenhängt, bleibt zu diskutieren.

3.2.3. Ein gesteigertes Expressionsniveau von TRIM9 führt zu einer gesteigerten Aktivierung des ISRE-Promotors mit und ohne Voraktivierung

Da die Regulation von RIG-I und IFN-β auf mRNA-Ebene vielen Einflüssen unterliegt und bei Überexpression von TRIM9 kein eindeutiger Effekt nachweisbar war, sowie die transfizierten Zellen eine erhöhte Sterblichkeit aufwiesen, sollte ein erhöhtes Expressionsniveau von TRIM9 noch einmal in einer anderen Versuchsanordnung mit weniger Interaktion durch das zelleigene Immunsystem untersucht werden.

Hierfür wurden Luciferase-*assays* in HEK293-Zellen, wie in Abschnitt 2.2.6. beschrieben, durchgeführt. Als Reporterplasmid diente hierbei eine *Firefly*-Luciferase mit vorgeschaltetem Promotor aus mehreren ISRE-Domänen. Dieser ähnelt dem Promotor endogener ISGs und wird durch die Transkriptionsfaktoren pSTAT1/pSTAT2 und ISFG3 reguliert, welche durch die Induktion Interferon-β-abhängiger Signalwege aktiviert werden. Als Positivkontrolle und zur Voraktivierung des ISRE-Promotors auf verschiedenen Stufen des RIG-I-Signalweges, wurden Expressionsplasmide für RIG-I und IRF3-5D (eine konstitutiv aktive Variante des Transkriptionsfaktors IRF3) gemeinsam mit unterschiedlichen Konzentrationen des Expressionsplasmids für TRIM9-HA transfiziert. Als Negativkontrolle diente erneut der Leervektor pcDNA 3.1. Lichtmikroskopisch schienen diese Zellen, bei deutlich geringeren DNA-Mengen als im Vorversuch, intakt.

Bei Zugabe von RIG-I und IRF3-5D ohne TRIM9, ließ sich wie erwartet eine signifikante Luciferase-Aktivität, also Aktivierung des ISRE-Promotors, im Vergleich zur Kontroll-Bedingung beobachten (siehe Abbildung 3.2.3.).



Abb. 3.2.3. Aktivierung des **ISRE-**Reporterplasmids durch Überexpression von **IRF3-5D.** 24 RIG-I und Stunden nach Ausplattieren von 25.000 HEK293-Zellen im 96well-Format erfolgte die Transfektion mittels GeneJuice in Triplikaten. Insgesamt wurden jeweils 120ng Plasmid-DNA pro well transfiziert, zusammengesetzt aus je 40ng Firefly-Luciferase (hier mit ISRE-Promotor), 40ng konstitutiv exprimierter Renilla-Luciferase zur Normalisierung der Transfektionsvarianz, 20ng Expressionsplasmid zur Vorstimulation (RIG-I oder IRF3-5D), sowie unterschiedliche

Konzentrationen des Expressionsplasmids für TRIM9-HA (0-20ng, in dieser Abbildung 0ng). Als Kontrolle und zum Auffüllen auf stets die gleiche DNA-Menge, diente der Leervektor pcDNA 3.1. Nach nochmals 24 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen und nach Aufteilung der Lysate die jeweilige Zugabe von 20µl der beiden Luciferase-Substrate, Luciferin und Coelenterazin, sowie die anschließende Messung der Lichtemission. Die Ergebnisse wurden in *relative light units* (RLU) angegeben. Der Versuch wurde viermal unabhängig wiederholt, n=4. Alle Werte sind als Mittelwert +SEM, zur Darstellung der Varianz zwischen unabhängigen Versuchen, angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem gepaartem Student t-Test bestimmt und sind als (*) = p<0.05 angegeben.



Abb. 3.2.4. Aktivierung des ISRE-Promotors durch unterschiedliche Konzentrationen von TRIM9-HA mit und ohne Vorstimulation. 24 Stunden nach Ausplattieren von 25.000 HEK293-Zellen im 96well-Format erfolgte die Transfektion mittels GeneJuice in Triplikaten. Insgesamt wurden jeweils 120ng Plasmid-DNA pro well transfiziert, zusammengesetzt aus je 40ng Firefly-Luciferase (hier mit ISRE-Promotor), 40ng konstitutiv exprimierter Renilla-Luciferase zur Normalisierung der Transfektionsvarianz, 20ng Expressionsplasmid zur Vorstimulation (RIG-I oder IRF3-5D), sowie unterschiedliche Konzentrationen des Expressionsplasmids für TRIM9-HA (0-20ng). Als Kontrolle und zum Auffüllen auf stets die gleiche DNA-Menge, diente der Leervektor pcDNA 3.1. Nach nochmals 24 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen und nach Aufteilung der Lysate die jeweilige Zugabe von 20µl der beiden Luciferase-Substrate, Luciferin und Coelenterazin, sowie die anschließende Messung der Lichtemission. Die Ergebnisse wurden in relative light units (RLU) angegeben. Der Versuch wurde viermal unabhängig wiederholt, n=4. Alle Werte sind als Mittelwert +SEM, zur Darstellung der Varianz zwischen unabhängigen Versuchen, angegeben. Die Signifikanzniveaus wurden mit dem gepaartem Student t-Test bestimmt und sind als (*) = p<0.05 und (**) = p<0.01 angegeben.

Bei gleichzeitiger Zugabe des Expressionsplasmids für TRIM9-HA zeigte sich mit und ohne Vorstimulation eine Steigerung der Luciferase-Aktivität. (siehe Abbildung 3.2.4) Bei Vorstimulation mit IRF3-5D schien sich dieser Effekt dosisabhängig zu steigern. Hier ließ sich bei Zugabe einer niedrigen Konzentration von TRIM9 (5 ng) auch eine Signifikanz des Effekts nachweisen. Bei Vorstimulation mit RIG-I schien der Effekt nicht ganz so ausgeprägt. In den Bedingungen ganz ohne Vorstimulation mit Zugabe des Leervektors, zeigte sich jedoch auch eine signifikante Aktivierung des ISRE-Promotors wenn auch auf deutlich niedrigerem Niveau.

Dies lässt erneut einen immunstimulatorischen Effekt von TRIM9 schon allein durch die Steigerung des Expressionsniveaus vermuten. Bei deutlich stärker ausgeprägtem Effekt unter gleichzeitiger Stimulation des RLH-Signalwegs, scheint ein Einfluss von TRIM9 hier möglich.

3.3. Detektion der Expression von endogenem TRIM9

3.3.1. Expressionslevel von TRIM9 in unterschiedlichen Zelllinien

Die bisher beschriebenen Experimente widmeten sich der Frage, ob TRIM9 eine Rolle in der antiviralen Immunantwort spielt und ob es in diesem Falle eine immunstimulierende, immunsuppressive oder immunmodulierende Funktion einnimmt. Im die Wirkungsweise besser zu verstehen, versuchen die nächsten Experimente einzugrenzen wo TRIM9 im Organismus und der Zelle eine Rolle spielt. In der, zum Zeitpunkt dieser Arbeit, sehr spärlichen Literatur zu TRIM9, war hier in histologischen Untersuchungen mittels mRNA-Hybridisierung vor allem die Expression im menschlichen Gehirn beschrieben worden [(Berti, Messali et al. 2002). Zu Beginn dieser Arbeit stand für den Nachweis auf Proteinebene lediglich der Antikörper gegen TRIM9 der Firma Abcam zur Verfügung, ohne bisherige Anwendung in Publikationen. Zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität, erfolgte zunächst die Testung an Lysaten von 1205Lu-Zellen nach Transfektion des Expressionsplasmids für TRIM9-HA im Vergleich zu einem gut etablierten HA-spezifischen Antikörper.





Hier zeigte sich bei Anwendung des Antikörpers eine einzelne Bande auf gleicher Höhe wie nach Anwendung des HA-Antikörpers (Abbildung 3.3.1.). Die Bande zeigte sich zwar nicht auf Höhe des für TRIM9 errechneten Molekulargewichts von 79 kDa, sondern etwas niedriger bei etwa 65 kDa, zeigte sich jedoch bei beiden Antikörpern auf derselben Höhe. Es ließ sich auch in weiteren Kontrollen sowohl durch *knock-down* (siehe Abschnitt 3.1.1.), als auch durch

Überexpression von TRIM9 mit diesem Antikörper ein Korrelat im *western-blot* darstellen, sodass von einer adäquaten Spezifität auszugehen war.

Da kein menschliches Gewebe zur Verfügung stand um die Untersuchungen von Berti et al. (Berti, Messali et al. 2002) zu verifizieren, erfolgten eigene Expressionsanalysen. Zunächst erfolgte die Untersuchung der endogenen TRIM9-Expression auf Proteinebene im *westernblot* in Lysaten verschiedener Zelllinien (Abbildung 3.3.2.). Zur Angleichung der Proteinmenge erfolgte im Vorfeld ein *Bradford-assay*, zur Ladekontrolle erfolgte außerdem die Detektion von β -Aktin. Es wurden Zelllinien mit unterschiedlichen Eigenschaften und unterschiedliche Ursprungsgewebe eingeschlossen.

Neben den hier bereits mehrfach eingesetzten und beschriebenen 1205Lu- und HEK293-Zellen, wurden die Zelllinien HeLa, Hepa 1.6, SY5Y, THP-1 und humane PBMCs betrachtet. Die Zelllinie HeLa wurde 1951 aus einem humanen Zervixkazinom generiert und ist die älteste immortalisierte Tumorzelllinie, weshalb sie in der Forschung eine der etabliertesten Zellinien ist. Hepa 1.6 wurde hier als einzige murine Zellinie betrachtet, ist als Zelllinie aus einem Lebertumor jedoch in Hinblick auf die Frage der Relevanz bei Hepatitis C interessant. Die Zelllinie SH-SY5Y ist aus einem humanen Neuroblastom generiert und wurde hier betrachtet, da die Expression von TRIM9 bisher vor allem im menschlichen Gehirn vorbeschrieben war (Berti, Messali et al. 2002). Bezüglich der Rolle von TRIM9 im Immunsystem, schien auch eine die Untersuchung der Expression in Immunzellen interessant, weshalb THP-1-Zellen und frisch aufgereinigte PBMCs betrachtet wurden. THP-1 ist eine Zelllinie aus humanen Monozyten, gewonnen aus einer AML FAB 5. Humane periphere Monozyten (PBMCs) wurden aus einer frischen Blutabnahme isoliert.





In den bisher verwendeten humanen Zellreihen 1205Lu und Hek293, zeigte sich ebenso wie in HeLa-Zellen und der murinen Leberzellreihe Hepa 1.6 in unstimuliertem Zustand eine relevante endogene TRIM9-Expression. In frisch aufgereinigten humanen PBMCs fand sich dagegen eine deutlich geringere Expression von TRIM9, nur nach deutlich längerer Belichtungszeit detektierbar. Der gleiche Befund zeigte sich in der AML-Zellreihe THP-1, welche als einzige der betrachteten Zellreihen in Suspension wächst, sowie in der neuronalen Zelllinie SY5Y. Es lässt sich aber festhalten, dass sich in allen eingesetzten Zelllinien, unabhängig von welchem Organ abstammend, endogen exprimiertes TRIM9 nachweisbar war, was eine ubiquitäre Expression, wenn auch auf verschiedenen Niveaus vermuten lässt.

3.3.2. Expressionslevel von TRIM9 in verschiedenen Mausorganen

Nachdem auch die Detektion von murinem TRIM9 in Hepa 1.6 Zellen erfolgreich war, wurden um die Expression von TRIM9 weiter zu untersuchen, Lysate diverser Organe einer Maus (C57Bl/6) angefertigt (siehe Abschnitt 2.2.10.). Hierbei wurden die verschiedenen Zelltypen in den einzelnen Organen jedoch nicht voneinander getrennt, sondern eine Proteinaufreinigung aus den Gesamtorganen angefertigt, sodass beispielsweise Bindegewebszellen wie Fibroblasten oder auch Blutbestandteile zu gewissem Maße in allen Lysaten vorhanden waren. Auch diese Lysate wurden nach Proteinaufreinigung und *Bradford-assay* im *westernblot* dem TRIM9-Antikörper ausgesetzt.



Abb. 3.3.3. Expression von TRIM9 in den Organen einer Maus. Nach Organentnahme aus einer C57BI/6 Wildtyp Maus, erfolgte die Lyse der Gesamtorgane, sowie die Proteinaufreinigung hieraus wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben. Nach *Bradford-assay* und Angleich der Proteinkonzentrationen erfolgte die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese mit anschließendem *western-blot*. Die Inkubation der Membranen erfolgte im TRIM9-spezifischen Primärantikörper der Firma Abcam (1:500 verdünnt), sowie dem Anti-Hase Sekundärantikörper (1:10.000 verdünnt).

Hier zeigte sich auf Höhe der bisher beobachteten Bande (65 kDA) eine relevante Expression von TRIM9 in sämtlichen Organen mit Ausnahme des Gehirns, hier die mit Abstand schwächste, kaum detektierbare Bande, was in deutlichem Wiederspruch zu den Ergebnissen

von Berti et al. stünde, die vor allem eine Expression im embryonalen Gehirn beschreiben konnten (Berti, Messali et al. 2002). Besonders ausgeprägte Banden zeigten sich in Herz, Lunge, Haut und Pankreas. Es zeigte sich jedoch außerdem erstmals eine weitere Bande mit noch etwas niedrigerem Molekulargewicht bei etwa 55 kDa. Diese zeigte sich besonders ausgeprägt in Herz, Leber, Haut und Gehirn. Neben einer unspezifischen Bande, wären hier (bis dahin nicht bekannte) unterschiedliche, nur in vivo zu betrachtende Isoformen von TRIM9 ein möglicher Erklärungsansatz.

3.4. Intrazelluläre Lokalisation von TRIM9

3.4.1. Intrazelluläre Verteilungsmuster von überexprimiertem TRIM9

Nach Betrachtung der Verteilung im Organismus, erfolgte zur näheren Untersuchung des Wirkungsmechanismus, die Betrachtung der intrazellulären Verteilung und Bestimmung des Kompartiments zur Eingrenzung möglicher Interaktionspartner. Da der vorhandene TRIM9-Antikörper der Firma Abcam laut Herstellerangaben für Immunfluoreszenz ungeeignet war und mit dem hierfür etablierten Protokoll (siehe Abschnitt 2.2.8.) und Sekundärantikörper auch in verschiedenen Titrationsversuchen keine Darstellung von endogenem TRIM9 gelang, erfolgte zunächst erneut die Darstellung von überexprimiertem TRIM9 in der konfokalen Mikroskopie (siehe Abschnitt 2.2.7). Hierfür kam TRIM9-GFP zum Einsatz, welches aufgrund des Fusionsproteins in der konfokalen Mikroskopie detektiert werden kann, ohne einen Antikörper zu benötigen. Aufgrund der für die konfokale Mikroskopie günstigen flach adhärenten Wachstumseigenschaften, wurden hier HeLa-Zellen verwendet, auch wenn in diesen, trotz Dosistitration Plasmids erneuter des und Austesten unterschiedlicher Tranfsektionsreagenzien, nur eine wesentlich geringere Transfektionsrate als in 1205Lu- oder Hek293-Zellen erreicht werden konnte.



Abb. 3.4.1. Intrazelluläre Lokalisation von TRIM9-GFP. Nach Ausplattieren von 50.000 HeLa-Zellen im 24-*well*-Format erfolgte nach 24 Stunden die Transfektion des Expressionsplasmids für TRIM9-GFP durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine-2000*. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (6, 12, 16, 24 Stunden) erfolgte die Fixierung der Zellen in 4% Formaldehyd. In der Abbildung sind exemplarisch Zellen 12 Stunden nach Transfektion von 250ng Expressionsplasmid zu sehen. Alle anderen Zeitpunkte und Konzentrationen stellten sich ähnlich dar. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (Verdünnung 1:10.000 in PBS) angefärbt. Nach Fixierung auf einem Objektträger mit Eindeckmedium erfolgte die konfokale Mikroskopie. Hierbei erscheint GFP durch Laser angeregt bei 450nm grün und Hoechst bei 350 nm blau. In A und B sind repräsentativen Zellen der gleichzeitig vorliegenden tubulären (A) und granulären (B) Anfärbungsmuster gezeigt.

Es konnten in allen Versuchsansätzen, egal welche Dosis des Expressionsplasmids zum Einsatz kam und zu welchem Zeitpunkt die Fixierung der Zellen erfolgte, zwei unterschiedliche Verteilungsmuster identifiziert werden (siehe Abbildung 3.4.1.). Einerseits präsentierte sich TRIM9-GFP im Zytoplasma als granuläre Strukturen unterschiedlicher Größe, im Sinne zytoplasmatischer Einschlusskörperchen (siehe Abbildung 3.4.1. B), andererseits zeigte sich in anderen Zellen ein längliches vernetztes tubuläres Verteilungsmuster ähnlich der Verteilung von Mikrotubili (siehe Abbildung 3.4.1. A).

Um einen Aggregationseffekt durch den GFP-tag auszuschließen, wurde der Versuch mit TRIM9-HA wiederholt. Zwischenzeitlich konnte ein neuer TRIM9-Antikörper der Firma Novus aquiriert werden, welcher laut Herstellerangaben gut für Immunfluoreszenz geeignet sein sollte. Zur Spezifitätstestung erfolgte zunächst die Überexpression von TRIM9-HA. Hiernach erfolgte sowohl die Exposition gegenüber dem HA-Antikörper, als auch dem TRIM9-Antikörper der Firma Novus. Da der HA-Antikörper vom Hasen stammte, der TRIM-9 Antikörper von der Maus, konnten zwei verschiedene Sekundärantikörper mit Fluorochromen in unterschiedlichen Wellenlängebereichen und somit unterschiedlichen Farben (grün und rot) eingesetzt werden.

(A) (B)

Abb. 3.4.2. Intrazelluläre Lokalisation von TRIM9-HA. Nach Ausplattieren von 50.000 HeLa-Zellen im 24-*well*-Format erfolgte nach 24 Stunden die Transfektion des Expressionsplasmids für TRIM9-HA durch Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz *Lipofectamine-2000.* Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion (6, 12, 16, 24 Stunden) erfolgte die Fixierung der Zellen in 4% Formaldehyd, sowie die Permeabilisierung mit 0,1% Triton-x-100. Dann erfolgte die Inkubation im Primärantikörper gegen TRIM9 der Firma Novus (1:500 verdünnt) und anschließend dem HA-Antikörper (1:500 verdünnt). Als Sekundärantikörper kam ein Anti-Maus-Antikörper (1:10.000 verdünnt) gekoppelt an das Fluorochrom *alexa fluor 680* (nach Anregung bei 680 nm rot fluoreszierend), sowie ein Anti-Hase-Antikörper (1:10.000 verdünnt) gekoppelt an *alexa fluor 488* (nach Anregung bei 450 nm grün fluoreszierend) zum Einsatz. In der Abbildung sind exemplarisch Zellen nach 12 Stunden nach Transfektion von 250ng Expressionsplasmid zu sehen. Alle anderen Zeitpunkte und Konzentrationen stellten sich gleich dar. Die Zellkerne wurden mit Hoechst33342 (Verdünnung 1:10.000 in PBS, nach Anregung bei 350 nm blau fluoreszierend) angefärbt. In A und B sind erneut repräsentativen Zellen der gleichzeitig vorliegenden tubulären (A) und granulären (B) Anfärbungsmuster gezeigt.



Es konnte eine Kolokalisation der beiden Antikörper an derselben Struktur bestätigt werden. Auch hier zeigten sich die beiden oben beschriebenen Verteilungsmuster mit granulären zytoplasmatischen Einschlusskörperchen und tubulärer Verteilung ähnlich Mikrotubuli (siehe Abbildung 3.4.2. A/B). Sowohl TRIM9-GFP als auch TRIM9-HA zeigen also die gleiche intrazelluläre Verteilung. Es zeigte sich jedoch auch eine Art Zwischenzustand mit kleinen länglichen Mustern (siehe Abbildung 3.4.2. B). Dies führte zur Hypothese, dass es sich bei den beiden beobachteten Verteilungsmustern, um fließend ineinander übergehende Zustände handeln könnte.

3.4.2. Änderung intrazellulärer Verteilungsmuster von TRIM9 im live-cellimaging

Zur Klärung der Frage, ob die unterschiedlichen, beobachteten Verteilungsmuster nur zeitabhängige ineinander übergehende Zustände sind, wurden die mit TRIM9-GFP transfizierten Zellen mittels *live-cell-imaging* für 12 Stunden beobachtet. Hierfür wurden abermals HeLa-Zellen mit TRIM9-GFP transfiziert. Es wurden deutlich weniger Zellen ausplattiert, um das Anwachsen in einer einzelnen mit dem Mikroskop erfassbaren Schicht zu gewährleisten. Unter möglichst stressfreien Bedingungen (siehe Abschnitt 2.2.9.) wurden dann vorher ausgewählte Bildausschnitte ab 12 Stunden nach Transfektion, für 6 Stunden unter dem konfokalen Mikroskop gefilmt.

Hierbei ließ sich in mehreren Zellen der Übergang der kugeligen Einschlusskörperchen in längliche Verteilungsmuster, in Ansätzen dem beobachteten mikrotubulären Verteilungsmuster entsprechend, darstellen (siehe Abbildung 3.4.3. A-C).



Abb. 3.4.3. Änderung der intrazellulären Lokalisation von TRIM9-GFP im Verlauf von 6 Stunden. 50.000 HeLa-Zellen wurden im 6-*well*-Format mit Glasboden ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion von 100ng Expressionsplasmid für TRIM9-GFP durch Lipofektion mit *TransIT-X2*. Nach weiteren 12 Stunden wurden die *well*-Platte in die *live-cell-imaging*-Box des konfokalen Mikroskops verbracht. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden 10 verschiedene Bereiche mit erfolgreich transfizierten Zellen identifiziert und definiert. Von diesen 10 Feldern entstand in den nächsten 6 Stunden alle 20 Minuten eine konfokal mikroskopische Fotographie mit Anregung bei 450nm wobei GFP grün fluoresziert. Hier ist an einer exemplarischen Aufnahme mit zwei Zellen, die TRIM9-GFP exprimieren, der zeitliche Verlauf dargestellt mit t=0s (A), t= 6000s (B), t=18.000s (C).



Abb. 3.4.4. Änderung der intrazellulären Lokalisation von TRIM9-GFP im Verlauf einer Zellteilung. 50.000 HeLa-Zellen wurden im 6-*well*-Format mit Glasboden ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion von 100ng Expressionsplasmid für TRIM9-GFP durch Lipofektion mit *TransIT-X2*. Nach weiteren 12 Stunden wurden die *well*-Platte in die *live-cell-imaging*-Box des konfokalen Mikroskops verbracht. Mittels konfokaler Mikroskopie wurden 10 verschiedene Bereiche mit erfolgreich transfizierten Zellen identifiziert und definiert. Von diesen 10 Feldern entstand in den nächsten 6 Stunden alle 20 Minuten eine konfokal mikroskopische Fotographie mit Anregung bei 450nm wobei GFP grün fluoresziert. Hier ist an einer exemplarischen Aufnahme mit einer Zelle, die im Verlauf eine Zellteilung zu vollziehen scheint und TRIM9-GFP exprimiert, der zeitliche Verlauf dargestellt mit t=0s (A), t= 2400s (B), t=4800 (C), t=6000s (D), t=7200s (E), t=10.000s (F).

Dieses Phänomen ließ sich auch wenige Male während einer Zellteilung beobachten (siehe Abbildung 3.4.4. A-F). Leider ließen sich die Verteilung in den nach der Teilung entstandenen Zellen nicht weiter beobachten, da sich diese aus der gefilmten Ebene zu bewegen schienen und nicht mehr adäquat abgebildet wurden (siehe Abbildung 3.4.4. F).

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit evaluiert die E3-Ubiquitinligase TRIM9 hinsichtlich ihrer potenziellen Relevanz in der RLR-abhängigen Immunantwort. Grundlage dieser Arbeit waren die, zu Beginn dieser Arbeit im März 2013 vorliegenden wissenschaftlichen Untersuchungen zu TRIM9, welche in Abschnitt 1.3.3. beschrieben wurden und eine immunologische Rolle von TRIM9 wahrscheinlich machten. Die genomweite Assoziationsstudie, in welcher ein SNP in der 3'UTR von TRIM9 Einfluss auf die Spontanausheilungsrate einer HCV-Infektion hatte, ließ einen Zusammenhang des Expressionsniveaus von TRIM9 mit der antiviralen Immunantwort vermuten, weshalb der Fokus in dieser Arbeit auf der Interferon-abhängigen, antiviralen Immunität lag.

Hierfür wurde ein transienter knock-down sowie eine transiente Überexpression von TRIM9 etabliert um die Immunantwort mit verschiedenen Expressionsniveaus von TRIM9 untersuchen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass es nach transientem siRNAvermittelten knock-down mit verminderter Expression von TRIM9, nach Stimulation mit synthetischen Liganden von RIG-I und MDA5 (5'-pppRNA und pI:C), zu einer verminderten Induktion von RIG-I und Interferon-β auf mRNA-Ebene kommt. Auch die Expression des ISGs IP-10 zeigte sich auf Proteinebene nach knock-down und Stimulation mit beiden Liganden signifikant reduziert (siehe Abschnitt 3.1.2.). Ebenso konnte nach Infektion mit den (-)ssRNA-Viren VSV, VSV M51R und SeV, sowie dem (+)ssRNA-Virus SFV, nach knock-down von TRIM9 eine relevant niedrigere Induktion von RIG-I und Interferon-β auf mRNA-Ebene, sowie IP-10 auf Proteinebene gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.1.3.). Diese Ergebnisse scheinen eine immunstimulatorische, antivirale Funktion von TRIM9 nahezulegen. Im Falle von plaquebildenden Viren (VSV, VSV M51R, SFV) zeigte sich hier nach knock-down jedoch auch eine verringerte Viruslast (siehe Abschnitt 3.1.4.). Dies spräche entweder für eine provirale Funktion von TRIM9, oder möglicherweise einen Effekt von TRIM9 auf die Virusreplikation an sich, sodass die geringere Aktivierung der antiviralen Immunität durch eine geringere Viruslast bedingt ist. An sich passt dieses Ergebnis jedoch nicht zu der bisher vermuteten immunstimulatorischen Funktion von TRIM9 im RLH-Signalweg, denn dann wäre eine höhere Viruslast nach knock-down zu erwarten gewesen.

Nach Überexpression zeigte sich ein weniger ausgeprägter Effekt. Bei Überexpression von TRIM9-HA, kam es nach Stimulation mit den synthetischen Liganden von MDA5, nur zu einer dezenten, nicht signifikanten Steigerung der Expression von RIG-I und Interferon-β auf mRNA-Ebene (siehe Abschnitt 3.2.2.). Außerdem zeigten sich lichtmikroskopisch bei höheren Dosen eine erhöhte Zellsterblichkeit. Unter Verwendung eines ISRE-Reporterplasmids konnte durch die Überexpression von TRIM9 jedoch eine dosisabhängige Aktivierung des ISRE-Promotors, mit und ohne Vorstimulation des RLH-Signalwegs gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.3.). Dies würde abermals zu einer immunstimulatorischen Funktion von TRIM9 passen.

Um das bisher wenig charakterisierte Protein genauer zu betrachten und mögliche Interaktionspartner und Wirkungsmechanismen einzugrenzen, erfolgten außerdem Untersuchungen bezüglich der endogenen Expression und intrazellulären Lokalisation. Hier konnte TRIM9 in allen untersuchten Zelllinien (1205Lu, Hek293, HeLa, Hepa 1.6, SH-SY5Y, THP-1 und PBMCs) im western-blot mit dem TRIM9-spezifischen Antikörper der Firma Abcam als Bande auf Höhe von 65 kDa detektiert werden, wobei das Expressionsniveau in der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y und den beiden immunzellhaltigen Proben THP-1 und frischen PBMCs, deutlich niedriger war als in den anderen Zelllinien (siehe Abschnitt 3.3.1.). Dies widersprächt dem bisher publizierten Expressionsmuster, welches TRIM9 vor allem im Gehirn (Berti, Messali et al. 2002), aber auch in Immunzellen beschreibt (Carthagena, Bergamaschi et al. 2009), würde jedoch im Sinne einer ubiquitären Expression die Hypothese einer Rolle von TRIM9 im angeborenen Immunsystem unterstützen. Auch konnte TRIM9 mit gleicher Methodik in allen lysierten Organen einer Maus detektiert werden, wobei hier einzig im Gehirn keine Bande bei 65 kDa zu detektieren war. Stattdessen fiel dort und zusätzlich in einigen anderen Organen eine zweite Bande bei etwa 55 kDa auf, (siehe Abschnitt 3.3.2.). Dies deutet auf die Expression verschiedener Isoformen in vivo hin.

Die Darstellung der intrazelluläre Lokalisation von endogenem TRIM9 gelang methodisch im Rahmen dieser Arbeit nicht. Es wurde jedoch mittels konfokaler Mikroskopie und Immunfluoreszenz die intrazellulären Verteilungsmuster von überexprimiertem TRIM9-GFP und TRIM9-HA beobachtet. Hierbei zeigten sich zwei verschiedene Muster, einerseits kugelige zytoplasmatische Einschlusskörperchen, andererseits tubuläre Strukturen ähnlich der Verteilung von Mikrotubuli (siehe Abschnitt 3.4.1.). Diese beiden Zustände schienen ineinander überzugehen, weshalb die Lokalisation von überexprimiertem TRIM9-GFP außerdem im *live-cell-imaging* über mehrere Stunden beobachtet wurde. Hier gelang die Darstellung des Übergangs aus den beschriebenen kugeligen Strukturen in die länglichen tubulären Strukturen (siehe Abschnitt 3.4.2.). Außerdem konnte ebendiese Umverteilung im Rahmen einer Zellteilung beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.4.2.), sodass eine zellzyklusabhängige Relokalisation und eventuell eine Assoziation mit dem Zytoskelett zu den Eigenschaften von TRIM9 zu gehören scheinen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. TRIM9 – immunstimulatorisches oder immunsuppressives Protein?

Grundhypothese dieser Arbeit ist der mögliche Einfluss des Expressionsniveaus von TRIM9 auf die angeborene, antivirale Immunität und den RLH-Signalweg. Diese geht auf eine Assoziationsstudie zurück, die einen SNP der 3'UTR von TRIM9 mit einer unterschiedlichen Spontanausheilungsrate bei HCV-Infektionen korrelieren konnte (siehe Abschnitt 1.2.3.). In den letzten Jahren wurde für zahlreiche TRIM-Proteine eine Rolle in der antiviralen Immunität beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.2.). Die zu Beginn dieser Arbeit verfügbaren Daten, legten auch für TRIM9 eine immunstimulatorische Funktion im Signalweg der RLHs nahe (siehe Abschnitt 1.3.3.).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen sowohl in einem transienten *knock-down*-Modell, als auch in einem transienten Überexpressionsmodell auf eine immunstimulatorische und somit am ehesten antivirale Funktion von TRIM9 hin (siehe Abschnitte 3.1. und 3.2.).

Aktuelle Publikationen¹ lassen inzwischen eine modulierende Rolle von TRIM9, zwischen der Inhibition einer antiviralen Immunantwort durch verminderte Aktivierung von NF- κ B und der Förderung einer antiviralen Immunantwort durch Phosphorylierung von IRF3, vermuten (Shi, Cho et al. 2014, Qin, Liu et al. 2016). Diese beiden Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Expression zahlreicher Zytokine sehr differenziert. Die Promotorregion von Interferon- β weist Bindungsstellen für beide Transkriptionsfaktoren auf. Folglich wären Effekte von TRIM9 auf die Interferon-abhängige Immunantwort zu erwarten.

Shi et al. konnte ein gesteigertes Aktivitätsniveau von NF- κ B bei Verlust von TRIM9 zeigen (Shi, Cho et al. 2014). NF- κ B und seine Familie regulieren als Transkriptionsfaktoren zahlreiche unterschiedliche Gene, deren Genprodukte in der Immunantwort, beispielsweise als Zytokine oder Immunrezeptoren, eine Rolle spielen (Ghosh, May et al. 1998), aber auch anti-apoptotische oder proliferative Wirkungen vermitteln (Karin, Cao et al. 2002). In dieser Arbeit wurde das Expressionsniveau von NF- κ B nach *knock-down* von TRIM9 leider nicht untersucht. Sowohl IFN- β (Cohen, Lacoste et al. 1991, Garoufalis, Kwan et al. 1994) als auch IP-10 (Ohmori and Hamilton 1995), werden aber durch Aktivierung von NF- κ B induziert. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen also, wenn man von einem direkten Effekt von TRIM9 auf die Aktivierung von NF- κ B ausgeht, in Widerspruch zu den von Shi et al. erhobenen Daten.

¹Seit Fertigstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit im März 2014, erschienen weitere Publikationen über TRIM9. In dieser Diskussion finden die relevantesten Arbeiten bis zum Jahr 2017 Berücksichtigung.

Beide Arbeiten sind unter Einsatz von transienten *knock-down*- und Überexpressionsmodellen entstanden, bei Shi et al. kamen jedoch direkte Stimulantien des NF-κB-Signalwegs in HEK293-Zellen zum Einsatz, eine Virusinfektion wurde nicht untersucht. Auch lässt sich bei IFN-β und IP-10 als *read-out* auch durch andere Einflüsse, nicht mit Sicherheit von einer gleichsinnigen Expression mit NF-κB in jedem Setting ausgehen. Letztlich ist somit nur eine begrenzte Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben.

Kürzlich wurde in einer Publikation von Qin et al. erstmals deutlich, dass unterschiedliche Isoformen von TRIM9 relevante funktionelle Unterschiede bedingen (Qin, Liu et al. 2016). Die längere Isoform (TRIM9I) entspricht mit einer Länge von 710 Aminosäuren dem in Abschnitt 1.3.3. beschriebenen Protein, die kürzere Isoform (TRIM9s) entsteht nach Spleißen, ist nur 550 Aminosäuren lang und besitzt keine PRY/SPRY-Domäne. TRIM9s wurde von Qin et al. als immunstimulatorisches Protein mit antiviraler Wirkung beschrieben, während die lange Isoform keinen Einfluss auf eine Virusinfektion zu haben schien (Qin, Liu et al. 2016). Auch hier erfolgte eine transiente Überexpression von TRIM9s und TRIM9I, sowie ein knock-down mit Isoform-spezifischen siRNAs. Nach knock-down von TRIM9s in HEK293-Zellen konnte eine deutlich erhöhte Virusreplikation nachgewiesen werden, umgekehrt bei Überexpression eine deutlich verminderte. Dieser Effekt konnte in stabilen knock-out-Zellen bestätigt werden. Ebenso konnte eine Induktion von Interferon-β durch TRIM9s und nach Überexpression von TRIM9s eine deutliche Induktion des ISRE-Promotors in Reporter-assays durch gesteigerte Phosphorylierung von IRF3 gezeigt werden. Im Falle von TRIM9I zeigte ein knock-down keinen Effekt auf die Virusreplikation, eine Überexpression nur in hohen Dosen einen reduzierenden Effekt (Qin, Liu et al. 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte, konsistent mit Qin et al. bei erhöhter Expression von TRIM9 eine Steigerung der Expression von RIG-I, Interferon-β und IP-10 gezeigt werden (Qin, Liu et al. 2016). Nach *knock-down* von TRIM9 zeigte sich deren Expression sowohl nach Stimulation mit synthetischen Liganden, als auch nach Virusinfektion deutlich verringert (siehe Abschnitt 3.1.2. und 3.1.3.). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass Qin et al. den besagten Effekt nur für die kurze Isoform von TRIM9 beschrieben hat, während in dieser Arbeit Isoform-unspezifische siRNAs zum Einsatz kamen. Auch die Ergebnisse des Reporter-*assays* mit verstärkter Aktivierung des ISRE-Promotorelements durch Überexpression von TRIM9 nach Vorstimulation mit RIG-I oder IRF3 konnte kongruent zu Qin et al. gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.2.3.).

Bezüglich der Expression von TRIM9 in unterschiedlichen Zellarten und Gewebe, zeigte Qin et al. ebenfalls mit dieser Arbeit übereinstimmende Daten. So konnte mit TRIM9s- und TRIM9Ispezifischen Antikörpern der Firma Proteintech und Origene in verschiedenen Zelllinien und humanem Gewebe TRIM9 nachweisen (Qin, Liu et al. 2016). Dies unterstützt die hier erhobenen Daten (siehe Abschnitt 3.3.) und die postulierte ubiquitäre Expression.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, auf Zytokinebene vereinbar sind mit einer immunstimulatorischen Wirkung von TRIM9 nach Aktivierung des RLH-Signalwegs. Diese Ergebnisse zeigen sich durch die Daten von Qin et al. gestützt, widersprechen aber auch nicht der durch Shi et al. postulierten Gegenregulation über NF-kB. Möglich scheint, dass TRIM9 auf Ebene der beiden Transkriptionsfaktoren eine regulierende Funktion mit Beeinflussung der angeborenen Immunität in Richtung eines eher NF-kB-assoziierten Zytokin-Expressionsmusters IRF3oder einnimmt, was eine unterschiedliche immunologische Reaktion der Zelle auch in Hinblick auf Metabolismus und Apoptose zur Folge hätte. Möglich ist auch eine unterschiedliche Regulation durch TRIM9 in unterschiedlichen Zellarten, je nachdem, ob in diesen Zellen eher der IRF-Signalweg oder der NF-kB-Signalweg eine dominantere Rolle einnimmt.

4.2.2. TRIM9 – provirale oder antivirale Wirkung?

Die erhobenen Daten dieser Arbeit weisen nun sowohl in einem transienten *knock-down*-Modell, als auch in einem transienten Überexpressionsmodell auf eine immunstimulatorische und somit am ehesten antivirale Funktion von TRIM9 hin (siehe Abschnitte 3.1. und 3.2.). Im Gegensatz dazu steht jedoch die Auswertung der Virusreplikation nach *knock-down* von TRIM9, welche sich hier verringert zeigt und somit eher eine provirale Funktion nahe legen würde (siehe Abschnitt 3.1.4.). Eine andere Erklärung wäre ein vorgeschalteter Mechanismus, der im Falle einer verringerten TRIM9-Expression über eine Verringerung der Virusreplikation eine verringerte Immunantwort bewirkt. Da dann jedoch die Ergebnisse der Stimulationsexperimente mit synthetischen Liganden hierzu im Gegensatz stehen würden, muss auch eine differenzierte modulierende Rolle mit verschiedenen Effekten diskutiert werden.

Die Virusreplikation kann intrazellulär durch direkte Restriktionsfaktoren inhibiert, oder auch über viral induzierte Faktoren in der Wirtszelle gefördert werden. Für einige TRIM-Proteine wurden bereits Funktionen im Zusammenhang mit viraler Replikation beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.2.). Der virale Replikationszyklus wird allerdings durch eine Vielzahl von Faktoren beeinfluss, darunter die Immunantwort, der Stoffwechsel der Wirtszelle oder auch Änderungen von Membraneigenschaften, welche bei der endozytotischen Aufnahme oder der Freisetzung neu gebildeter Virionen eine Rolle spielen (Wesolowski and Paumet 2010, González Plaza, Hulak et al. 2016). Außerdem bestünde vor dem Hintergrund der E3-Ubiquitinligase-Aktivität von TRIM9, die Möglichkeit einer indirekten Wirkung über Ubiquitinierung und Degradierung anderer Proteine.
In dieser Arbeit konnte sowohl für alle verwendeten Viren, bei verringertem Expressionsniveau von TRIM9 eine verringerte Virusreplikation gezeigt werden (siehe Abschnitt 3.1.4.). Gleichzeitig war in diesem Setting die Produktion von Zytokinen supprimiert (siehe Abschnitt 3.1.3.). Dies würde eher darauf hinweisen, dass die verminderte Immunantwort im Rahmen einer verminderten TRIM9-Expression nach Virusinfektion, sekundär auf eine verminderte Aktivierung der immunstimulatorischen Signalwege zurückzuführen ist. Dies könnte durch eine inhibierte Virusreplikation und so insgesamt reduzierte PAMP-Exposition zustande kommt.

Unter diesem Gesichtspunkt kommen als Ursache der veränderten Virusreplikation, auch Einflüsse von TRIM9 auf metabolische Funktionen oder den Zellzyklus der Wirtszellen in Frage. Lichtmikroskopisch zeigten sich hinsichtlich Wachstumsverhalten und Zellmorphologie keine eindeutigen Unterschiede zwischen Zellen mit niedrigerem TRIM9-Expressionsniveau nach *knock-down* und untransfizierten Zellen. Allerdings zeigten Zellen mit überexprimiertem TRIM9, bei höheren Konzentrationen eine erhöhte Zellsterblichkeit. Ein Einfluss von TRIM9 auf den Zellzyklus scheint insbesondere unter Berücksichtigung der beobachteten zellzyklusabhängigen intrazellulären Relokalisation von TRIM9 (siehe Abschnitt 3.4.2.) eine interessante Hypothese. Es wurden deshalb in der Arbeitsgruppe weitere Experimente mit Synchronisation und Unterbrechung des Zellzyklus vorgenommen¹. Ebenso wurde eine mögliche direkte Interaktion von TRIM9 mit Viruspartikeln mittels Überexpression von TRIM9-m-cherry und Infektion mit VSV-GFP untersucht².

Aktuelle Publikationen³ zeigen eine Rolle von TRIM9 bei der SNARE-Komplex-abhängigen Exozytose und eine Affektion dieser bei reduzierter Expression (Winkle, McClain et al. 2014). Ebenso ist kürzlich ein gesteigertes Aktivitätsniveau von NF-κB bei Verlust von TRIM9 beschrieben worden (Shi, Cho et al. 2014).

NF-κB und seine Familie regulieren als Transkriptionsfaktoren zahlreiche unterschiedliche Gene, deren Genprodukte in der Immunantwort, beispielsweise als Zytokine oder Immunrezeptoren, eine Rolle spielen (Ghosh, May et al. 1998), aber auch anti-apoptotische oder proliferative Wirkungen vermitteln (Inoue, Gohda et al. 2007). Die Aktivität von NF-κB nach Eindringen von Viren hat somit während der Infektion entgegengesetzte Wirkungen. Einerseits wird die antivirale Immunantwort durch NF-κB aktiviert, andererseits werden durch proliferative und anti-apoptotische Effekte die Wirtszellen am Untergang gehindert, wodurch der Virus die Wirtszelle länger zur Replikation nutzen kann (Hiscott, Kwon et al. 2001).

¹ Diese Versuche wurden von Dharmendra Pandey durchgeführt und sind bisher unveröffentlicht.

² Diese Versuche sind Teil der Promotion von Johannes Rückel.

³ Seit Fertigstellung des experimentellen Teils dieser Arbeit im März 2014, erschienen weitere Publikationen über

TRIM9. In dieser Diskussion finden die relevantesten Arbeiten bis zum Jahr 2017 Berücksichtigung.

Die verzögerte Apoptose trägt zwar einerseits zur Virusreplikation bei, verhindert jedoch auch die hierdurch normalerweise erfolgende Freisetzung von neu produzierten Viren und reduziert somit deren Ausbreitung. Ob eine Aktivierung von NF-kB von Vor- oder Nachteil für die virale Replikation ist, kann nicht sicher vorhergesagt werden.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsniveau von NF-kB nach knock-down von TRIM9 nicht untersucht. Sowohl IFN-β (Cohen, Lacoste et al. 1991, Garoufalis, Kwan et al. 1994), als auch IP-10 (Ohmori and Hamilton 1995), werden, wie bereits oben beschrieben, durch Aktivierung von NF-kB induziert. Die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen also, wenn man von einem direkten Einfluss von TRIM9 auf NF-κB ausgeht, in Widerspruch zu den von Shi et al. erhobenen Daten. Beide Arbeiten sind unter Einsatz von transienten knock-down- und Uberexpressionsmodellen entstanden, bei Shi et al. kamen jedoch direkte Stimulantien des NF-kB-Signalwegs in HEK293-Zellen zum Einsatz, eine Virusinfektion wurde nicht untersucht. Sicherheit von einer gleichsinnigen Expression mit NF-kB in jedem Setting ausgehen. Letztlich ist somit nur eine begrenzte Vergleichbarkeit der Ergebnisse gegeben. Es bleibt jedoch auch die Möglichkeit einer gesteigerten Basalaktivität von NF-kB durch fehlendes TRIM9 vor der Virusinfektion, welche dann die Virusreplikation innerhalb der 24 Stunden dauernden Infektion beeinflusst und durch Reduktion der Virusfreisetzung letztlich zu einer geringeren PAMP-Exposition und dadurch wiederum zu der in dieser Arbeit beobachteten reduzierten Induktion von Zytokinen führt.

Auch ist weiterhin denkbar, dass TRIM9 sowohl eine reduzierte Virusreplikation mit nachfolgend reduzierter Immunantwort, als auch denselben Effekt bei Einbringen von synthetischen Stimulantien durch Lipofektion, durch die Beeinflussung endozytotischer und exozytotischer Prozesse an der Zellmembran vermittelt (Winkle, McClain et al. 2014).

Wie bereits oben beschrieben, zeigte Qin et al. vor kurzem erstmals, dass unterschiedliche Isoformen von TRIM9 relevante funktionelle Unterschiede bedingen (Qin, Liu et al. 2016). TRIM9s wurde hier eine antivirale Funktion zugeschrieben, wohingegen TRIM9I keinen Einfluss auf die Virusinfektion zu haben schien (Qin, Liu et al. 2016). Es erfolgte eine transiente Überexpression von TRIM9s und TRIM9I, sowie ein *knock-down* mit Isoform-spezifischen siRNAs. Nach *knock-down* von TRIM9s in HEK293-Zellen konnte eine deutlich erhöhte Virusreplikation nachgewiesen werden, umgekehrt bei Überexpression eine deutlich verminderte. Dieser Effekt konnte in stabilen *knock-out*-Zellen bestätigt werden. Ebenso konnte eine Induktion von Interferon- β durch TRIM9s und nach Überexpression von TRIM9s eine deutliche Induktion des ISRE-Promotors in Reporter-*assays* durch gesteigerte Phosphorylierung von IRF3 gezeigt werden. Im Falle von TRIM9I zeigte ein *knock-down*

keinen Effekt auf die Virusreplikation, eine Überexpression nur in hohen Dosen einen reduzierenden Effekt (Qin, Liu et al. 2016).

Die in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs sind nicht Isoform-spezifisch und führen somit zu einem knock-down beider Isoformen, weshalb eine differenzierte Betrachtung Isoformspezifischer Effekte unmöglich ist. Die eingesetzten Überexpressionsplasmide kodieren beide für TRIM9I, ob hier im Anschluss im Rahmen von Spleißvorgängen auch TRIM9s exprimiert wurde, ist nicht zu differenzieren. Diese fehlende Differenzierung könnte jedoch ein Erklärungsansatz für die Diskrepanzen der erhobenen Ergebnisse bieten. Die in dieser Arbeit beobachteten Effekte auf die Änderung der Induktion von Zytokinen nach Stimulation oder Virusinfektion und auch die Induktion des ISRE-Reporterplasmids sind kongruent mit den von Qin et al. bezüglich TRIM9s erhobenen Daten und schreiben TRIM9 eine immunstimulatorische Wirkung zu. Einzig der beobachtete Effekt auf die Virusreplikation zeigt hier eine deutliche Diskrepanz. Da die Daten von Qin et al. auch in stabilen knock-out-Zellen bestand hatten, scheint der Effekt glaubwürdig. Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz mit den hier erhobenen Ergebnissen ist ein nicht berücksichtigter Effekt durch das gleichzeitige oder Überexprimieren Wegfallen beider Isoformen auf unterschiedlichen nicht nachzuvollziehenden Niveaus, die möglicherweise im physiologischen Setting eine entgegengesetzte antivirale und provirale Wirkung vermitteln und differenziert reguliert werden.

Zusammenfassend ist nach Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext der aktuellen Literatur, im Hinblick auf eine potenzielle antivirale oder provirale Wirkung von TRIM9 keine klare Aussage zu treffen. In dieser Arbeit konnte nach *knock-down* beider Isoformen eine reduzierte virale Replikation von (-)ssRNA- und (+)ssRNA-Viren, bei ebenfalls reduzierter Induktion von antiviralen Zytokinen demonstriert werden. Unter Berücksichtigung aller hier diskutierter Daten, wäre ein differenziert regulierender Effekt auf den Stoffwechsel oder den Zellzyklus der Wirtszelle als Wirkmechanismus, möglicherweise durch verschiedene Isoformen von TRIM9, denkbar. Hier scheint vor dem Hintergrund der beobachteten zellzyklusabhängigen Relokalisation von TRIM9 insbesondere der Zellzyklus, sowie vor dem Hintergrund des publizierten Einflusses auf die Endo- und Exozytose, auch der Membranstoffwechsel besonders interessant (Winkle, McClain et al. 2014).

4.2.3. Kritische Betrachtung der Methodik

Alle hier erhobenen Daten sind berechtigter Gegenstand der durch die Methodik begründeten Zweifel. Transiente *knock-down-* und Überexpressionsmodelle sind insbesondere bei der Betrachtung immunologischer Prozesse stets kritisch zu betrachten, da eine Grundaktivierung der zelleigenen Abwehr durch Transfektion zellfremder RNA oder DNA, auch unter Einbeziehung adäquater Kontrollen, nie gänzlich ausgeschlossen werden kann. Deshalb wurde schon im Rahmen dieser Arbeit mit der Etablierung stabiler *knock-out*-Zelllinien mittels CRISPR/Cas9-Geneditierung begonnen.

Die Beschränkung auf eine Zelllinie ist ebenfalls kritisch zu betrachten, da immunologische Prozesse in unterschiedlichen Zellarten oft differenziert reguliert sind. Auch deshalb wurden verschiedene *knock-out*-Zelllinien erstellt, unter anderem auch eine Leberzelllinie Huh 7.5, da dies in Hinblick auf die initiale Grundhypothese im Rahmen einer HCV-Infektion die interessanteste Zelllinie zu sein schien. Diese kam hier in den transienten Experimenten nicht zum Einsatz, da sie sehr langsam wächst und sich schlecht transfizieren lässt, was für ein transientes Modell suboptimale Voraussetzungen sind.

Weder der *knock-down*- noch die Überexpression erfolgten hier Isoform-spezifisch, da zu Beginn dieser Arbeit noch keine unterschiedlichen Isoformen von TRIM9 beschrieben und charakterisiert waren, weshalb die beobachteten Effekte immer unter Berücksichtigung einer möglichen Isoform-spezifischen differentiellen Regulierung betrachtet werden müssen.

Auch sind die Ergebnisse, die durch Einsatz des TRIM9-spezifischen Antikörpers der Firma Abcam zur Detektion der Expression von endogenem TRIM9 erhoben wurden (siehe Abschnitt 3.3.) kritisch zu betrachten. Der Antikörper wurde bis dato in keiner Publikation verwendet. Antikörper Publikationen Verwendung anderer unter sehen deutlich andere Expressionsmuster, insbesondere gelingt hier die Darstellung von TRIM9 auf Höhe der errechneten Proteingröße bei 79 kDa für TRIM9I und 65 kDa für TRIM9s (Qin, Liu et al. 2016). Es bleibt zu vermuten, dass die hier detektierte TRIM9-Bande lediglich TRIM9s repräsentiert, und die noch kürzere Bande in den Mausorganen entweder ein unspezifisches Nebenprodukt oder eine mausspezifische noch kürzere Isoform darstellt (siehe Abschnitt 3.3.2.). In weiteren Versuchen wurde auch deshalb entweder der in der Immunfluoreszenz zuverlässig TRIM9detektierende Antikörper der Firma Novus angewendet oder der auch bei Qin et al. verwendete Antikörper der Firma Proteintech.

4.3. Ausblick

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten unterstützen die postulierte Grundhypothese, dass TRIM9 eine Rolle in der antiviralen Immunantwort spielt. Sicher ist deshalb eine weitere Betrachtung dieses Proteins im immunologischen Kontext interessant und relevant. Weiterführende Arbeiten werden zeigen, ob sich die hier erhobenen Ergebnisse in stabilen loss- und gain of function Modellen bestätigen, oder sich eine eindeutigere Aussage bezüglich der anti- oder proviralen Wirkung von TRIM9 treffen lässt. Sollte dies der Fall sein, könnte in stabilen knock-out- und Überexpressions-Modellen auch eine genauere Betrachtung der molekularen Wirkungsmechanismen und möglicher Interaktionspartner von TRIM9 erfolgen. Nach den diskutierten Hypothesen, wäre beispielsweise die Betrachtung von Ubiquitinierungsoder Phosphorylierungsprozessen, sowie die mögliche Interaktion mit Komponenten der Zellmembran, des Zytoskeletts oder auch mögliche direkte Interaktion mit Viruspartikeln von Interesse. Die Relevanz der zellzyklusabhängigen Relokalisation könnte in stabilen Überexpressionsmodellen ebenfalls noch einmal evaluiert werden. Auch könnten die relevanten an Interaktionen beteiligten Proteindomänen von TRIM9 durch Deletionsmutanten identifiziert und so Rückschlüsse auf die relevanten Wirkungsmechanismen gezogen werden. Nach hier diskutierter Literatur wäre dabei eine getrennte Betrachtung der verschiedenen TRIM9-Isoformen anzustreben. Auch eine Betrachtung in Mausmodellen könnte, trotz der relevanten Unterschiede zwischen humanem und murinem Organismus, erfolgen um die gewonnenen Erkenntnisse in einem komplexeren Modell in vivo zu evaluieren.

4.4. Relevanzbeurteilung

Der in dieser Arbeit beleuchteten Fragestellung kann in verschiedenen Aspekten eine potenzielle klinische Relevanz zugesprochen werden. Einerseits konnte hier die Hypothese, dass TRIM9 eine Rolle in der antiviralen Immunität zu spielen scheint, bestätigt werden, womit die Relevanz der Assoziation genetischer Polymorphismen in TRIM9 mit dem Verlauf einer viralen Infektion gestützt wird. Dies eröffnet wissenschaftlich weitere Möglichkeiten der Identifizierung interessanter Zielstrukturen.

Außerdem wäre dieser Polymorphismus gegebenenfalls aufgrund seines prädiktiven Nutzens im Rahmen einer HCV-Infektion von Interesse, insbesondere im Kontext personalisierter Medizin und individueller Risikoabschätzung. Inzwischen stehen zur Therapie der HCV-Infektion zwar sehr effektive Medikamente zur Verfügung, diese sind aufgrund der teils noch hohen Preise jedoch nicht in jeder Region auf der Welt leicht verfügbar oder unbegrenzt vorhanden. Hier könnte eine vorherige genauere Identifizierung von Risikopatienten eine bessere Allokation von begrenzten Ressourcen ermöglichen.

Des Weiteren ist ein neues Protein, dass in immunologischen Signalwegen eine Rolle spielt, immer auch als potenzielle therapeutische Zielstruktur neuer Medikamente zu werten. Nach genauerer Charakterisierung und Identifizierung der Interaktionspartner und der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, böten sich im Rahmen viraler Erkrankungen, bei denen häufig ein gezielter therapeutischer Ansatz fehlt, neue Möglichkeiten. Ob hier TRIM9 selbst als mögliche Zielstruktur in Frage kommt, muss zunächst in weiteren Studien evaluiert werden. Nicht nur in der antiviralen Therapie sind jedoch neue Ansätze von Interesse. Als Immunmodulator, könnte TRIM9 sowie etwaige Effektorproteine auch als therapeutische Zielstruktur im Rahmen von Autoimmunprozessen oder Krebserkrankungen genutzt werden.

5. Zusammenfassung

Einleitung – Die E3-Ubiquitinligase *Tripartite-motif*-Protein 9 (TRIM9) ist Teil der TRIM-Proteinfamilie, für deren über 70 Mitglieder zuletzt verschiedenste Funktionen in der angeborenen Immunität beschrieben wurden. Eine genomweite Assoziationsstudie einer Kooperationsgruppe konnte einen Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) in der 3'untranslatierten Region (3'-UTR) von TRIM9 mit unterschiedlichen spontanen Ausheilungsraten einer Hepatitis-C-Virus (HCV)-Infektion (HCV) in Verbindung bringen. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss unterschiedlicher Expressionsniveaus von TRIM9 auf die antivirale Immunität untersucht, sowie die Expressions- und Verteilungsmuster von TRIM9 näher charakterisiert.

Methodik – Unterschiedliche Expressionsniveaus von TRIM9 wurden durch siRNAvermittelten *knock-down* und transiente Überexpression durch Transfektion von Expressionsplasmiden in humanen Zellinien erreicht. Um einen Einfluss auf die antivirale Immunität zu untersuchen erfolgte dann die Stimulation des *Rig-I-like*-Helikasen (RLH)-Signalwegs mit synthetischen Liganden, sowie (+)ssRNA- und (-)ssRNA-Viren. Untersucht wurden anschließend die Expressionslevel von Effektorproteinen dieses Signalwegs auf mRNA Ebene mittels qRT-PCR, Luciferase-reporter assay, sowie auf Proteinebene mittels ELISA und *western-blot*. Die Expressionsniveaus von TRIM9 in unterschiedlichen Zelllinien und Mausorganen wurden mittels *western-blot* analysiert. Die intrazelluläre Verteilung von überexprimiertem GFP- oder HA-markiertem TRIM9 wurde mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Mikroskopie, sowie *live-cell-imaging* beobachtet.

Ergebnisse – Nach *knock-down* von TRIM9 konnte sowohl nach Stimulation mit den synthetischen Liganden pI:C und 5'ppp-RNA, als auch nach Virusinfektion mit *Vesicular-stomatitis*-Virus (VSV), VSV mit Mutation in M51R (VSV M51R), Sendai-Virus (SeV) und *Semliki-forest*-Virus (SFV) eine reduzierte Expression von RIG-I und IFN-β auf mRNA-Ebene, sowie IP-10 auf Proteinebene gezeigt werden. Nach Überexpression konnte nach Stimulation mit pI:C ein leichter Effekt in die entgegengesetzte Richtung beobachtet werden. Außerdem ließ sich ein ISRE-Reporterplasmid im Luciferase-assay durch TRIM9 dosisabhängig aktivieren. Nach *knock-down* von TRIM9 zeigte sich für VSV jedoch auch eine verringerte Virusreplikation. Es ließ sich in allen untersuchten Zelllinien und Mausorganen eine Expression von TRIM9 nachweisen, was für eine ubiquitäre Expression spricht, auch wenn sich in der Stärke der Expression und Isoformnutzung deutliche Unterschiede zeigten. Intrazellulär zeigten sich unterschiedliche Verteilungsmuster, welche zellzyklusabhängig ineinander überzugehen schienen.

Schlussfolgerung und Ausblick – Nach den hier erhobenen Ergebnissen, scheint TRIM9 in Signalwegen der antiviralen Immunität eine Rolle zu spielen. Die verringerte Expression von antiviralen Effektorproteinen nach *knock-down* spricht für einen immunstimulatorischen und somit eher antiviralen Effekt von TRIM9. Dem gegenüber steht die verringerte Virusreplikation nach *knock-down*, die eher für einen proviralen Effekt sprechen würde. Möglich scheint hier im Kontext der aktuellen Literatur auch eine immunmodulierende Rolle mit Isoform-spezifischen proviralen und antiviralen Effekten auf den Interferon- und NFκB-Signalweg. Um die Wirkungsweise und potenzielle Interaktionspartner von TRIM9 genauer zu charakterisieren sind jedoch weiterführende Untersuchungen notwendig.

6. Literaturverzeichnis

Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." <u>Cell</u> **124**(4): 783-801.

Asaoka, K., K. Ikeda, T. Hishinuma, K. Horie-Inoue, S. Takeda and S. Inoue (2005). "A retrovirus restriction factor TRIM5alpha is transcriptionally regulated by interferons." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **338**(4): 1950-1956.

Baltimore, D. (1971). "Expression of animal virus genomes." Bacteriol Rev 35(3): 235-241.

Barr, S. D., J. R. Smiley and F. D. Bushman (2008). "The interferon response inhibits HIV particle production by induction of TRIM22." <u>PLoS Pathog</u> **4**(2): e1000007.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." <u>Cell</u> **116**(2): 281-297.

Baxter, V. K. and M. T. Heise (2020). Chapter Nine - Immunopathogenesis of alphaviruses. <u>Advances</u> in Virus Research. J. P. Carr and M. J. Roossinck, Academic Press. **107**: 315-382.

Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond and G. J. Hannon (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." <u>Nature</u> **409**(6818): 363-366.

Berti, C., S. Messali, A. Ballabio, A. Reymond and G. Meroni (2002). "TRIM9 is specifically expressed in the embryonic and adult nervous system." <u>Mech Dev</u> **113**(2): 159-162.

Carrero, J. A. (2013). "Confounding roles for type I interferons during bacterial and viral pathogenesis." Int Immunol **25**(12): 663-669.

Carthagena, L., A. Bergamaschi, J. M. Luna, A. David, P. D. Uchil, F. Margottin-Goguet, W. Mothes, U. Hazan, C. Transy, G. Pancino and S. Nisole (2009). "Human TRIM gene expression in response to interferons." <u>PLoS One</u> **4**(3): e4894.

Cassano, A., S. Rasmussen and F. R. Wolf (2012). Chapter 31 - Viral Diseases. <u>The Laboratory Rabbit</u>, <u>Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents</u>. M. A. Suckow, K. A. Stevens and R. P. Wilson. Boston, Academic Press: 821-837.

Chow, K. T., M. Gale, Jr. and Y. M. Loo (2018). "RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity." <u>Annu Rev Immunol</u> **36**: 667-694.

Cohen, L., J. Lacoste, M. Parniak, L. Daigneault, D. Skup and J. Hiscott (1991). "Stimulation of interferon beta gene transcription in vitro by purified NF-kappa B and a novel TH protein." <u>Cell Growth Differ</u> **2**(7): 323-333.

Cuchet, D., A. Sykes, A. Nicolas, A. Orr, J. Murray, H. Sirma, J. Heeren, A. Bartelt and R. D. Everett (2011). "PML isoforms I and II participate in PML-dependent restriction of HSV-1 replication." <u>J Cell Sci</u> **124**(Pt 2): 280-291.

D'Cruz, A. A., J. J. Babon, R. S. Norton, N. A. Nicola and S. E. Nicholson (2013). "Structure and function of the SPRY/B30.2 domain proteins involved in innate immunity." <u>Protein Sci</u> **22**(1): 1-10.

da Silva Conde, S. R., J. C. Soares Monteiro, B. T. Silva Dos Santos, N. K. Fonseca Filgueiras, P. A. de Almeida Lins, F. Bonfim Freitas, E. da Silva Graça, S. Demachki, M. T. Ferreira de Araújo, R. Ishak and A. C. Rosário Vallinoto (2014). "SNP rs8099917 in gene IL28B might be associated with risk of chronic infection by HCV but not with response to treatment." <u>Biomed Res Int</u> **2014**: 748606.

Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr and G. R. Stark (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." <u>Science</u> **264**(5164): 1415-1421.

Davis, M. E. and M. U. Gack (2015). "Ubiquitination in the antiviral immune response." <u>Virology</u> **479-480**: 52-65.

Diaz-Griffero, F., X. Li, H. Javanbakht, B. Song, S. Welikala, M. Stremlau and J. Sodroski (2006). "Rapid turnover and polyubiquitylation of the retroviral restriction factor TRIM5." <u>Virology</u> **349**(2): 300-315.

Ding, Q., X. Cao, J. Lu, B. Huang, Y.-J. Liu, N. Kato, H.-B. Shu and J. Zhong (2013). "Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of STING and TBK1 to evade host innate immunity." <u>Journal of Hepatology</u> **59**(1): 52-58.

El Awady, M. K., N. G. Bader El Din, A. Tabll, Y. El Hosary, A. O. Abdel Aziz, H. El Khayat, M. Salama and T. H. Abdelhafez (2013). "IL28B polymorphism and cytomegalovirus predict response to treatment in Egyptian HCV type 4 patients." <u>World J Gastroenterol</u> **19**(2): 290-298.

Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." <u>Nature **411**(6836): 494-498.</u>

Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel and T. Tuschl (2001). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate." <u>The EMBO journal</u> **20**(23): 6877-6888.

Gack, M. U., A. Kirchhofer, Y. C. Shin, K. S. Inn, C. Liang, S. Cui, S. Myong, T. Ha, K. P. Hopfner and J. U. Jung (2008). "Roles of RIG-I N-terminal tandem CARD and splice variant in TRIM25-mediated antiviral signal transduction." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(43): 16743-16748.

Gack, M. U., Y. C. Shin, C. H. Joo, T. Urano, C. Liang, L. Sun, O. Takeuchi, S. Akira, Z. Chen, S. Inoue and J. U. Jung (2007). "TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity." <u>Nature</u> **446**(7138): 916-920.

Garoufalis, E., I. Kwan, R. Lin, A. Mustafa, N. Pepin, A. Roulston, J. Lacoste and J. Hiscott (1994). "Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors." J Virol **68**(8): 4707-4715.

Génin, P., P. Morin and A. Civas (2003). "Impairment of interferon-induced IRF-7 gene expression due to inhibition of ISGF3 formation by trichostatin A." <u>J Virol</u> **77**(12): 7113-7119.

Ghosh, S., M. J. May and E. B. Kopp (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." <u>Annu Rev Immunol</u> **16**: 225-260.

González Plaza, J. J., N. Hulak, G. Kausova, Z. Zhumadilov and A. Akilzhanova (2016). "Role of metabolism during viral infections, and crosstalk with the innate immune system." <u>Intractable & rare diseases research</u> **5**(2): 90-96.

Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko and V. M. Blinov (1988). "A novel superfamily of nucleoside triphosphate-binding motif containing proteins which are probably involved in duplex unwinding in DNA and RNA replication and recombination." <u>FEBS Lett</u> **235**(1-2): 16-24.

Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko and V. M. Blinov (1989). "Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes." <u>Nucleic Acids Res</u> **17**(12): 4713-4730.

Goubau, D., S. Deddouche and C. Reis e Sousa (2013). "Cytosolic sensing of viruses." <u>Immunity</u> **38**(5): 855-869.

Grakoui, A., D. W. McCourt, C. Wychowski, S. M. Feinstone and C. M. Rice (1993). "A second hepatitis C virus-encoded proteinase." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **90**(22): 10583-10587.

Grakoui, A., C. Wychowski, C. Lin, S. M. Feinstone and C. M. Rice (1993). "Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products." <u>J Virol</u> **67**(3): 1385-1395.

Grebely, J., J. D. Raffa, C. Lai, M. Krajden, B. Conway and M. W. Tyndall (2007). "Factors associated with spontaneous clearance of hepatitis C virus among illicit drug users." <u>Can J Gastroenterol</u> **21**(7): 447-451.

Haasnoot, J., E. M. Westerhout and B. Berkhout (2007). "RNA interference against viruses: strike and counterstrike." <u>Nat Biotechnol</u> **25**(12): 1435-1443.

Hammond, S. M., E. Bernstein, D. Beach and G. J. Hannon (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells." <u>Nature</u> **404**(6775): 293-296.

Hao, J. C., C. E. Adler, L. Mebane, F. B. Gertler, C. I. Bargmann and M. Tessier-Lavigne (2010). "The tripartite motif protein MADD-2 functions with the receptor UNC-40 (DCC) in Netrin-mediated axon attraction and branching." <u>Dev Cell</u> **18**(6): 950-960.

He, L. and G. J. Hannon (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." <u>Nat Rev</u> <u>Genet</u> **5**(7): 522-531.

Hierholzer, J. C. and R. A. Killington (1996). "Virus isolation and quantitation." <u>Virology Methods Manual</u>: 25-46.

Hiscott, J., H. Kwon and P. Génin (2001). "Hostile takeovers: viral appropriation of the NF-kB pathway." <u>The Journal of Clinical Investigation</u> **107**(2): 143-151.

Hoffmann, F. S., A. Schmidt, M. Dittmann Chevillotte, C. Wisskirchen, J. Hellmuth, S. Willms, R. H. Gilmore, J. Glas, M. Folwaczny, T. Muller, T. Berg, U. Spengler, K. Fitzmaurice, D. Kelleher, N. Reisch, C. M. Rice, S. Endres and S. Rothenfusser (2015). "Polymorphisms in melanoma differentiation-associated gene 5 link protein function to clearance of hepatitis C virus." <u>Hepatology</u> **61**(2): 460-470.

Hornung, V., J. Ellegast, S. Kim, K. Brzozka, A. Jung, H. Kato, H. Poeck, S. Akira, K. K. Conzelmann, M. Schlee, S. Endres and G. Hartmann (2006). "5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I." <u>Science</u> **314**(5801): 994-997.

Inoue, J., J. Gohda, T. Akiyama and K. Semba (2007). "NF-kappaB activation in development and progression of cancer." <u>Cancer Sci</u> **98**(3): 268-274.

Isaacs, A. and J. Lindenmann (1957). "Virus interference. I. The interferon." <u>Proc R Soc Lond B Biol Sci</u> **147**(927): 258-267.

Ishikawa, H., H. Tachikawa, Y. Miura and N. Takahashi (2006). "TRIM11 binds to and destabilizes a key component of the activator-mediated cofactor complex (ARC105) through the ubiquitin-proteasome system." <u>FEBS Lett</u> **580**(20): 4784-4792.

Javanbakht, H., W. Yuan, D. F. Yeung, B. Song, F. Diaz-Griffero, Y. Li, X. Li, M. Stremlau and J. Sodroski (2006). "Characterization of TRIM5alpha trimerization and its contribution to human immunodeficiency virus capsid binding." <u>Virology</u> **353**(1): 234-246.

Kaito, M., S. Watanabe, K. Tsukiyama-Kohara, K. Yamaguchi, Y. Kobayashi, M. Konishi, M. Yokoi, S. Ishida, S. Suzuki and M. Kohara (1994). "Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study." J Gen Virol **75 (Pt 7)**: 1755-1760.

Karin, M., Y. Cao, F. R. Greten and Z. W. Li (2002). "NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit." <u>Nat Rev Cancer</u> **2**(4): 301-310.

Kato, H., S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, S. Uematsu, K. Matsui, T. Tsujimura, K. Takeda, T. Fujita, O. Takeuchi and S. Akira (2005). "Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response." Immunity **23**(1): 19-28.

Kato, H., O. Takeuchi, S. Sato, M. Yoneyama, M. Yamamoto, K. Matsui, S. Uematsu, A. Jung, T. Kawai, K. J. Ishii, O. Yamaguchi, K. Otsu, T. Tsujimura, C. S. Koh, C. Reis e Sousa, Y. Matsuura, T. Fujita and S. Akira (2006). "Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses." <u>Nature</u> **441**(7089): 101-105.

Kawasaki, T., T. Kawai and S. Akira (2011). "Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity." <u>Immunol Rev</u> **243**(1): 61-73.

Kim, C. W. and K. M. Chang (2013). "Hepatitis C virus: virology and life cycle." <u>Clin Mol Hepatol</u> **19**(1): 17-25.

Kim, G. N. and C. Y. Kang (2006). "Matrix protein of VSV New Jersey serotype containing methionine to arginine substitutions at positions 48 and 51 allows near-normal host cell gene expression." <u>Virology</u> **357**(1): 41-53.

Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." <u>Int Rev</u> <u>Immunol</u> **30**(1): 16-34.

Lauer, G. M. and B. D. Walker (2001). "Hepatitis C virus infection." N Engl J Med 345(1): 41-52.

Lee, S. O., R. A. Brown and R. R. Razonable (2013). "Association between a functional polymorphism in Toll-like receptor 3 and chronic hepatitis C in liver transplant recipients." <u>Transpl Infect Dis</u> **15**(2): 111-119.

Lee, Y., B. Song, C. Park and K. S. Kwon (2013). "TRIM11 negatively regulates IFNbeta production and antiviral activity by targeting TBK1." <u>PLoS One</u> **8**(5): e63255.

Lehmann, M., M. F. Meyer, M. Monazahian, H. L. Tillmann, M. P. Manns and H. Wedemeyer (2004). "High rate of spontaneous clearance of acute hepatitis C virus genotype 3 infection." <u>J Med Virol</u> **73**(3): 387-391.

Li, K., E. Foy, J. C. Ferreon, M. Nakamura, A. C. Ferreon, M. Ikeda, S. C. Ray, M. Gale, Jr. and S. M. Lemon (2005). "Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(8): 2992-2997.

Li, X. D., L. Sun, R. B. Seth, G. Pineda and Z. J. Chen (2005). "Hepatitis C virus protease NS3/4A cleaves mitochondrial antiviral signaling protein off the mitochondria to evade innate immunity." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **102**(49): 17717-17722.

Li, Y., L. S. Chin, C. Weigel and L. Li (2001). "Spring, a novel RING finger protein that regulates synaptic vesicle exocytosis." J Biol Chem **276**(44): 40824-40833.

Lorick, K. L., J. P. Jensen, S. Fang, A. M. Ong, S. Hatakeyama and A. M. Weissman (1999). "RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **96**(20): 11364-11369.

Lu, R., W. C. Au, W. S. Yeow, N. Hageman and P. M. Pitha (2000). "Regulation of the promoter activity of interferon regulatory factor-7 gene. Activation by interferon snd silencing by hypermethylation." <u>J Biol</u> <u>Chem</u> **275**(41): 31805-31812.

McCartney, S. A., L. B. Thackray, L. Gitlin, S. Gilfillan, H. W. Virgin and M. Colonna (2008). "MDA-5 recognition of a murine norovirus." <u>PLoS Pathog</u> **4**(7): e1000108.

Micallef, J. M., J. M. Kaldor and G. J. Dore (2006). "Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies." <u>J Viral Hepat</u> **13**(1): 34-41.

Nisole, S., J. P. Stoye and A. Saïb (2005). "TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence." <u>Nat Rev Microbiol</u> **3**(10): 799-808.

Ohmori, Y. and T. A. Hamilton (1995). "The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha." J Immunol **154**(10): 5235-5244.

Ortega-Prieto, A. M. and M. Dorner (2017). "Immune Evasion Strategies during Chronic Hepatitis B and C Virus Infection." <u>Vaccines (Basel)</u> **5**(3).

Ozato, K., D. M. Shin, T. H. Chang and H. C. Morse, 3rd (2008). "TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity." <u>Nat Rev Immunol</u> **8**(11): 849-860.

Patin, E., Z. Kutalik, J. Guergnon, S. Bibert, B. Nalpas, E. Jouanguy, M. Munteanu, L. Bousquet, L. Argiro, P. Halfon, A. Boland, B. Müllhaupt, D. Semela, J. F. Dufour, M. H. Heim, D. Moradpour, A. Cerny, R. Malinverni, H. Hirsch, G. Martinetti, V. Suppiah, G. Stewart, D. R. Booth, J. George, J. L. Casanova, C. Bréchot, C. M. Rice, A. H. Talal, I. M. Jacobson, M. Bourlière, I. Theodorou, T. Poynard, F. Negro, S. Pol, P. Y. Bochud and L. Abel (2012). "Genome-wide association study identifies variants associated with progression of liver fibrosis from HCV infection." <u>Gastroenterology</u> **143**(5): 1244-1252.e1212.

Pichlmair, A., O. Schulz, C. P. Tan, J. Rehwinkel, H. Kato, O. Takeuchi, S. Akira, M. Way, G. Schiavo and C. Reis e Sousa (2009). "Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection." <u>J Virol</u> **83**(20): 10761-10769.

Qin, Y., Q. Liu, S. Tian, W. Xie, J. Cui and R. F. Wang (2016). "TRIM9 short isoform preferentially promotes DNA and RNA virus-induced production of type I interferon by recruiting GSK3beta to TBK1." <u>Cell Res</u> **26**(5): 613-628.

Rajsbaum, R., A. Garcia-Sastre and G. A. Versteeg (2014). "TRIMmunity: the roles of the TRIM E3ubiquitin ligase family in innate antiviral immunity." <u>J Mol Biol</u> **426**(6): 1265-1284.

Rajsbaum, R., J. P. Stoye and A. O'Garra (2008). "Type I interferon-dependent and -independent expression of tripartite motif proteins in immune cells." <u>Eur J Immunol</u> **38**(3): 619-630.

Regad, T., A. Saib, V. Lallemand-Breitenbach, P. P. Pandolfi, H. de Thé and M. K. Chelbi-Alix (2001). "PML mediates the interferon-induced antiviral state against a complex retrovirus via its association with the viral transactivator." <u>Embo j</u> **20**(13): 3495-3505.

Rehwinkel, J., C. P. Tan, D. Goubau, O. Schulz, A. Pichlmair, K. Bier, N. Robb, F. Vreede, W. Barclay, E. Fodor and C. Reis e Sousa (2010). "RIG-I detects viral genomic RNA during negative-strand RNA virus infection." <u>Cell</u> **140**(3): 397-408.

Rothenfusser, S., N. Goutagny, G. DiPerna, M. Gong, B. G. Monks, A. Schoenemeyer, M. Yamamoto, S. Akira and K. A. Fitzgerald (2005). "The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I." <u>J Immunol</u> **175**(8): 5260-5268.

Rückel, J. (2018). <u>Tripartite Motif Family Protein 9: das genetisch determinierte Expressionsniveau</u> moduliert die angeborene antivirale Immunität und Virusreplikation.

, LMU München.

Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." <u>Nature</u> **454**(7203): 523-527.

Sakuma, R., J. A. Noser, S. Ohmine and Y. Ikeda (2007). "Rhesus monkey TRIM5alpha restricts HIV-1 production through rapid degradation of viral Gag polyproteins." <u>Nat Med</u> **13**(5): 631-635.

Sarrazin, C., V.-u. S. Deutsche Gesellschaft für Gastroenterologie, V. Deutsche Gesellschaft für Pathologie e, T. Zimmermann, L. Deutsche, T. Berg, U. P. Neumann, V. Gesellschaft für Virologie e, P. Schirmacher, E. Gesellschaft für Pädiatrische Gastroenterologie und, H. Schmidt, H. Österreichische Gesellschaft für Gastroenterologie und, U. Spengler, G. Schweizerische Gesellschaft für, J. Timm, V. Deutsche Transplantationsgesellschaft e, H. Wedemeyer, V. Deutsche Leberhilfe e, V. Deutsche Gesellschaft für Infektiologie e, S. Wirth, V. Deutsche Gesellschaft für Suchtmedizin e, S. Zeuzem, A.-G. e. V. Deutsche, H. I. V. I. Deutsche Arbeitsgemeinschaft niedergelassener Ärzte für die Versorgung and K.-I. Robert (2018). "S3-Leitlinie "Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Hepatitis-C-Virus (HCV) -Infektion"." Z Gastroenterol **56**(07): 756-838.

Schlee, M., V. Hornung and G. Hartmann (2006). "siRNA and isRNA: two edges of one sword." <u>Mol</u> <u>Ther</u> **14**(4): 463-470.

Schmidt, A., T. Schwerd, W. Hamm, J. C. Hellmuth, S. Cui, M. Wenzel, F. S. Hoffmann, M. C. Michallet, R. Besch, K. P. Hopfner, S. Endres and S. Rothenfusser (2009). "5'-triphosphate RNA requires basepaired structures to activate antiviral signaling via RIG-I." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **106**(29): 12067-12072.

Schnell, G., Y. M. Loo, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2012). "Uridine composition of the poly-U/UC tract of HCV RNA defines non-self recognition by RIG-I." <u>PLoS Pathog</u> 8(8): e1002839.

Sebastian, S. and J. Luban (2005). "TRIM5alpha selectively binds a restriction-sensitive retroviral capsid." <u>Retrovirology</u> **2**: 40.

Seth, R. B., L. Sun, C. K. Ea and Z. J. Chen (2005). "Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3." <u>Cell</u> **122**(5): 669-682.

Shastry, B. S. (2009). "SNPs: impact on gene function and phenotype." Methods Mol Biol 578: 3-22.

Shi, M., H. Cho, K. S. Inn, A. Yang, Z. Zhao, Q. Liang, G. A. Versteeg, S. Amini-Bavil-Olyaee, L. Y. Wong, B. V. Zlokovic, H. S. Park, A. García-Sastre and J. U. Jung (2014). "Negative regulation of NFκB activity by brain-specific TRIpartite Motif protein 9." <u>Nat Commun</u> **5**: 4820.

Shi, M., W. Deng, E. Bi, K. Mao, Y. Ji, G. Lin, X. Wu, Z. Tao, Z. Li, X. Cai, S. Sun, C. Xiang and B. Sun (2008). "TRIM30 alpha negatively regulates TLR-mediated NF-kappa B activation by targeting TAB2 and TAB3 for degradation." <u>Nat Immunol</u> **9**(4): 369-377.

Short, K. M. and T. C. Cox (2006). "Subclassification of the RBCC/TRIM superfamily reveals a novel motif necessary for microtubule binding." <u>J Biol Chem</u> **281**(13): 8970-8980.

Simmonds, P. (2001). "The origin and evolution of hepatitis viruses in humans." <u>J Gen Virol</u> 82(Pt 4): 693-712.

Stanaway, J. D., A. D. Flaxman, M. Naghavi, C. Fitzmaurice, T. Vos, I. Abubakar, L. J. Abu-Raddad, R. Assadi, N. Bhala, B. Cowie, M. H. Forouzanfour, J. Groeger, K. M. Hanafiah, K. H. Jacobsen, S. L. James, J. MacLachlan, R. Malekzadeh, N. K. Martin, A. A. Mokdad, A. H. Mokdad, C. J. L. Murray, D. Plass, S. Rana, D. B. Rein, J. H. Richardus, J. Sanabria, M. Saylan, S. Shahraz, S. So, V. V. Vlassov, E. Weiderpass, S. T. Wiersma, M. Younis, C. Yu, M. El Sayed Zaki and G. S. Cooke (2016). "The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013." Lancet **388**(10049): 1081-1088.

Takeda, K. and S. Akira (2015). "Toll-like receptors." Curr Protoc Immunol 109: 14 12 11-14 12 10.

Takeuchi, O. and S. Akira (2009). "Innate immunity to virus infection." Immunol Rev 227(1): 75-86.

Tanji, K., T. Kamitani, F. Mori, A. Kakita, H. Takahashi and K. Wakabayashi (2010). "TRIM9, a novel brain-specific E3 ubiquitin ligase, is repressed in the brain of Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." <u>Neurobiol Dis</u> **38**(2): 210-218.

Taylor, K. E. and K. L. Mossman (2013). "Recent advances in understanding viral evasion of type I interferon." <u>Immunology</u> **138**(3): 190-197.

Thein, H. H., Q. Yi, G. J. Dore and M. D. Krahn (2008). "Estimation of stage-specific fibrosis progression rates in chronic hepatitis C virus infection: a meta-analysis and meta-regression." <u>Hepatology</u> **48**(2): 418-431.

Turelli, P., V. Doucas, E. Craig, B. Mangeat, N. Klages, R. Evans, G. Kalpana and D. Trono (2001). "Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication." <u>Mol Cell</u> **7**(6): 1245-1254.

Uchil, P. D., B. D. Quinlan, W. T. Chan, J. M. Luna and W. Mothes (2008). "TRIM E3 ligases interfere with early and late stages of the retroviral life cycle." <u>PLoS Pathog</u> **4**(2): e16.

Versteeg, G. A., R. Rajsbaum, M. T. Sanchez-Aparicio, A. M. Maestre, J. Valdiviezo, M. Shi, K. S. Inn, A. Fernandez-Sesma, J. Jung and A. Garcia-Sastre (2013). "The E3-ligase TRIM family of proteins regulates signaling pathways triggered by innate immune pattern-recognition receptors." <u>Immunity</u> **38**(2): 384-398.

Wesolowski, J. and F. Paumet (2010). "SNARE motif: a common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion." <u>Virulence</u> 1(4): 319-324.

Whelan, S. P. J. (2008). Vesicular Stomatitis Virus. <u>Encyclopedia of Virology (Third Edition)</u>. B. W. J. Mahy and M. H. V. Van Regenmortel. Oxford, Academic Press: 291-299.

WHO (2017). "World Health Organization: Global hepatitis report." <u>https://www.who.int/publications/i/item/global-hepatitis-report-2017</u>.

Winkle, C. C., L. M. McClain, J. G. Valtschanoff, C. S. Park, C. Maglione and S. L. Gupton (2014). "A novel Netrin-1-sensitive mechanism promotes local SNARE-mediated exocytosis during axon branching." <u>J Cell Biol</u> **205**(2): 217-232.

Yan, J., Q. Li, A. P. Mao, M. M. Hu and H. B. Shu (2014). "TRIM4 modulates type I interferon induction and cellular antiviral response by targeting RIG-I for K63-linked ubiquitination." <u>J Mol Cell Biol</u> **6**(2): 154-163.

Yan, N. and Z. J. Chen (2012). "Intrinsic antiviral immunity." Nat Immunol 13(3): 214-222.

Yang, B., J. Wang, Y. Wang, H. Zhou, X. Wu, Z. Tian and B. Sun (2013). "Novel function of Trim44 promotes an antiviral response by stabilizing VISA." <u>J Immunol</u> **190**(7): 3613-3619.

Yang, K., H. X. Shi, X. Y. Liu, Y. F. Shan, B. Wei, S. Chen and C. Wang (2009). "TRIM21 is essential to sustain IFN regulatory factor 3 activation during antiviral response." J Immunol **182**(6): 3782-3792.

Yao, Z. Q., S. N. Waggoner, M. W. Cruise, C. Hall, X. Xie, D. W. Oldach and Y. S. Hahn (2005). "SOCS1 and SOCS3 are targeted by hepatitis C virus core/gC1qR ligation to inhibit T-cell function." <u>J Virol</u> **79**(24): 15417-15429.

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

7. Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

Abb.	Abbildung
ADAR1	Adenosine deaminase that acts on double-stranded RNA
ATP	Adenosintriphosphat
BB	<i>B Box-</i> Domäne
Вр	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
CARDs	Caspase activation and recruitment domains
00	Coiled coil-Domäne
cDNA	Complementary DNA
CXCI 1	Chemokine (C-X-C motif) ligand 1
ONGET	
DAAs	Direct antiviral agents
DAMP	Damage associated molecular pattern
DEPCD5	DEP domain containing protein 5
	Dulbecco's Modified Fadle Medium
DMSO	Dimethyleulfovid
	Desvoyuribonukleinsäure
dSDNA	Doppeistrangige DNA
dsRNA	Doppelsträngige RNA
	Ethylanadiaminatatragastic said
ELISA	Enzyme Linked immunosorbent Assay
FCS	Fetal calf serum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
HA	Human influenza hemagglutinin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humaner-Immundefizienz-Virus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	Meerrettichperoxidase
	Interreron-α-Rezeptor
ΙΚΚε, ΙΚΚ-ί	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit epsilon
IL ID	Interleukin
IP-10	Interteron-gamma-inducible protein-10
IRF	Interferon regulatory factor
ISFG3	IFN-stimulated-gene-factor-3

ISGs	Interferon stimulierbare Gene
ISRE	Interferon stimulated response element
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
LNA	Locked nucleid acids
MAVS	Mitochondrial activator of virus signaling
MDA5	Melanoma differentiation association gene 5
miRNA	MicroRNA
Mol	Multiplicity of infection
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88
Na3VO4	Natriumorthovanadat
NF-кB	Nuclear factor-κB
Opti-MEM	Minimal Essential Medium
ORF	Open reading frame
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PBMC	Humane periphere Monozyten
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	Plaque forming units
PNPLA	Patatin-like phospholipase domain-containing protein
polyI:C, pI:C	Polyinosinpolycytosinsäure
ppp-RNA, 3pRNA	Triphosphat-RNA
PRK	RNA-activated protein kinase
PRR	Pattern recognition receptor, Musterekennungsrezeptor
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RING	Really interesting new gene-Domäne
RISC	RNA-induced silencing complex
RLH	Rig-I-like-Helikasen
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-Medium
SDS	Natriumlaurylsulfat
SeV	Sendai-Virus
SFV	<i>Semliki-forest</i> -Virus
shRNA	<i>Small-hairpin</i> -RNA
siRNA	<i>Small-interfering</i> -RNA
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism,</i> Einzelnukleotidpolymorphismus

ssRNA	Einzelsträngige RNA
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TBK-1	TANK-binding kinase 1
TCID50	Tissue culture infective dose 50%
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like-Rezeptor
TM6SF2	Transmembrane 6 superfamily 2 protein
TNFα	Tumornekrosefaktor-α
TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β
TRIM	Tripartite motif-containing protein
TRIS	Tromethamin
UTR	untranslated region
VSV	Vesicular-stomatitis-Virus

8. Veröffentlichungen

8.1. Abstracts und Poster

2015	TRIM9: a modulator of antiviral immunity to RNA viruses
	Tossounidis J, Rueckel J, Pandey D, Gaber H, Antón S, Willms S, Protzer U,
	Endres S, Rothenfusser S
	TOLL 2015, Targeting Innate Immunity Meeting, Marbeilla, Spain
2014	TRIM9: a new modulator of innate immune response
	Antón S, Pandey D, Rueckel J, Saathoff F, Protzer U, Endres S,
	Rothenfusser S
	44th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Bonn, Germany

8.2. Vorträge

2013 Uncharted Territory: Transcriptional Regulation of Rig-I-like Helicase Promotors Annual Retreat des Graduiertenkollegs 1202 der DFG, Ohlstadt

9. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Entstehen dieser Arbeit ihren Beitrag geleistet haben, danken.

Allen voran bedanke ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter Professor Dr. med. Simon Rothenfußer, für die Möglichkeit der Promotion in seinem Labor. Mit seiner Arbeitsweise und Begeisterung für die Forschung, hat er mein wissenschaftliches Interesse nachhaltig geprägt, und durch seine persönliche Art eine stets sehr angenehme und produktive Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe geschaffen. Durch seine wissenschaftliche Unterstützung und persönliche Förderung, ist nicht nur diese Arbeit entstanden, sondern haben sich sowohl beruflich als auch persönlich zahlreiche Möglichkeiten für mich eröffnet.

Auch Professor Dr. med. Stefan Endres möchte ich als Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie meinen Dank für das wissenschaftlich und persönlich bereichernde Umfeld, sowie die Möglichkeit der Assoziation an das Graduiertenkolleg 1202 der Deutschen Forschungsgemeinschaft, aussprechen.

Ebenso möchte ich mich bei den Verantwortlichen des Förderprogramms für Forschung und Lehre der LMU (FöFoLe) für die Aufnahme in den Promotionsstudiengang und die wissenschaftliche und finanzielle Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Christian Wißkirchen, Dr. Andreas Schmid und Dr. Dharmendra Pandey, für die inhaltliche und methodische Betreuung dieser Arbeit.

Auch allen anderen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe und der gesamten Abteilung, die stets für wissenschaftliche Diskussionen oder ein Feierabendbier zur Verfügung standen, möchte ich herzlich danken, besonders Hanna Meinl, Johannes Raps, Simon Hirschberger, Marcus Zeitlhöfer, Andreas Linder, Lukas Macke, Hermann Colmsee, Frederike Saathoff und Simone Willms.

Zu guter Letzt bedanke ich mich von Herzen bei meinen Eltern Sylvia und Juan und meinen Geschwistern Xenia und Julián für den uneingeschränkten Rückhalt und die ständige Motivation, auf die ich mich immer verlassen konnte. Von Herzen danken, möchte ich auch Maximilian Gradel, ohne dessen Unterstützung, Verständnis und gegenseitige Motivation, diese Arbeit wohl nie ein Ende gefunden hätte.

10. Affidavit



LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät Promotionsbüro

Eidesstattliche Versicherung

Antón-Gradel, Sofía Luisa

Name, Vorname

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

Tripartite Motif Family Protein 9

Charakterisierung eines neuen Proteins der antiviralen 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, den 21.04.2024 Ort, Datum Sofía Luisa Antón-Gradel Unterschrift