

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Klinik der Universität München

Leiter: Prof. Dr. Stefan Endres

Erkennung des Gelbfieberimpfvirus YF-17D durch das angeborene Immunsystem

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Paul Andreas Schwarzmüller

aus Linz

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Simon Rothenfuß

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karl-Heinz Herbinger
Prof. Dr. Veit Hornung
PD Dr. Reinhard Obst

Mitbetreuung durch die
promovierte Mitarbeiterin: Dr. Julia Thorn-Seshold

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2024

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Erkennung des Gelbfieberimpfvirus YF-17D durch das angeborene Immunsystem

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, 31.03.2024

Ort, Datum

Paul Schwarzlmüller

Unterschrift Doktorand

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1 Die Funktion und Organisation des humanen Immunsystems	1
1.1.2 Die Mustererkennungsrezeptoren (<i>Pattern recognition receptors</i>)	2
1.1.3 Die RIG-I-like-Rezeptoren	2
1.1.4 Das Interferonsystem	5
1.1.5 Das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität	7
1.2 Das Gelbfiebervirus 17D	8
1.2.1 Die Familie der Flaviviridae	8
1.2.2 Der Replikationszyklus von Flaviviren	11
1.2.3 Erkennung von Flaviviren durch das angeborene Immunsystem	12
1.2.4 Das Gelbfieberimpfvirus YF-17D	13
1.3 Fragestellung	14
2. Material und Methoden	16
2.1 Materialien	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Kits	16
2.1.3 Enzyme	17
2.1.4 Zellkultur und Transfektionsreagenzien	17
2.1.5 Reagenzien und Chemikalien	18
2.1.6 Puffer und Medien	19
2.1.7 Antikörper	19
2.1.8 Oligonukleotide	20
2.1.9 Software	21
2.1.10 Viren	21
2.2 Methoden	22
2.2.1 Zellulär-Immunologische Methoden	22
2.2.1.1 Zellkultur	22

2.2.1.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay	22
2.2.1.3 Transfektion von Zellen	22
2.2.1.4 Plaque-Assay	23
2.2.1.5 Virusproduktion	24
2.2.1.6 Immunfluoreszenz für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	24
2.2.2 Molekularbiologische Methoden	25
2.2.2.1 RNA-Isolation	25
2.2.2.2 Reverse Transkription	25
2.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	26
2.2.2.4 Transformation von Bakterien und Plasmid-Präparation	27
2.2.2.5 Gelelektrophorese	27
2.2.2.6 Einfügen der sgRNA-Sequenzen in die eSpCas9(1.1)-Plasmide	27
2.2.2.7 In-Fusion-Klonierung	28
2.2.2.8 Genome editing mit CRISPR/Cas9	29
2.2.2.9 T7-Endonuklease-Assay	30
2.2.3 Statistische Analyse	31
3. Ergebnisse	32
3.1 Erkennung des Gelbfieberimpfvirus 17D durch <i>RIG-I-like</i>-Rezeptoren	32
3.1.1 Das Gelbfieberimpfvirus 17D wird sowohl in RIG-I-defizienten als auch in MDA5-defizienten humanen Zellen erkannt	32
3.1.2 Eine Typ-I-Interferon-Antwort wird in 1205Lu-Zellen nur in Anwesenheit von RIG-I oder MDA5 ausgelöst	34
3.1.3 RIG-I wird in YF-17D-infizierten Zellen verstärkt exprimiert	37
3.2 Notwendige molekulare Muster für die Aktivierung einer Interferonantwort nach YF-17D-Infektion	39
3.2.1 Im Laufe der Gelbfieberinfektion entstehen doppelsträngige RNA-Replikationsintermediate	39
3.2.2 Doppelsträngigkeit von RNA ist eine Voraussetzung für die Interferon-Antwort gegen das Gelbfieberimpfvirus in 1205Lu Zellen	41

3.2.3 5'-Triphosphat-Reste liefern einen größeren Beitrag zur Immunantwort zu frühen Zeitpunkten nach der YF-17D-Infektion	42
3.3 Abhängigkeit der Immunantwort von Virusreplikation	44
3.3.1 Virusreplikation verstärkt die Typ-I-Interferon-Antwort nach Gelbfieberevirus-17D-Infektion	44
3.3.2 RNA-Replikationsintermediate stimulieren die Typ-I-Interferon-Antwort potenter als genomische Virus-RNA	46
4. Diskussion	49
4.1 Ergebnisübersicht	49
4.2 Die Rolle der RIG-I-like Rezeptoren bei der Erkennung des Gelbfieberimpfvirus	50
4.2.1 Das Gelbfieberimpfvirus wird MAVS-abhängig erkannt	50
4.2.2 Sowohl RIG-I als auch MDA5 detektieren die YF-17D-Infektion	51
4.2.3 YF-17D aktiviert RIG-I- und MDA5 mit unterschiedlicher Dynamik	52
4.3 Die Bedeutung der Virusreplikation für die Erkennung von YF-17D durch das angeborene Immunsystem	53
4.3.1 Replikation des Gelbfieberimpfvirus steigert die Interferonantwort	53
4.3.2 Replikationsintermediate aktivieren die angeborene Immunantwort stärker als die ankommenden Virusgenome	54
4.3.3 Die Menge an immunstimulatorischer RNA erreicht ihren Höhepunkt 48 Stunden nach Infektion	56
4.4 Pathogen-assoziierte Muster des Gelbfieber-Replikationszyklus	57
4.4.1 RIG-I-like-Rezeptoren erkennen doppelsträngige RNA während der YF-17D-Infektion	57
4.4.2 Unterschiedliche molekulare Muster spielen im Verlauf der Infektion eine Rolle	58
4.5 Ausblick	59
4.5.1 Entstehen RLR-Liganden nur während der Virusreplikation?	59
4.5.2 Welche Bereiche der Gelbfieberimpfvirus-RNA binden an RIG-I und MDA5?	59
5. Zusammenfassung	62

6. Literaturverzeichnis	64
7. Verzeichnis der Abkürzungen	71
8. Danksagung	74
9. Veröffentlichungen	74

1. Einleitung

1.1 Das angeborene Immunsystem

1.1.1 Die Funktion und Organisation des humanen Immunsystems

Das menschliche Abwehrsystem wird in zwei Arme unterteilt, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Ersteres stellt die initiale Verteidigungslinie gegen eindringende Pathogene dar. Zur angeborenen Abwehr werden physikalische Barrieren wie Epithelien und Mukus, antimikrobielle Proteine (unter anderem Lysozym, Komplement und Defensine) und zelluläre Mechanismen gezählt. Ein Teil der angeborenen Immunantwort wird durch spezialisierte Leukozyten vermittelt. Zu diesen zählen myeloische Zellen wie Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, aber auch Zellen der lymphatischen Reihe wie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und angeborene lymphatische Zellen (ILC). Darüber hinaus verfügen nahezu alle Zellen des Körpers über Mechanismen der angeborenen Immunität. So werden zytosolische Rezeptoren zur Detektion von Virusinfektionen und Proteine des *Major histocompatibility complex* Klasse I (MHC-I) zur Präsentation von zytosolischen Antigenen ubiquitär exprimiert. Das adaptive Immunsystem besteht aus B- und T-Zellen. Diese Lymphozyten bilden durch somatische Rekombination und Hypermutation Antikörper beziehungsweise T-Zell-Rezeptoren (TCR) gegen spezifische Antigene aus. So entsteht im Laufe einer Infektion ein Repertoire an Immunzellen, die einen bestimmten Erreger erkennen und eliminieren können. Darüber hinaus kann sich so ein immunologisches Gedächtnis ausbilden, das Reinfektionen mit dem gleichen Pathogen verhindern kann.

Der Begriff „angeborene Immunität“ leitet sich davon ab, dass die zur Pathogenerkennung notwendigen Rezeptoren Keimbahn-kodiert sind. Das heißt, dass sie schon von Geburt an in ihrem vollen Repertoire vorhanden sind und sich im Laufe des Lebens nicht verändern oder anpassen. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch eine schnell verfügbare Abwehrreaktion aus und ist so in der Lage die meisten Krankheitserreger zu eliminieren, bevor sich eine adaptive Immunantwort entwickeln kann. Zusätzlich können Mechanismen des angeborenen Abwehrsystems die Ausbreitung eines Erregers einschränken, bis sich eine erregerspezifische Immunreaktion ausgebildet hat. Auch nachdem sich eine B- und T-Zell-Antwort etabliert hat, übernimmt das angeborene Immunsystem wichtige Effektorfunktionen. So phagozytieren etwa Makrophagen durch Antikörper opsonierte Erreger und Komplementfaktoren lysieren Antikörper-markierte Zellen.

1.1.2 Die Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*)

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems besteht in der Erkennung von Krankheitserregern. Hierzu ist es notwendig „fremd“ von „selbst“ zu unterscheiden. Das angeborene Immunsystem erreicht dies durch die Verwendung von Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRR). Dieser Mechanismus ist evolutionär alt und konserviert. Das Abwehrsystem einer großen Anzahl von Organismen ohne adaptives Immunsystem, wie etwa aller Wirbellosen, basiert hauptsächlich auf der Detektion von Krankheitserregern durch PRR. Diese Proteine sind in der Lage konservierte molekulare Muster von Pathogenen (*Pathogen associated molecular patterns*, PAMP) zu binden und daraufhin eine Immunantwort auszulösen. Zu den PAMP gehören etwa bakterielle Zellwandbestandteile oder virale Nukleinsäuren. Die PRR können in verschiedene Familien von Rezeptoren unterteilt werden. Zur Detektion von viraler RNA dienen beim Menschen unter anderem *Retinoic-acid-inducible-gene-1-like*-Rezeptoren (RLR), die *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) TLR3, TLR7 und TLR8, Oligoadenylat-Synthetasen (OAS) und die Proteinkinase R (PKR) (Schneider et al. 2014). RLR, OAS und PKR sind zytosolische Proteine, die doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNA) binden und antivirale Funktionen haben.

Im Menschen sind zehn verschiedene *Toll-like*-Rezeptoren beschrieben mit unterschiedlichen PAMP als Liganden. TLR3 kommt im endosomalen Kompartiment sowie auf der Zelloberfläche diverser Zelltypen vor und wird durch die Bindung von dsRNA aktiviert. TLR7 und TLR8 sind hoch-homologe Proteine mit je zwei Bindungsstellen für Liganden. Die gleichzeitige Interaktion mit einzelsträngiger RNA (ssRNA) und einem spezifischen Nukleosid führt zur Signalauslösung (Chow et al. 2018).

1.1.3 Die RIG-I-like-Rezeptoren

Die Familie der *RIG-I-like*-Rezeptoren gehört zu den DExD/H-box-Helikasen und beinhaltet die drei Proteine *Retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I), *Melanoma differentiation-associated protein 5* (MDA5) und *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2). Sie teilen einen gemeinsamen Aufbau aus einer regulatorischen C-terminalen Domäne (CTD, oder *Repressor domain*, RD) und zwei N-terminal davon gelegenen Helikase-Domänen. RIG-I und MDA5 verfügen darüber hinaus über zwei N-terminale *Caspase activation and recruitment domains* (CARD) (Abbildung 1.1 a) (Rehwinkel & Gack 2020).

Die RLR fungieren als bedeutende intrazelluläre Sensoren für virale RNA. Diese löslichen Proteine kommen im Zytosol nahezu aller Zellen vor und sind in der Lage dsRNA zu binden. RIG-I und MDA5 liegen unter homöostatischen Bedingungen in niedriger Konzentration und in einer inaktivierten Konformation vor. Hierbei verhindert die CTD eine Signaltransduktion durch Assoziation mit den CARD. Nach Bindung der CTD und Helikase-Domänen an ihre spezifischen RNA-Liganden werden die CARD der RLR freigegeben und können mit der CARD des Adapterproteins *Mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) interagieren, um so eine Immunantwort auszulösen. MAVS ist mit seiner Transmembrandomäne an der äußeren Mitochondrienmembran, den Mitochondrien-assoziierten Membranen und den Peroxisomen lokalisiert. Da LGP2 über keine CARD verfügt, geht man davon aus, dass es nicht in der Lage ist, selbst eine Signaltransduktion auszulösen. LGP2 scheint jedoch die Funktion von RIG-I und MDA5 zu modulieren (Rehwinkel & Gack 2020).

Als Ligand für RIG-I wurde doppelsträngige RNA ohne Basen-Überhänge und mit einer freien Tri- oder Diphosphat-Gruppe am 5'-Ende identifiziert (Hornung et al. 2006, Goubau et al. 2014). Eine minimale Länge der dsRNA von etwa zehn Basenpaaren scheint für die Aktivierung von RIG-I auszureichen (Brisse & Ly 2019). Eine Typ-1-Cap-Struktur am 5'-Ende der RNA verhindert ein Binden an RIG-I. Diese besteht aus einer N7-Methyl-Guanosin-Gruppe, die 5'-5' über eine Triphosphat-Gruppe mit der ersten Base der RNA verbunden ist, und zusätzlich einem Methyl-Rest an der 2'-Position der ersten Base (Abbildung 1.2). Diese Restriktion von RIG-I-Liganden dient dem Schutz vor Erkennung von zellulären Messenger-RNAs (mRNA), welche diese Modifikation am 5'-Ende tragen (Schuberth-Wagner et al. 2015).

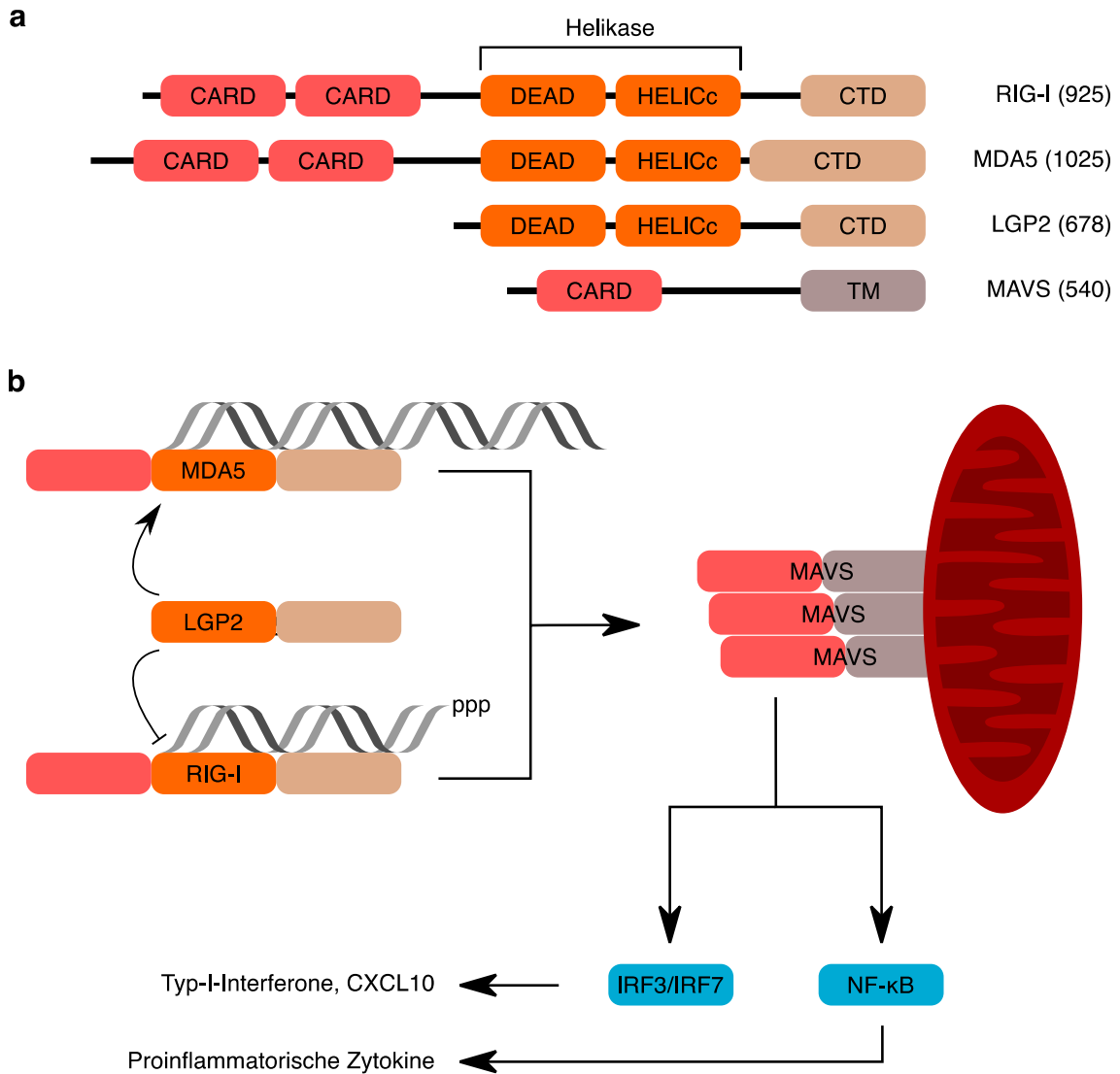


Abbildung 1.1 Die RIG-I-like-Rezeptoren (a) C-terminal weisen alle RLR eine *C-terminal domain* (CTD) auf, die alternativ als *repressor domain* (RD) bezeichnet wird. Weiter N-terminal befinden sich die zwei Helikase-Domänen DEAD und HELICc. RIG-I und MDA5 verfügen am N-terminalen Ende über zwei *Caspase activation and recruitment domains* (CARD), die der Signaltransduktion dienen. In Klammern ist die Anzahl der Aminosäuren des jeweiligen Proteins angegeben (Modifiziert nach Chow et al. 2018). (b) MDA5 wird durch lange dsRNA aktiviert, RIG-I durch dsRNA mit 5'-Tri- oder Diphosphatresten. LGP2 bindet ebenfalls dsRNA (nicht gezeigt) und moduliert die Aktivierung von RIG-I und MDA5. Nach der Bindung ihrer Liganden interagieren die CARD der RLR mit der CARD von MAVS. Über Zwischenschritte kommt es dann zur Phosphorylierung und Aktivierung von IRF3 beziehungsweise IFR7 und von NF-κB. Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an DNA im Zellkern führt zur Produktion von Typ-I-Interferonen, CXCL10 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen.

Die strukturellen Voraussetzungen für MDA5-Liganden sind weniger genau verstanden. Als typischer Aktivator für MDA5-Signaling wird lange (> 300 Basenpaare) doppelsträngige RNA beschrieben, obwohl die genauen minimalen Anforderungen an Liganden nicht bekannt sind (Liu & Gack 2020). 2'-O-Methylierung von RNA scheint hingegen die Erkennung als fremd durch MDA5 zu verhindern (Züst & Cervantes-Barragan et al. 2011).

Sowohl RIG-I als auch MDA5 bilden multimere Filamente entlang einer gebundenen RNA aus. Ihre CARD assoziieren daraufhin mit dem Adapterprotein MAVS, was dessen Aggregation zur Folge hat (Yoneyama et al. 2015). Dadurch wird eine zytosolische Signalkaskade ausgelöst, die letztlich zur Aktivierung von NF- κ B und Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren *Interferon regulatory factor 3* (IRF3) oder IRF7 mit anschließender Bildung von Homodimeren führt. Die IRF-Dimere translozieren in den Zellkern und stimulieren die Transkription von Typ-I-Interferonen (IFN-I) (Abbildung 1.1 b). Bindung von NF- κ B an die DNA im Zellkern leitet die Transkription von weiteren proinflammatorischen Zytokinen ein (Reikine et al. 2014).

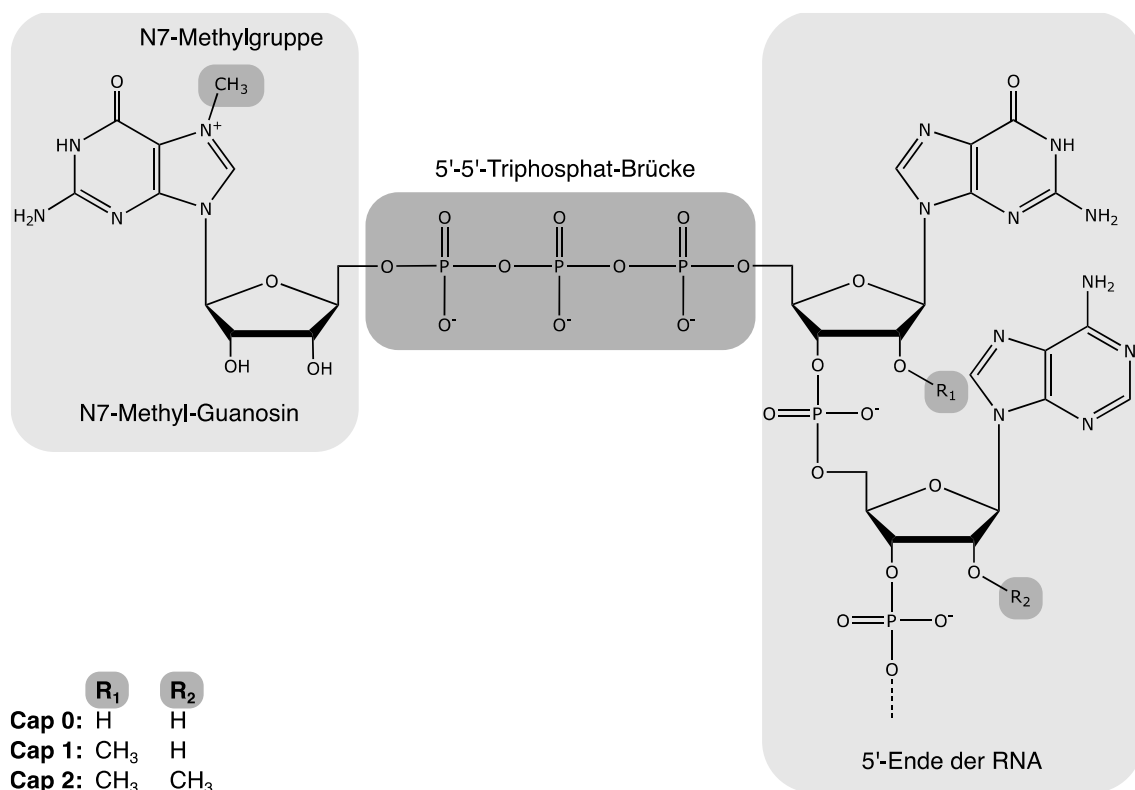


Abbildung 1.2 RNA-Cap-Strukturen Das Capping von mRNA steigert die Effizienz der Translation, schützt die mRNA vor Degradation und verhindert die Aktivierung von RIG-I durch zelleigene RNA. Der Prozess findet im Nukleus vor dem Export in das Zytosol statt und involviert die 5'-5'-Bindung eines N7-Methylguanosins. Je nach Anzahl der Methylierungen unterscheidet man zwischen Typ-0-, -1- oder -2-Caps (modifiziert nach Schuberth-Wagner et al. 2015).

1.1.4 Das Interferonsystem

Der Begriff „Interferon“ wurde in den 1950er Jahren geprägt, als erste Hypothesen aufgestellt wurden, dass Zellen einen Stoff als Reaktion auf eine Virusinfektion produzieren könnten, welcher mit der Infektion durch ein weiteres Virus interferieren

würde (Isaacs & Lindemann 1957). Mittlerweile sind drei Klassen von Interferonen beschrieben. Zu der größten Klasse, den Typ-I-Interferonen, zählen 13 Typen von Interferon α (IFN- α), sowie IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω (Lazear et al. 2019). IFN- α und IFN- β können von nahezu allen Zellen als Reaktion auf eine Virusinfektion produziert und sezerniert werden. IFN- γ ist das einzige Typ-II-Interferon und wird in erster Linie von Immunzellen produziert. Die Gruppe der Typ-III-Interferone besteht aus IFN- λ 1, IFN- λ 2 und IFN- λ 3 und wurde im Jahr 2003 erstmalig beschrieben (Schneider et al. 2014).

Im Kontext dieser Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf den Typ-I-Interferonen und ihrer Bedeutung in der antiviralen Immunität. Viren können eine Vielzahl an unterschiedlichen Zelltypen in verschiedenen Geweben infizieren. Durch die ubiquitäre Expression von Sensoren des angeborenen Immunsystems (zum Beispiel RLR) können Virusinfektionen jedoch frühzeitig von den betroffenen Zellen detektiert werden. Am Ende der ausgelösten Signalkaskade (siehe Abschnitt 1.1.3) kommt es zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 oder IRF7, welche die Transkription von Typ-I-Interferonen stimulieren. Nach der Translation werden diese Signalmoleküle sezerniert und wirken para- und autokrin über Bindung an den ubiquitär exprimierten IFN- α/β -Rezeptor. Der Rezeptor besteht aus den zwei Proteinuntereinheiten IFN- α/β -Rezeptor-1 (IFNAR1) und IFN- α/β -Rezeptor-2 (IFNAR2), die eine heterodimere Einheit bilden. Alle Typ-I-Interferone können diesen Rezeptor binden und aktivieren, jedoch mit unterschiedlicher Affinität und Kinetik. Die Signaltransduktion des Interferon- α/β -Rezeptors erfolgt über Phosphorylierung von *Signal transducer and activator of transcription 1* und *2* (STAT1 und STAT2). Diese bilden einen Komplex mit IRF9, der die Transkription von Interferon-stimulierten Genen (ISG) bewirkt (Schneider et al. 2014).

Zu den ISG gehören hunderte Gene, die durch Interferon hochreguliert werden (Schoggins 2019). Unter anderem handelt es sich dabei um Mustererkennungsrezeptoren, Zytokine und um Proteine, die den viralen Replikationszyklus an unterschiedlichen Stellen hemmen. Es werden aber auch Gene induziert, die die Zelle gegenüber Interferon desensibilisieren. So wird eine unkontrollierte, andauernde, beziehungsweise schädliche Aktivierung des angeborenen Immunsystems verhindert (Schneider et al. 2014).

Die physiologische Bedeutung von Typ-I-Interferonen zeigt sich auch in Erkrankungen mit Dysfunktion des Interferonsystems. Sowohl eine gesteigerte Aktivierung wie auch eine reduzierte Aktivität kann zu Schäden im Organismus führen. Überschießende

Interferon-Produktion konnte in Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie systemischem Lupus erythematoses, Aicardi-Goutières-Syndrom oder Singleton-Merten-Syndrom gezeigt werden. Als mögliche Auslöser konnten hier unter anderem Mutationen in den Genen für RIG-I und MDA5 gefunden werden (Liu & Gack 2020). Im Zuge von Virusinfektionen kann es hingegen bei Menschen mit reduzierter Interferonproduktion beziehungsweise -wirkung zu ungünstigeren klinischen Verläufen kommen. Defekte des IFN- α/β -Rezeptors konnten bei Patienten mit schweren Erkrankungen durch virale Lebendimpfungen mit dem Mumps-Masern-Röteln-Impfstoff und dem Gelbfieberimpfvirus nachgewiesen werden (Hernandez et al. 2019). Im Rahmen der SARS-CoV2-Pandemie konnte gezeigt werden, dass Patienten mit lebensbedrohlichem Verlauf von COVID-19 gehäuft neutralisierende Autoantikörper gegen Typ-I-Interferon oder Defekte im Interferon-System aufweisen (Bastard & Rosen et al. 2020, Zhang et al. 2020). Diese Autoantikörper gegen Interferon konnten auch mit schweren Erkrankungen als Folge der Gelbfieberimpfung in Verbindung gebracht werden (Bastard et al. 2021).

1.1.5 Das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Immunität

Zusätzlich zu den unmittelbaren antimikrobiellen Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems initiiert und koordiniert es auch die folgende adaptive Immunantwort. Im Rahmen von Virusinfektionen sind Typ-I-Interferone von besonderer Bedeutung. Diese bewirken neben der Induktion von direkt antiviralen Genprogrammen zur schnellen lokalen Kontrolle einer Infektion auch die Differenzierung und Migration von antigenpräsentierenden Zellen (APC). Über APC wie dendritische Zellen und Makrophagen steuert das angeborene Immunsystem die adaptive Immunantwort. Für das *Priming* von naiven T-Zellen sind drei Signale während der Antigenpräsentation notwendig. Als erstes Signal dient die Erkennung eines spezifischen Antigens auf dem MHC-Komplex der APC durch den T-Zell-Rezeptor (TCR). Ko-stimulatorische Signale durch Bindung von zum Beispiel CD28 auf der T-Zell-Oberfläche an CD80 oder CD86 von dendritischen Zellen bilden das zweite Signal. Zytokine stellen das Signal drei dar.

Typ-I-Interferone führen zu einer gesteigerten Expression von ko-stimulatorischen Molekülen auf APC und zur Sekretion von Zytokinen wie IL-15, Interferon- γ oder CXCL10 durch diese. Außerdem können Typ-I-Interferone selbst als Signal drei für T-Zellen dienen. Darüber hinaus steigert IFNAR-Signaling die Antigenpräsentation durch MHC-I und MHC-II. Die Produktion von Interferonen durch das angeborene Immunsystem führt also zu einer Optimierung aller drei Signale des T-Zell-Primings (Crouse et al. 2015).

Die zeitliche Koordination von Typ-I-Interferon-Signaling und der TCR-Aktivierung in T-Zellen scheint von besonderer Bedeutung zu sein. So stimuliert eine Aktivierung des IFN- α/β -Rezeptors auf T-Zellen bei gleichzeitigem T-Zell-Rezeptor-Signal Proliferation und Effektor-Differenzierung. Bei fehlender TCR-Aktivierung hingegen hemmt Typ-I-Interferon Proliferation und fördert Apoptose. Die Dynamik der IFN-I-Expression scheint auch die Weichen in Richtung zellulärer oder humoraler adaptiver Immunantwort zu stellen (De Giovanni et al., 2020).

Im Zuge von Impfungen ist eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems notwendig, um eine protektive adaptive Immunantwort auszulösen. Bei viralen Lebendimpfstoffen werden Mustererkennungsrezeptoren analog zu einer Infektion mit pathogenen Viren aktiviert. Bei Totimpfstoffen hingegen dienen dazu häufig zusätzliche Adjuvantien. Am Beispiel der Influenza-Impfung konnte gezeigt werden, dass eine Typ-I-Interferon-Antwort notwendig ist, um die initiale adaptive Immunantwort zu etablieren (Koyama et al. 2010).

1.2 Das Gelbfiebervirus 17D

1.2.1 Die Familie der Flaviviridae

Die Familie der Flaviviridae besteht aus den Gattungen Flavivirus, Hepacivirus, Pegivirus und Pestivirus. Von besonderer humanmedizinischer Bedeutung sind Vertreter der Gattungen Hepacivirus, zu der das Hepatitis-C-Virus gehört, und der Flaviviren. Wichtige Mitglieder der Gattung Flavivirus sind das Dengue-Virus (DENV), Zika-Virus (ZIKV), FSME-Virus (*Tick-borne encephalitis virus*, TBEV), West-Nil-Virus (WNV), Japanische Enzephalitis-Virus (JEV) und das namensgebende Gelbfiebervirus (von lateinisch „*flavus*“ für gelb) (*Yellow fever virus*, YFV). Flaviviren werden durch Gliederfüßer – in erster Linie Stechmücken oder Zecken – übertragen und infizieren weltweit bis zu 400 Millionen Menschen pro Jahr, wobei der Großteil davon auf DENV-Infektionen zurückgeht. Jedoch hat auch Gelbfieber allein im Jahr 2013 zu geschätzten 78.000 Todesopfern geführt (Garske et al. 2014).

Das Gelbfiebervirus kommt in Subsahara-Afrika sowie tropischen Gebieten in Südamerika vor. Aufgrund von Ausbrüchen in Angola mit Beginn 2015 (Barrett 2016) und Brasilien mit Beginn 2016 (Paules & Fauci 2017) ist es vor kurzem wieder in den Fokus medizinischer Bemühungen gerückt. Die Erkrankung wird durch Stechmücken

der Art *Aedes aegypti* übertragen und kann sowohl asymptomatische Infektionen als auch schwere – häufig tödliche – Erkrankungen mit hämorrhagischem Fieber nach sich ziehen. Antivirale Therapien stehen nicht zur Verfügung, mit der hochwirksamen Gelbfieberimpfung existiert jedoch ein potentes Mittel zur Prävention.

Bei allen Flaviviridae handelt es sich um behüllte Viren mit einem positivsträngigen RNA-Einzelstrang als Genom. Die Flaviviren bilden Viruspartikel mit einem Durchmesser von etwa 50 nm bestehend aus einer Lipidhülle und dem Nukleokapsid. Das Genom hat eine Größe von rund elf Kilobasen und kodiert für drei Strukturproteine (C – *Capsid*, prM – *Precursor of membrane protein* und E – *Envelope protein*) und sieben Nicht-Strukturproteine (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Abbildung 1.3). Die kodierende Region wird von einer 5' und einer 3' untranslatierten Region (5'-UTR beziehungsweise 3'-UTR) flankiert. Die Strukturproteine bilden zusammen mit einer Lipidmembran zellulären Ursprungs und dem Virusgenom die Virionen. Die Nichtstrukturproteine übernehmen Funktionen während der Virusreplikation und unterdrücken Komponenten der angeborenen Immunantwort (Barrows et al. 2018).

a



b

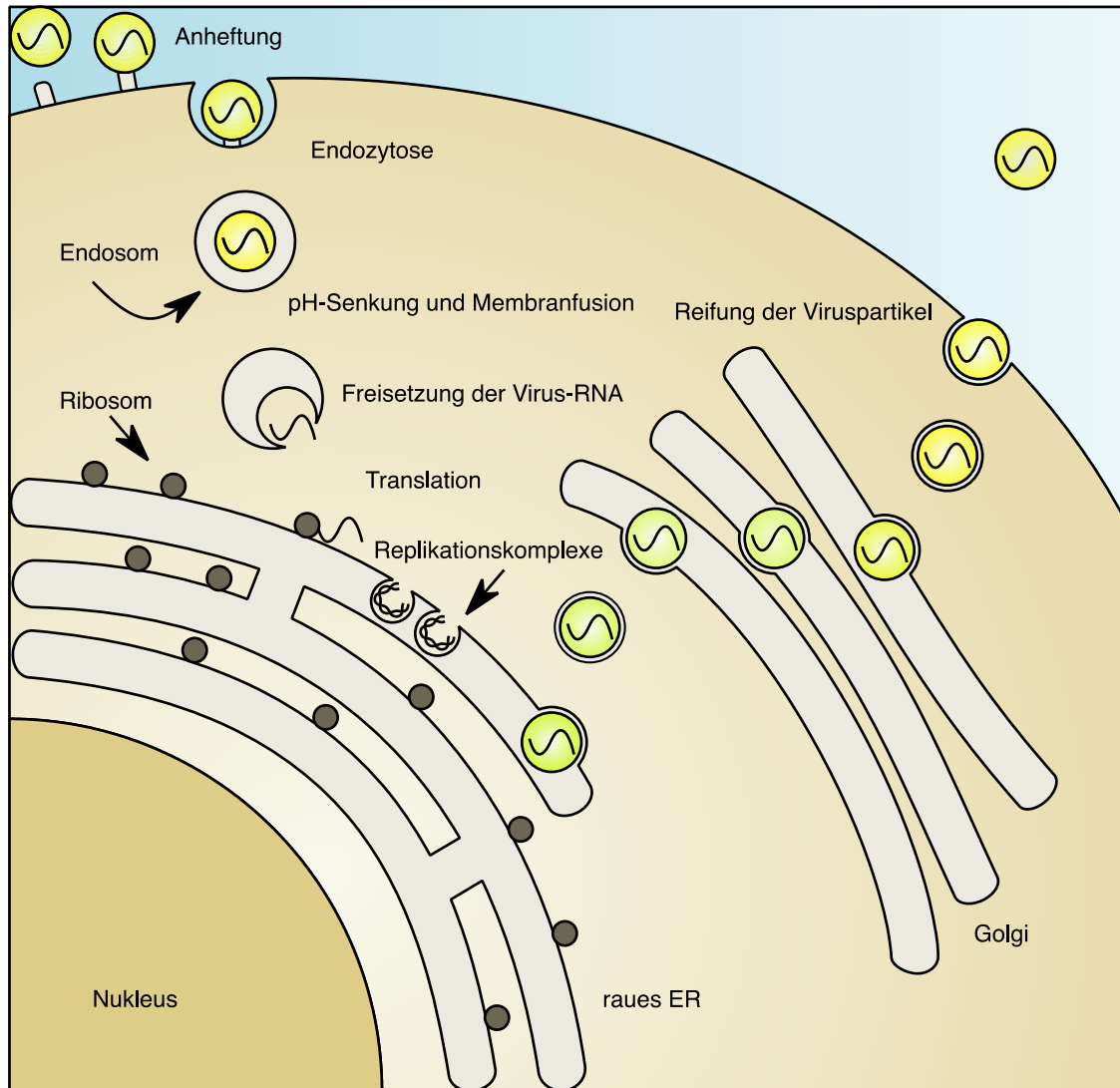


Abbildung 1.3 Schema des Flavivirusgenoms und des Replikationszyklus (a) Das Flavivirusgenom besteht aus einem einzelnen positiv-orientierten RNA-Strang. Es kodiert für ein einziges offenes Leseraster, das als ein Polyprotein translatiert wird. Durch virale und zelluläre Proteasen wird dieses in drei Strukturproteine (blau) und sieben Nicht-Strukturproteine (rot) gespalten. An den Enden des RNA-Moleküls befinden sich untranslatierte Regionen (5'- bzw. 3'-UTR) und am 5'-Terminus ein Typ-I-Cap. (b) Nachdem das Virion an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche gebunden hat, wird es endozytiert. Die Senkung des pH-Wertes in den Endosomen führt über eine Konformationsänderung im E-Protein des Virus zur Membranfusion und Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytosol. Anschließend wird das virale Genom translatiert und es bilden sich Replikationskomplexe als Einstülpungen in das endoplasmatische Retikulum (ER), in denen neue Kopien der Virus-RNA produziert werden. Anschließend werden Viruspartikel ins ER-Lumen abgeschnürt und sezerniert. Während sie den sekretorischen Pfad durchlaufen, kommt es zur Reifung der Viruspartikel (Modifiziert nach Pierson & Diamond 2020).

1.2.2 Der Replikationszyklus von Flaviviren

Nachdem sich Flaviviruspartikel an die Oberfläche von Zellen angeheftet haben, werden sie mittels Endozytose aufgenommen. Durch Senkung des pH-Wertes in den Endosomen kommt es zu Konformationsänderungen im E-Protein, die zur Fusion der Virusmembran mit der Endosomenmembran führt. Darauf folgend wird das Nukleokapsid, bestehend aus C-Protein und der Virus-RNA, in das Zytosol freigesetzt. Das virale Genom wird anschließend von Ribosomen als mRNA verwendet und translatiert. Die Virus-RNA kodiert ein singuläres offenes Leseraster, welches als einzelnes Polyprotein am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert wird. Aus dem Vorläuferpolyprotein werden durch zelluläre, und autokatalytisch durch viral kodierte Proteasen, die einzelnen funktionellen Proteine abgespalten (Abbildung 1.3) (Barrows et al. 2018).

Das Virus induziert die Bildung von Replikationskomplexen, die sich als Vesikel-ähnliche Einstülpungen in das Lumen des ER darstellen. Über eine Pore kommunizieren sie weiterhin mit dem Zytosol und ermöglichen somit den Austausch von für die Replikation notwendigen Molekülen. So können etwa Nukleotide für die RNA-Synthese oder Aminosäuren für die Proteinsynthese bereitgestellt werden. Die Replikationskomplexe ermöglichen einerseits eine hohe lokale Konzentration an Faktoren, die für Virus-Synthese notwendig sind, andererseits dienen sie dazu, die virale RNA und ihre Replikationsintermediate vor der Detektion durch zytosolische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems zu schützen (Klema et al. 2015).

Es wird vermutet, dass nach einer initialen Phase, in der das Virusgenom in erster Linie für die Produktion der Virusproteine verwendet wurde, ein Wechsel zur RNA-Replikation stattfindet. Hier wird die virale RNA von dem Protein NS5, das katalytische Aktivität als RNA-abhängige RNA-Polymerase (RdRp) besitzt, als Vorlage für die Synthese eines komplementären Negativstranges verwendet. Der Negativstrang wird folgend als Matrize für die Biosynthese neuer Virusgenome verwendet, deren 5'-Ende durch weitere Funktionen von NS5 mit einem Typ-I-Cap versehen wird. Hierzu wird zuerst ein Guanodin-Rest 5'-5' über eine Triphosphatgruppe mit der ersten Base (Adenosin) des Positivstrangs verbunden (GpppA). Anschließend wird mit Hilfe der Methyltransferase-Aktivität von NS5 sowohl das Guanodin-Cap an Position N7 als auch die erste Base an ihrer 2'-OH-Gruppe methyliert. Es resultiert ein Typ-I-Cap ($m^7GpppAm$), das einerseits der effizienten Translation und der Stabilität der Virus-RNA und andererseits als Schutz

vor Erkennung durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems dient (Garcia-Blanco et al. 2016).

Die Viruspartikel schnüren sich schließlich in das ER-Lumen ab und durchlaufen den sekretorischen Pfad durch ER und Golgi-Apparat. Hierbei reifen die Virionen in ihre infektiöse Form durch Spaltung von prM in M durch die Protease Furin und werden schließlich von der Zelle freigesetzt (Pierson & Diamond, 2020).

1.2.3 Erkennung von Flaviviren durch das angeborene Immunsystem

Die initiale Antwort durch das angeborene Immunsystem auf eine Infektion mit einem Flavivirus ist aus mehreren Gründen von medizinischem Interesse. Einerseits begrenzt sie früh nach einer Ansteckung mit einem pathogenen Virus die Replikation und bremst somit das Infektionsgeschehen. Wie oben bereits beschrieben (siehe Abschnitt 1.1.5), ist die Erkennung durch das angeborene Immunsystem darüber hinaus notwendig, um eine effektive adaptive Immunantwort hervorzubringen und so die Virusinfektion zu beseitigen. Andererseits ist die Detektion des attenuierten Gelbfieberimpfvirus durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems von vakzinologischem Interesse, da die Infektion mit dem YF-17D-Virus in fast allen Geimpften zu einer langanhaltenden Immunität führt. Besseres Verständnis der immunologischen Mechanismen dieser Impfung könnte das rationale Design besserer Impfstoffe in der Zukunft ermöglichen.

Die Infektion mit Flaviviren wird mithilfe von verschiedenen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt. Von herausragender Bedeutung ist die Detektion viraler Nukleinsäuren durch RNA-Sensoren aus der Familie der *RIG-I-like*-Rezeptoren und der *Toll-like*-Rezeptoren. Die RLR (siehe Abschnitt 1.1.3) lösen antivirale Genprogramme als Antwort auf Virus-RNA im Zytosol aus, TLR erkennen RNA hingegen im endosomalen Kompartiment oder extrazellulär. Erkennung durch RIG-I konnte für alle untersuchten Mitglieder der Flavivirusfamilie nachgewiesen werden, für WNV und DENV konnte auch eine MDA5-Aktiverung gezeigt werden. Für TLR3 und TLR7 ist eine Rolle in der angeborenen Immunantwort im Zuge von einigen Flavivirusinfektionen beschrieben (Nazmi et al. 2014). So konnte ein protektiver Effekt von TLR3 bei der Infektion mit West-Nil-Virus gezeigt werden (Daffis et al. 2008).

Für das Gelbfieberimpfvirus im Speziellen konnte eine Abhängigkeit der Immunantwort in dendritischen Zellen von den *Toll-like*-Rezeptoren TLR2, TLR7, TLR8 und TLR9 im

Mausmodell gezeigt werden. Hier wurden unterschiedlich polarisierte T-Zell-Antworten in Abhängigkeit vom TLR-*Signaling* beobachtet (Querec et al. 2006). Die Aktivierung von zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren mit ihrer Kinetik in menschlichen Zellen und die molekularen Voraussetzungen der Liganden der RNA-Sensoren sind für das Gelbfieberimpfvirus bislang nicht bekannt.

1.2.4 Das Gelbfieberimpfvirus YF-17D

In den 1930er Jahren entwickelte Max Theiler eine Impfung gegen die Infektion mit dem Gelbfiebervirus, für die er 1951 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielt. Bei dem Impfstoff handelt es sich um ein attenuiertes Virus, das durch serielle Passagierung in Mausgeweben und Hühnerembryonen generiert wurde. Das so entstandene Virus mit der Bezeichnung YF-17D ist genetisch zu 99,4 % identisch mit dem pathogenen Gelbfiebervirusstamm Asibi. Sie unterscheiden sich lediglich in 68 Basen, die in 32 unterschiedlichen Aminosäuren resultieren (Pulendran 2009). Die Grundlage der Attenuierung ist bislang nicht bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das E-Protein am stärksten von Mutationen betroffen ist und das Impfvirus über einen anderen Mechanismus in die Zelle eindringt (Fernandez-Garcia & Meertens et al. 2016). Die Gelbfieberimpfung gilt als eine der erfolgreichsten Vakzinen der Geschichte mit über 800 Millionen verabreichten Dosen weltweit seit ihrer Einführung. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass es bei über 95 % der Geimpften nach einer einzigen Verabreichung zu einer neutralisierenden Antikörperreaktion kommt. Außerdem handelt es sich um einen langanhaltenden Schutz, sodass die WHO im Jahr 2014 eine einzelne Dosis als ausreichend für lebenslangen Schutz befunden hat und diese Empfehlung seit 2016 umgesetzt wird (Staples et al. 2020).

Nach der Injektion infiziert das Impfvirus Zellen und beginnt sich zu replizieren, sodass sich eine Virämie mit einem Gipfel nach fünf bis sieben Tagen entwickelt (Akondy et al. 2015). Als Reaktion auf das Virus kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und damit Einleitung einer adaptiven Immunantwort. Dies führt neben der Produktion von neutralisierenden Antikörpern durch B-Zellen auch zu einer potenten und langanhaltenden T-Zell-Immunität (Wieten & Jonker et al. 2016).

Aufgrund der hervorragenden immunologischen Eigenschaften und der jahrzehntelangen Erfahrung mit dem YF-17D-Virus stellt es auch heute noch eine bedeutende Plattform für die Forschung und Entwicklung neuer Impfstoffe dar. So basieren die Vakzinen gegen Japanische Enzephalitis (IMOJEV®, Zulassung in

Australien 2012) und Dengue-Fieber (Dengvaxia®, Zulassung durch EMA 2018) auf dem Gelbfieberimpfvirus. Bei diesen Lebendimpfungen handelt es sich um chimäre Viren, bei denen die Strukturproteine E und prM von YF-17D durch die von JEV beziehungsweise DENV1-4 ersetzt wurden (Appaiahgari & Vrati 2010, Tripathi & Shrivastava 2018). Eine auf dem Gelbfieberimpfvirus basierende Vakzine gegen SARS-CoV-2 konnte auch vielversprechende präklinische Ergebnisse erzielen (Sanchez-Felipe et al. 2020). Jenseits der Prophylaxe von Infektionskrankheiten wurde vor kurzem eine potenzielle Anwendung von YF-17D in der Immuntherapie von Krebserkrankungen aufgezeigt. Intratumorale Applikation des Virus führte zur Entstehung von antitumoralen CD8⁺-T-Zellen und der Regression sowohl des direkt behandelten Tumors als auch von weiteren Tumoren an anderen Lokalisationen (Aznar et al. 2020).

1.3 Fragestellung

Die Mechanismen, wie eine effektive Immunantwort generiert werden kann, sind von enormem naturwissenschaftlichem und medizinischem Interesse. Sowohl die zunehmende Bedeutung von Immuntherapien bei Krebserkrankungen als auch die fieberhafte Entwicklung von neuen Impfstoffen im Zuge der SARS-CoV-2-Pandemie zeugen davon. Obwohl Impfungen seit über 200 Jahren verwendet werden, sind die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen nicht vollständig erforscht. Am Anfang jeder adaptiven Immunantwort steht die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Hier werden bereits die Weichen für die Art der B- und T-Zell-Antwort gestellt. Ein tiefergreifendes Verständnis für diese frühen Vorgänge könnte neue Möglichkeiten bei der rationalen Entwicklung von Impfungen und Immuntherapien eröffnen.

Das Gelbfieberimpfvirus hat sein Potenzial als hervorragende Impfung über die letzten nahezu einhundert Jahre gezeigt. In der näheren Vergangenheit haben sich jedoch weitere Anwendungsgebiete für dieses Virus aufgetan. So wurden neue Vakzinen gegen das Japanische-Enzephalitis-Virus und Dengue-Virus erfolgreich daraus entwickelt und Impfstoffkandidaten gegen SARS-CoV-2 generiert. Auch Versuche in der Tumor-Therapie lieferten vielversprechende Ergebnisse. Trotzdem ist bisher die Erkennung von YF-17D durch das angeborene Immunsystem unvollständig erforscht.

Die Arbeit steht im Zusammenhang mit einer Studie der Arbeitsgruppe, in der über 200 Probanden gegen Gelbfieber geimpft wurden. Vor der Impfung und zu definierten

Zeitpunkten danach wurden hier biologische Materialien (unter anderem Serum, mononukleäre periphere Blutzellen, Speichel und Plasma/Urin/Stuhl) gesammelt, um die angeborene und adaptive Immunantwort auf diese Impfung beziehungsweise Virusinfektion zu charakterisieren. Die hier beschriebenen Experimente sollen komplementär molekulare Aspekte der angeborenen Immunantwort im Zuge der Gelbfieberimpfung *in vitro* beschreiben.

Dabei sollten insbesondere die intrazellulären Rezeptoren der angeborenen Immunität identifiziert werden, die die Infektion mit dem Gelbfiebervirus 17D erkennen. Darüber hinaus sollten die (notwendigen) molekularen Muster beschrieben werden, welche eine antivirale Antwort im Zuge der Gelbfieberimpfung auslösen. Auch die Kinetik der Entstehung von Pathogen-assoziierten molekularen Mustern und der Immunantwort sollte untersucht werden. Da es sich bei der Gelbfieberimpfung um eine Lebendimpfung handelt und diese im Allgemeinen eine länger anhaltende Immunität mit sich bringen als nicht replizierende Totimpfstoffe, sollte der Einfluss des viralen Replikationsgeschehens auf die initiale Immunantwort näher beleuchtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte

Alpha <i>Imager</i> HP	Alpha Innotech (San Leandro, USA)
Axio Vert.A1 Mikroskop	Zeiss (Jena, DE)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Hanau, DE) ^[L]_{SEP}]
ChemiDoc <i>Imaging</i> System	Bio-Rad (München, DE)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
GeneTouch <i>Thermal Cyclers</i>	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
LaminAir <i>Flow</i> HB 2448	Heraeus (Hanau, DE) ^[L]_{SEP}]
<i>LightCycler</i> 480	Roche (Mannheim, DE)
Mikrozentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg, DE)
Mithras LB 940 <i>Microplate Reader</i>	Berthold (Bad Wildbad, DE)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, DE)
Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, DE)
NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TCS SP5 Konfokalmikroskop	Leica (Wetzlar, DE)
Vortex VF2	Janke & Kunkel (Staufen, DE)
Waage Modell CPA1003S	Sartorius (Göttingen, DE)
Zählkammer Neubauer - <i>Improved</i>	Labor Optik (Lancing, UK)

2.1.2 Kits

GeneJET Plasmid <i>Miniprep Kit</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Human IP-10 ELISA Set	BD Biosciences (San Diego, USA)
In-Fusion HD <i>Cloning Kit</i>	Takara Bio (Mountain View, USA)
Kapa Probe Fast qPCR <i>Master Mix Kit</i>	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
Mix2Seq Kit	Eurofins Genomics (Ebersberg, DE)

peqGOLD Total RNA <i>Kit</i>	VWR (Radnor, USA)
TRIzol <i>Reagent</i>	Life Technologies (Carlsbad, USA)
Zymoclean Gel DNA <i>Recovery</i>	Zymo Research (Irvine, USA)

2.1.3 Enzyme

BbsI	New England Biolabs (Ipswich, USA)
FastAP	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RevertAid H Minus reverse Transkriptase	Thermo Scientific (Waltham, USA)
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific (Waltham, USA)
RiboShredder	Epicentre (Madison, USA)
RNA 5' Polyphosphatase	Epicentre (Madison, USA)
RNase III	Epicentre (Madison, USA)
RNase R	Epicentre (Madison, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T4 Polynucleotide Kinase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
T7 Endonuklease I	New England Biolabs (Ipswich, USA)

2.1.4 Zellkultur und Transfektionsreagenzien

Blasticidin	Invivogen (San Diego, USA)
Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	Gibco (Grand Island, USA)
L-Glutamin	Lonza (Basel, CH)
Lipofectamine RNAiMAX	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Opti-MEM	Gibco (Grand Island, USA)
Penicillin-Streptomycin <i>mixture</i>	Lonza (Basel, CH)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Puromycin	Invivogen (San Diego, USA)
TransIT-X2	Mirus Bio (Madison, USA)
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)

Zelllinien

1205Lu	Zur Verfügung gestellt von Dr. Robert Besch (Ludwig-Maximilians-Universität)
BHK-21	Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, USA)
Vero	Bezogen von <i>American Type Culture Collection</i> (ATCC, Manassas, USA)

2.1.5 Reagenzien und Chemikalien

2-Propanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Agarose	Biozym Scientific (Oldendorf, DE)
Cycloheximide (CHX)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
DNA <i>loading dye</i> (6x)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
DNA <i>Stain Clear G</i>	Serva (Heidelberg, DE)
Ethanol	Merck (Darmstadt, DE)
Kristallviolett	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Methanol	Merck (Darmstadt, DE)
Mowiol 4-88	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
QuickExtract DNA <i>Extraction Solution</i>	Epicentre (Madison, USA)
Ribavirin	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
ROTIPHORESE 50x TAE Puffer	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Salzsäure 1 M (HCl)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

Schwefelsäure 2 N (H ₂ SO ₄)	Carl Roth (Karlsruhe, DE)
Substrate <i>Reagent A</i> (ELISA)	BD Biosciences (San Diego, USA)
Substrate <i>Reagent B</i> (ELISA)	BD Biosciences (San Diego, USA)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Trypan Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, DE)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, DE)

2.1.6 Puffer und Medien

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>Einfriermedium</u>	<u>ELISA-Coating-Puffer</u>
DMEM mit	FCS mit	1,0 l dH ₂ O mit
9 Vol.-% FCS	10 Vol.-% DMSO	7,13 g NaHCO ₃
2 mM L-Glutamin		1,59 g Na ₂ CO ₃
100 IU/ml Penicillin		pH auf 9,5 titriert mit 10N
100 µg/ml Streptomycin		NaOH
<u>ELISA-Assay-Diluent</u>	<u>ELISA-Waschpuffer</u>	<u>Blocking-Puffer</u>
PBS mit	PBS mit	<u>(Immunfluoreszenz)</u>
9 Vol.-% FCS	0,05 Vol.-% Tween-20	PBS mit
		1 Vol.-% Triton X-100
		10 Vol.-% Normal Goat
		Serum (NGS)
<u>LB-Medium (Luria/Miller)</u>	<u>Kristallviolett-Lösung</u>	
1,0 l dH ₂ O mit	dH ₂ O mit	
10 g Trypton	50 Vol.-% Ethanol	
5 g Hefeextrakt	5 g/l Kristallviolett	
10 g NaCl	8 g/l NaCl	
	50 g/l Paraformaldehyd	

2.1.7 Antikörper

Alme-1 (Anti-RIG-I)	AdipoGen (Liestal, CH)
---------------------	------------------------

FL-335 (Anti-GAPDH)	Santa Cruz (Dallas, USA)
<i>Goat anti-Mouse</i> IgG Alexa Fluor 647	Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Goat anti-Rabbit</i> IgG Alexa Fluor 488	Invitrogen (Carlsbad, USA)
J2 (Anti-dsRNA)	Scicons (Szirák, HU)

2.1.8 Oligonukleotide

<u>qPCR</u>		<u>Sonde</u>
CXCL10 F	GAAAGCAGTTAGCAAGGAAAGGT	UPL 34
CXCL10 R	GACATATACTCCATGTAGGGAAGTGA	
GAPDH F	AGCCACATCGCTCAGACAC	UPL 60
GAPDH R	GCCCAATACGACCAAATCC	
IFN- β F	CGACACTGTTCTGTGTTGTCA	UPL 25
IFN- β R	GAGGCACAACAGGAGAGCAA	
YFV-5'-UTR F	GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC	5' UTR Sonde
YFV-5'-UTR R	TGCTAATCGCTCAACGAACG	5' UTR Sonde
5' UTR Sonde	6-FAM-ATCGAGTTGCTAGGCAATAAACAC-BHQ-1	

<u>Klonierung</u>	
MDA5 sgRNA F	CACCGAGGGCTGCCGGTTCTCCGG
MDA5 sgRNA R	AAACCCGGAGAACCGGCAGCCCTC
RIG-I sgRNA F	CACCGGGTCTTCCGGATATAATCC
RIG-I sgRNA R	AAACGGATTATATCCGGAAGACCC
YFV-17D-dGDD F	GCCAGATGTTCTCGAGAACTGGAATTGCTCCAAAGGAGG
YFV-17D-dGDD R	AAACGTCTTGCTCGAGCTTAAGTGGTTTTGTGTTTGTGCATC

<u>PCR für T7-Endonuklease-Assay</u>	
RIG-I Primer F	CCAGCCAAGCACACAGTAGA

RIG-I Primer R	GGGAAACGAAACTAGCCCGA
MDA5 Primer F	AGGCACAGAGCGGTAGACC
MDA5 Primer R	CACATTTGGAAAGGGGCAAACG

<i>Massive parallel sequencing</i>	
NGS MDA5 CRISPR F	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTAGGT GAAGG AGCAGATTCAGAG
NGS MDA5 CRISPR R	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTGGAG GTTCA GCAGTTGGAGATA
NGS RIG-I CRISPR F	ACACTCTTTCCTACACGACGCTCTTCCGATCTTTAAA GCTAG TGAGGCACAGCC
NGS RIG-I CRISPR R	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCTTTAA AAGAAG GGAACGAAGCAA

2.1.9 Software

Benchling	Benchling (San Francisco, USA)
Excel 16	Microsoft (Redmond, USA)
Inkscape 1	Inkscape Project (New York, USA)
LightCycler 480 Software	Roche (Basel, CH)
Photoshop CS6	Adobe (San Jose, USA)
Prism 8	GraphPad Software (La Jolla, USA)
SnapGene 4	GSL Biotech (San Diego, USA)
Word 16	Microsoft (Redmond, USA)

2.1.10 Viren

Stamaril (YF 17D-204)	Sanofi-Aventis (Frankfurt am Main, DE)
-----------------------	--

2.2 Methoden

2.2.1 Zellulär-Immunologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Vollmedium ergänzt mit 9 % fetalem Kälberserum (FCS), 1 % L-Glutamin und den Antibiotika Penicillin sowie Steptomycin kultiviert (DMEM+++). Die Zellen wuchsen im Brutschrank bei 37° C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einer CO₂-Konzentration von 5 %. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt. Die Kulturen wurden außerdem regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen getestet. Bei einer Konfluenz von 70 % bis 95 % wurden die Zellen mittels Trypsin abgelöst und ein Teil von ihnen in frischem Medium wieder ausgesät. Für mittelfristige und längere Lagerung wurden die Zelllinien in fetalem FCS mit zehn Volumenprozent Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80° C beziehungsweise in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Zur Quantifizierung von CXCL10 wurden *Enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISA) basierend auf einem Kit der Firma BD Biosciences verwendet. Die Bestimmungen wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt, jedoch in „Half-area“-96-Well-Platten mit halbierten Volumina (50 µl pro Well). Die Platten wurden über Nacht bei 4° C mit dem Capture-Antikörper beschichtet. Unspezifische Bindung wurde durch einstündige Inkubation mit PBS mit 10 % FCS (*Assay Diluent*) bei Raumtemperatur verhindert. Alle Proben und Standards wurden ebenfalls in *Assay Diluent* verdünnt. Nach zweistündiger Inkubation mit den Proben und Standards folgte eine einstündige Inkubation mit dem biotinylierten *Detection*-Antikörper und der Meerrettich-Peroxidase (HRP) mit Streptavidin-Tag. Danach folgte eine 15 bis 30 Minuten lange Inkubation mit dem Substrat (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid). Anschließend wurden 25 µl 2 N Schwefelsäure (H₂SO₄) hinzugefügt, um die Reaktion zu stoppen, und die Absorption bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

2.2.1.3 Transfektion von Zellen

Nukleinsäuren wurden mittels Lipofektion in die Zielzellen eingebracht. Für die Transfektion mit RNA wurde *Lipofectamine RNAiMAX* (*Invitrogen*) verwendet. Pro Well einer 96-Well-Platte mit 100 µl Medium wurden 20 µl Transfektions-Ansatz verwendet.

Dieser setzte sich aus 0,2 μ l *RNAiMAX* verdünnt in 10 μ l *Opti-MEM* (*Gibco*) und einer bestimmten Menge RNA verdünnt in 10 μ l *Opti-MEM* zusammen. Für die Stimulation mit doppelsträngiger RNA mit einer 5'-Triphosphatgruppe (pppRNA) wurde eine finale Konzentration von 500 ng/ml verwendet. Poly I:C wurde in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze zusammengeführt, sofort gevortext und für fünf Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 20 μ l des Gemisches pro Well hinzugefügt. Für die Transfektion von Zellen mit Plasmiden wurde TransIT-X2 (*Mirus*) verwendet. Hier wurde nach Herstellerprotokoll vorgegangen.

2.2.1.4 Plaque-Assay

Der Plaque-Assay stellt eine Möglichkeit dar, die Anzahl infektiöser Viruspartikel in einer Probe zu quantifizieren. Hierzu werden Zellen mit verschiedenen Verdünnungen einer virusenthaltenden Probe infiziert und danach mit einem Agarose-Deckel versehen, der eine Ausbreitung von neu produzierten Viren verhindert. Nach einer Inkubationszeit werden die Zellen gefärbt und die Anzahl der Löcher im Zellrasen (Plaques) ausgezählt. Nach Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor kann dann die Konzentration der infektiösen Partikel in *Plaque forming units* (PFU) pro Milliliter angegeben werden.

Zur Quantifizierung von funktionellen Gelbfieber-17D-Viruspartikeln wurden BHK-21-Zellen in 6-Well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von annähernd 100 % wachsen gelassen. Danach wurden die Überstände abgenommen, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 1 ml/Well der Virusverdünnungen aufgetragen. Das Virus wurde dafür in *Opti-MEM* seriell verdünnt. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und die Zellen ein weiteres Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml/Well der Deckellösung aufgetragen. Die Deckellösung wurde hergestellt, indem eine 1%ige Agaroselösung in PBS kurz aufgekocht wurde. Nachdem diese auf zirka 50° C abgekühlt war, wurde sie mit einem gleichem Volumen DMEM+++ vermischt und zügig aufgetragen. Die Platten wurden anschließend für drei Tage bei 37° C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Danach wurde der Agarosedeckel vorsichtig entfernt und die Zellen mit einer Kristallviolettlösung (0,5 % Kristallviolett, 0,8 % NaCl, 5 % Formaldehyd, 50 % Ethanol in dH₂O) gefärbt. Nach zwei Waschschritten mit Leitungswasser wurden die makroskopisch sichtbaren Plaques ausgezählt.

2.2.1.5 Virusproduktion

Die Produktion von YF-17D-Virus wurde in BHK-21-Zellen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen bei einer Konfluenz von zirka 70 % in T-75 oder T-175 Zellkulturflaschen mit einer MOI von 0,1 PFU/Zelle infiziert. Nach 48 h wurde der Überstand abgenommen, zentrifugiert, gefiltert, aliquotiert und bei -80° C weggefroren.

2.2.1.6 Immunfluoreszenz für konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Für den mikroskopischen Nachweis von doppelsträngiger RNA und RIG-I-Expression wurde Immunfluoreszenz in Verbindung mit konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie angewandt. Hierzu wurden 5×10^4 1205Lu-Wildtypzellen pro Well in 1 ml DMEM+++ auf Deckgläschen in 24-Well-Platten ausgesät. Die Deckgläschen wurden zuvor über Nacht in 1 M Salzsäure (HCl) eingelegt, anschließend mit Wasser gründlich abgespült und bis zur Verwendung in 70%igem Ethanol aufbewahrt. Bevor sie in die 24-Well-Platte platziert wurden, wurden Ethanolreste durch mehrere Waschschrte mit sterilem PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen ausgesät und für 24 Stunden bei 37° C im Inkubator belassen. Anschließend erfolgte die Infektion mit einer MOI von 1 PFU/Zelle durch Zugabe von YF-17D.

12, 24, 48 oder 72 Stunden nach der Infektion wurde das Medium entfernt und nach einem Waschschrte mit PBS mit 4 % Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten bei 37° C fixiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen, mit PBS ersetzt und die Zellen bis zur Färbung bei 4° C gelagert.

Für die Immunfluoreszenz-Färbung wurden die Zellen zweimal für 5 Minuten mit PBS gewaschen und nachfolgend zweimal für 5 Minuten mit PBS mit 0,3 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit *Blocking*-Puffer (PBS, dem 0,3 % Triton X-100 und 3 % *Normal goat serum* (NGS) zugesetzt war) abgesättigt. Die Färbung mit den primären Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4° C in *Blocking buffer*. Die monoklonalen Maus-Antikörper gegen RIG-I (Alme-1, *AdipoGen*) beziehungsweise dsRNA (J1, *Scicons*) wurden 1:200 verdünnt, der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen GAPDH (FL-335, *Santa Cruz Biotechnology*) 1:100. Am Folgetag erfolgten drei Waschschrte mit PBS mit 0,3 % Triton X-100 und anschließend die Inkubation mit den sekundären Antikörpern, 1:500 in *Blocking buffer* verdünnt, für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als sekundäre Fluorophor-gekoppelte Antikörper wurden *Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor 488*

(Invitrogen) und *Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 647* (Invitrogen) verwendet. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS + Triton X-100 wurde die DNA mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in PBS 1:1000 verdünnt für drei Minuten gegengefärbt. Abschließend wurden die Deckgläschen mit den Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit 20 μ l Mowiol 4-88 (Carl Roth) auf die Objektträger aufgetragen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet. RNA-Proben für die reverse Transkription und Analyse mittels qPCR wurden über Silica-Filter in Zentrifugationssäulen (peqGOLD Total RNA Kit, *VWR Peqlab*) extrahiert. Die RNA aus (infizierten) Zellen und Viruspartikeln zur Transfektion von Zellen wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (peqGOLD TriFast, *VWR Peqlab*) gewonnen. Es wurde jeweils nach Hersteller Protokoll vorgegangen.

2.2.2.2 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurde *RevertAid H Minus Reverse Transcriptase* (*ThermoFisher*) und der mitgelieferte Puffer verwendet. Es wurden generell 20 μ l Ansätze genutzt. Wenn größere Mengen cDNA benötigt wurden, wurden alle Volumina verdoppelt.

20- μ l-Ansatz:

- 4 μ l 5x Puffer
- 0,5 μ l RevertAid H Minus (*Thermo Scientific*)
- 1 μ l Oligo-dT-Primer
- 1 μ l Random Hexamer Primer
- 0,5 μ l RiboLock RNase Inhibitor (*Thermo Scientific*)
- 2 μ l dNTPs
- 11 μ l RNA

Die Mischung aus Oligo-dT-Primer und Random Hexamer Primer ist darauf zurückzuführen, dass häufig neben mRNA auch virale RNA umgeschrieben werden sollte. Da die YF-17D-RNA nicht polyadenyliert ist, konnten hierzu keine Oligo-dT-Primer verwendet werden.

2.2.2.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) beruht auf dem Prinzip der klassischen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), es wird jedoch nach jedem Zyklus die Menge an PCR-Produkt durch eine Fluoreszenzmessung bestimmt. Dadurch kann auf die initial eingesetzte Menge einer DNA geschlossen werden.

In den durchgeführten Experimenten wurden Hydrolyse-Sonden aus der *Universal Probe Library (Roche)* verwendet. Dabei handelt es sich um kurze (8-9 Basen) Oligonukleotide, die am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (6-FAM) und am 3'-Ende mit einem *Quencher* markiert sind. Die Sonden binden sequenz-spezifisch an ein Stück DNA im Amplikon und werden bei der Synthese des neuen DNA-Strangs durch die 5'→3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase hydrolysiert. Durch die Spaltung der Sonde sind der Quencher und der Fluoreszenzfarbstoff nicht mehr in der ursprünglichen räumlichen Nähe zueinander und das Fluoreszenz-Signal wird nicht mehr unterdrückt. Die Sonden aus der *Universal Probe Library* nutzen *Locked Nucleic Acids*, welche die Spezifität ihrer Basenpaarung steigert. Der Vorteil von Hydrolyse-Sonden besteht darin, dass nur ein Signal entsteht, wenn die Sonde im Amplikon bindet. Werden also unspezifische DNA-Abschnitte amplifiziert, weil die verwendeten Primer noch andere Sequenzen binden, entsteht dadurch keine zusätzliche Fluoreszenz, wenn nicht zusätzlich die verwendete Sonde innerhalb der unspezifischen Basenabfolge bindet.

qPCR wurde im 96-Well-Format durchgeführt mit 10- μ l-Ansätzen:

- 5 μ l KAPA PROBE FAST 2x Master Mix
- 0,2 μ l forward Primer
- 0,2 μ l reverse Primer
- 0,1 μ l Sonde
- 0,5 μ l H₂O
- 4 μ l cDNA

Zur Amplifikation der entsprechenden Transkripte wurden die im Material-Teil aufgeführten Primer verwendet. Als Sonden wurden für CXCL10 die *Probe #34*, für IFN- β die *Probe #25* und für GAPDH die *Probe #60* der *Universal Probe Library (Roche)* verwendet. Die Reaktion wurde in einem LightCycler 480 (*Roche*) durchgeführt. Das angewandte Programm war eine *two-step PCR*:

- 1x Prä-Inkubation: 10 Minuten, 95° C
- 45x Amplifikation: 10 Sekunden, 95° C

30 Sekunden, 60° C

Fluoreszenzmessung

- 1x Abkühlen: 30 Sekunden, 40° C

2.2.2.4 Transformation von Bakterien und Plasmid-Präparation

Zur Herstellung von Plasmid-DNA wurde der Escherichia-coli-Stamm DH5 α verwendet. Die Zellen wurden mittels Hitzeschock-Protokoll transformiert. Hierzu wurden die Bakterien für 5 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend der Ligationsansatz beziehungsweise die Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock bei 42° C für 45 Sekunden. Nach einer letzten fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien auf Agar-Platten mit 100 μ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37° C im Brutschrank belassen.

Am Folgetag wurden Flüssigkulturen aus 5 ml LB-Medium mit einzelnen Bakterien-Kolonien beimpft und über Nacht bei 37° C auf einem Schüttler inkubiert. Die Isolation erfolgte mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit (*Thermo Scientific*) nach Herstellerangaben.

2.2.2.5 Gelelektrophorese

Zur Größenauftrennung und Visualisierung von DNA wurden Gele aus 1 % Agarose-Pulver in TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verwendet. Zur Färbung der DNA wurde DNA Stain Clear G (*SERVA*) dem Gel zugesetzt. Die DNA-Probe wurde mit DNA Gel Loading Dye 6x (*Thermo Scientific*) vermischt, auf das Gel aufgetragen und bei 110 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht.

2.2.2.6 Einfügen der sgRNA-Sequenzen in die eSpCas9(1.1)-Plasmide

Um die Gen-spezifischen sgRNA-Sequenzen in das eSpCas9(1.1)-Plasmid einzubringen, wurden teilkomplementäre Oligonukleotide verwendet, die für die sgRNA kodieren. An ihren 5'-Enden enthielten diese einen Abschnitt aus vier nicht zueinander komplementären Basen, der als Überhang zum Einfügen in das linearisierte Plasmid diente. Hierzu wurden 2 μ g des Ausgangsplasmids mit BbsI verdaut und per Gelelektrophorese gefolgt von Gelextraktion aufgereinigt. Die Oligonukleotide wurden phosphoryliert und aneinander angelagert. Abschließend wurden die Fragmente ligiert und Bakterien mit den so entstandenen Plasmiden transformiert.

Phosphorylieren und Annealen:

- 6 μl dH₂O
- 1 μl T4-Ligase-Puffer (*NEB*)
- 1 μl Oligonukleotid F (100 μM)
- 1 μl Oligonukleotid R (100 μM)
- 1 μl T4 Polynucleotide Kinase (*NEB*)

Cycler-Programm:

- 37° C für 30 min
- 95° C für 5 min
- Mit 1° C/min auf 20° C kühlen

Ligation:

- 2,5 μl aufgereinigtes linearisiertes Plasmid
- 6 μl Insert (1:200 verdünnt)
- 1 μl T4-Ligase-Puffer (*NEB*)
- 0,5 μl T4 Ligase (*NEB*)

Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min, anschließend Transformation von DH5 α .

2.2.2.7 In-Fusion-Klonierung

Für die Erstellung komplexerer Konstrukte wurde auf In-Fusion HD Cloning (*Takara Bio*) zurückgegriffen. Hierbei handelt es sich um eine Methode zur direktionalen Klonierung, die auf homologen DNA-Sequenzen basiert. Um ein DNA-Fragment in einen Vektor einzufügen, wurden Primer designt, an deren 5'-Enden je 15 Basenpaare hinzugefügt wurden, die in ihrer Abfolge der Sequenz des Vektors an der Insertionsstelle entsprachen. Diese wurden folgend dazu genutzt, um mittels PCR Inserts zu kreieren, welche an ihren Enden mit dem Zielvektor überlappende Basenfolgen aufwiesen. Der Vektor wurde entweder mittels Restriktionsverdau oder durch inverse PCR linearisiert. Danach wurden sowohl Insert als auch Vektor mittels Gelelektrophorese mit anschließender DNA-Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurden linearisierte Vektor-DNA und das einzufügende DNA-Fragment mit dem In-Fusion-Enzym zusammengeführt und für 15 min bei 50° C inkubiert. Hierbei entstehen einzelsträngige Überhänge an den Enden der doppelsträngigen DNA, wobei die Sequenzen der Inserts komplementär zu denen der Vektoren sind. Dadurch kommt es zu einer Basenpaarung zwischen Insert und Vektor. Anschließend wurde der Reaktionsansatz verwendet, um

Bakterien zu transformieren. Im Bakterium werden dann die bereits angelagerten DNA-Enden von bakteriellen Enzymen zu einem durchgehenden Strang ligiert.

PCR-Reaktion:

- 12,5 μ l CloneAmp HiFi PCR Premix (*Takara Bio*)
- 1 μ l Primer F
- 1 μ l Primer R
- 9,5 μ l H₂O
- 1 μ l DNA (entspricht 50 ng)

In-Fusion-Reaktion:

- 1 μ l 5x In-Fusion HD Enzyme Premix (*Takara Bio*)
 - Linearisierter Vektor
 - Insert
- } molares Verhältnis Insert:Vektor = 2:1
- Auf 5 μ l auffüllen mit dH₂O

2.2.2.8 Genome editing mit CRISPR/Cas9

Zellen mit funktioneller Deletion von sowohl RIG-I als auch MDA5 wurden mit dem CRISPR/Cas9-System generiert. Hierzu wurden Plasmide (eSpCas9(1.1)) kloniert, die für das Protein eSpCas9 (Slaymaker & Gao et al. 2016) und ein Resistenzgen (Puromycin-Resistenz für den MDA5-KO, Blasticidin-Resistenz für den RIG-I-KO) sowie für die jeweils Gen-spezifische *Single guide RNA* (sgRNA) kodieren. Die sgRNA für den MDA5-KO wurde mithilfe des Online-Programmes „CHOPCHOP“ (Labun & Montague et al. 2016) designt. Für die sgRNA zum Ausschalten von RIG-I wurde auf eine zuvor in der Arbeitsgruppe verwendete und validierte Sequenz zurückgegriffen (Helms et al. 2019).

3,5 x 10⁵ 1205Lu-Wildtypzellen wurden in 6-Well-Platten in DEMEM+++ ausgesät und am Folgetag mit je 300 ng/Well der eSpCas9(1.1)-Plasmide ko-transfiziert beziehungsweise als Kontrollen unbehandelt belassen. Die Transfektion wurde mit TransIT-X2 (*Mirus*) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Doppelselektion der erfolgreich transfizierten Zellen wurde nach 48 Stunden das Medium abgenommen und durch DMEM+++ mit 15 μ g/ml Blasticidin und 2 μ g/ml Puromycin ersetzt. Nachdem in den nicht-transfizierten Kontrollen sämtliche Zellen abgestorben waren, wurde die Selektion beendet. Bei einer Konfluenz von circa 80 % wurden die Zellen mit Trypsin von den Platten abgelöst und ein Teil der Zellen auf eine Konzentration von 4 Zellen/ml

verdünnt, während die restlichen Zellen weiter in Kultur expandiert wurden. Um Einzelzellklone zu erhalten wurden anschließend 96-Well-Platten mit 150 μ l der verdünnten Zellsuspension pro Well versehen (entspricht 0,6 Zellen/Well).

Als erste Kontrolle, ob es zu einer erfolgreichen Modifikation der gewünschten Gene gekommen war, wurde ein T7-Endonuklease-Assay durchgeführt. Bei positivem Ergebnis wurde ein Teil jedes Einzelzellklons zur späteren Verwendung eingefroren und ein Teil zur DNA-Extraktion für die Validierung des *Knock-outs* durch *Massive parallel sequencing* verwendet.

2.2.2.9 T7-Endonuklease-Assay

Die T7-Endonuklease erkennt und schneidet doppelsträngige DNA mit Basenfehlpaarungen. Diese Funktion bietet die Möglichkeit den Erfolg von Genom-Manipulationen mittels CRISPR/Cas9 abzuschätzen. Hierzu wurde DNA aus Zellen isoliert, in denen versucht wurde mit dem CRISPR/Cas9-System die Expression von RIG-I und MDA5 auszuschalten. Zusätzlich wurde DNA aus unbehandelten Wildtyp-Zellen gewonnen. Die genomische DNA wurde als Matrize für eine PCR-Reaktion verwendet, in der die Zielregion der sgRNA amplifiziert wurde. Anschließend wurden die PCR-Produkte aus den zu testenden KO-Zellen und WT-Zellen gepoolt und durch Erhitzen und langsames Abkühlen Heteroduplexe aus DNA-Strängen mit und ohne Mutationen gebildet. Darauffolgend wurde die DNA mit der T7-Endonuklease verdaut und mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Wenn durch das Enzym Cas9 in der Zelle eine Mutation in der Zielregion provoziert wurde, zeigten sich nach dem T7-Verdau zwei zusätzliche Banden auf dem Agarosegel im Gegensatz zu der einzelnen Bande in der unbehandelten Wildtypkontrolle.

PCR-Ansatz:

- 10 μ l 5x Phusion HF Puffer (NEB)
- 1 μ l 10 mM dNTP
- 2,5 μ l 10 mM Primer F
- 2,5 μ l 10 mM Primer R
- 31,5 μ l H₂O
- 0,5 μ l Phusion DNA Polymerase (NEB)

PCR-Cycler-Programm:

- 98° C für 30 s
 - 98° C für 10 s
 - 67° C für 20 s
 - 72° C für 30 s
 - 72° C für 5 min
 - 4° C
- } x 32

Heteroduplex-Annealing

- 95° C für 10 min
- Von 95° C auf 4°C mit -4° C/s

T7-Endonuklease-Ansatz:

- 2 μ l 10x NEBuffer 2
- 10 μ l annealtes PCR-Produkt
- 7 μ l dH₂O
- 1 μ l T7-Endonuklease

T7-Endonuklease-Ansatz wurde bei 37° C für 20 Minuten inkubiert.

2.2.3 Statistische Analyse

Für die statistische Analyse von Unterschieden zwischen Mittelwerten unterschiedlicher Gruppen wurden die Daten zuerst auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test geprüft. War die Verteilung der Daten mit einer Normalverteilung vereinbar, wurde der Welch-Test zur Analyse auf signifikante Unterschiede angewandt. Wurden mehrere Gruppen innerhalb eines Experiments miteinander verglichen, wurde die Alphafehler-Kumulierung mittels Bonferroni-Korrektur für multiples Testen neutralisiert. Alle statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software Prism 8 (*GraphPad*) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Erkennung des Gelbfieberimpfvirus 17D durch *RIG-I-like*-Rezeptoren

3.1.1 Das Gelbfieberimpfvirus 17D wird sowohl in RIG-I-defizienten als auch in MDA5-defizienten humanen Zellen erkannt

Da die *RIG-I-like*-Rezeptoren eine bedeutende Rolle in der intrazellulären Erkennung von RNA-Viren spielen, erscheint es wahrscheinlich, dass RIG-I und MDA5 an der Immunantwort im Zuge der Gelbfieberimpfung beteiligt sind. Deshalb wurden Experimente mit Zelllinien durchgeführt, in denen jeweils einer der genannten Rezeptoren genetisch deletiert wurde. Außerdem wurden Zellen mit einem MAVS-*Knock-out* (KO) verwendet, in welchen die Signaltransduktion von MDA5 und RIG-I unterbrochen ist.

Zum Nachweis einer Erkennung von YF-17D durch das angeborene Immunsystem wurde die Produktion von CXCL10 als Marker für eine Typ-I-Interferon-Antwort gemessen (Brownell et al. 2014). Hierzu wurden Wildtyp-, MDA5-KO-, RIG-I-KO- oder MAVS-KO-1205Lu-Zellen mit dem Gelbfieberimpfvirus und einer *Multiplicity of infection* (MOI) von 1 PFU/Zelle infiziert. Um klonale Effekte von CRISPR/Cas9-KO-Zelllinien aus Einzelzellklonen zu minimieren, wurden mehrer Klone (je drei Zelllinien für RIG-I- und MAVS-KO und zwei für MDA5-KO) zu gleichen Anteilen gepoolt. Nach 24, 48 sowie 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen für die RNA-Isolation lysiert. Die Sekretion von CXCL10 wurde mittels ELISA im Überstand quantifiziert. Des Weiteren wurde die Induktion von CXCL10-mRNA per qPCR bestimmt (Abbildung 3.1).

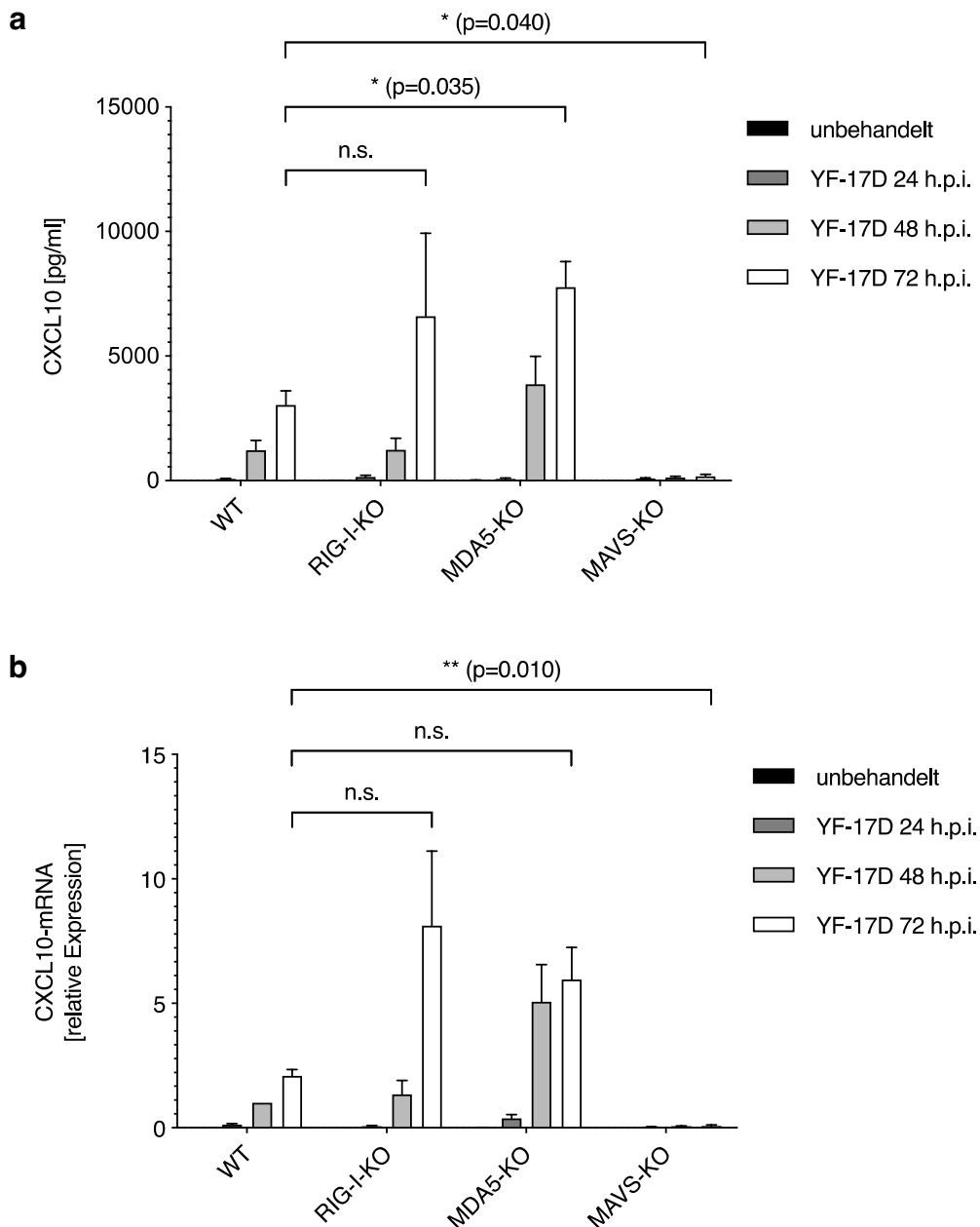


Abbildung 3.1 YF-17D löst sowohl in RIG-I- als auch in MDA5-defizienten Zellen eine CXCL10-Antwort aus, nicht jedoch in MAVS-Knock-out-Zellen Wildtyp- (WT), MDA5-, RIG-I- und MAVS-Knock-out-1205Lu-Zellen wurden mit YF-17D (MOI = 1 PFU/Zelle) infiziert. Für RIG-I-KO- und MAVS-KO-Zellen wurden je drei Zelllinien aus unterschiedlichen Einzelzellklonen gepoolt, für MDA5-KO-Zellen Zelllinien aus zwei Einzelzellenklonen (a) Überstände wurden 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion (h.p.i.) abgenommen und mittels ELISA auf CXCL10-Konzentration analysiert. (b) Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion lysiert und RNA wurde aus den Lysaten isoliert. CXCL10- und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA wurde per qPCR quantifiziert. CXCL10-mRNA pro GAPDH-mRNA wurde berechnet und ist als Vielfaches der Expression der YF-17D-48-h.p.i.-Wildtyp-Kondition angegeben. Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten werden gezeigt. p-Werte wurden mittels Welch-Test berechnet, beziehen sich auf die Unterschiede in den Proben 72 h.p.i. der KO-Zellen verglichen mit WT-Zellen und wurden mittels Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angepasst. n.s. = nicht signifikant;

CXCL10 im Überstand konnte nach der Infektion von 1205Lu-Zellen mit YF-17D erst zum 48-Stunden-Zeitpunkt zuverlässig nachgewiesen werden, was deutlich später ist als bei anderen schneller replizierenden RNA-Viren wie z.B. VSV. Zu diesem Zeitpunkt lässt sich sowohl in RIG-I- als auch MDA5-KO-Zellen eine CXCL10-Antwort messen. Wenn das Adapterprotein MAVS fehlt, konnte jedoch weder auf Protein- (Abbildung 3.1 a) noch auf mRNA-Ebene (Abbildung 3.1 b) eine Immunantwort beobachtet werden. Bemerkenswerterweise scheint die CXCL10-Induktion in RIG-I-KO-Zellen im Vergleich zu MDA5-KO-Zellen mit verzögerter Kinetik aufzutreten. Darüber hinaus zeigte sich eine signifikant höhere CXCL10-Konzentration in den Überständen der MDA5-KO-Zellen verglichen mit denen der WT-Zellen. In den RIG-I- und MDA5-KO-Zellen kam es im Allgemeinen tendenziell zu einer stärkeren CXCL10-Induktion. Dies könnte auf klonale Unterschiede der Zelllinien oder eine stärkere Virusreplikation in diesen Zellen zurückzuführen sein.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Infektion mit dem Gelbfieberimpfvirus intrazellulär sowohl von RIG-I als auch von MDA5 erkannt wird. Das RIG-I-aktivierende Muster scheint jedoch früher im Verlauf der Infektion zu entstehen als der Ligand für MDA5. Aus der fehlenden Induktion einer Typ-I-Interferon-Antwort in Abwesenheit von MAVS ergibt sich die Hypothese, dass die Erkennung von YF-17D im verwendeten *in-vitro*-Modell nur durch die beiden RLR RIG-I und MDA5 erfolgt.

3.1.2 Eine Typ-I-Interferon-Antwort wird in 1205Lu-Zellen nur in Anwesenheit von RIG-I oder MDA5 ausgelöst

Das vollständige Ausbleiben einer Typ-I-Interferon-Antwort nach YF-17D-Infektion in der Abwesenheit von MAVS suggeriert, dass das Gelbfieberimpfvirus in 1205Lu-Zellen nur mithilfe von RIG-I und MDA5 erkannt wird. Da jedoch weiterhin die Möglichkeit besteht, dass andere MAVS-abhängige Rezeptoren die antivirale Reaktion auslösen, wurden mithilfe der CRISPR/Cas9-Methode neue 1205Lu Zelllinien generiert, die beide Rezeptoren (RIG-I und MDA5) nicht exprimiert. Zwei Einzelzellklone (Klon B10 und Klon D10) mit validierter Defizienz für sowohl RIG-I als auch MDA5 wurden dann für die weiteren Experimente verwendet.

Um die Abhängigkeit der YF-17D-induzierten Typ-I-Interferonantwort von RIG-I und MDA5 zu bestätigen, wurden 1205Lu-Wildtyp, -RIG-I-, -MDA5-, -MAVS-Einzel-KO-Zellen und -RIG-I/MDA5-Doppel-KO-Zellen mit dem Gelbfiebervirus 17D infiziert. 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion wurden die Zellüberstände abgenommen und die

CXCL10-Konzentration mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.2 a). In Übereinstimmung mit den vorangegangenen Experimenten (siehe Abbildung 3.1) zeigte sich wieder sowohl im RIG-I- als auch im MDA5-Einzel-KO eine CXCL10-Produktion als Folge der Virusinfektion. Auch konnten erneut eine verzögerte Immunantwort in den RIG-I-defizienten Zellen beobachtet werden. In den Überständen der 1205Lu-MAVS-KO-Zellen konnte kein CXCL10 detektiert werden. Ebenso konnte keine CXCL10-Produktion in den RIG-I/MDA5-Doppel-KO-Zellen nachgewiesen werden.

Als Kontrollen für die neu generierten *Knock-out*-Zellen wurden die für das Experiment verwendeten Zelllinien mit einer kurzen, doppelsträngigen RNA mit einer freien 5'-Triphosphat-Gruppe ohne Cap (pppRNA) beziehungsweise dem synthetischen dsRNA-Analogon Polyinosinsäure:Polycytidylsäure (Poly I:C) stimuliert (Abbildung 3.2 b). pppRNA stellt einen potenten, selektiven Aktivator der RIG-I-Signalkaskade dar (Hornung et al. 2006). Das Fehlen von RIG-I oder dem *downstream* in der RIG-I-Signaltransduktion gelegenen MAVS führte daher erwartungsgemäß dazu, dass die Transfektion der Zellen mit dieser RNA keine messbare CXCL10-Produktion induzierte. Poly I:C hingegen, das neben einem MDA5- auch einen RIG-I und TLR3-Liganden darstellt (Gitlin et al. 2006, Alexopoulou et al. 2001), führte in allen getesteten Zelllinien zur CXCL10-Sekretion. Dies zeigt einerseits, dass die CXCL10-Produktion in den Zelllinien intakt ist und andererseits, dass neben RIG-I und MDA5 vermutlich TLR-3 als weiterer RNA-Sensor in 1205Lu-Zellen exprimiert wird, dieser aber für die Interferon-Induktion durch YF-17D keine relevante Rolle zu spielen scheint.

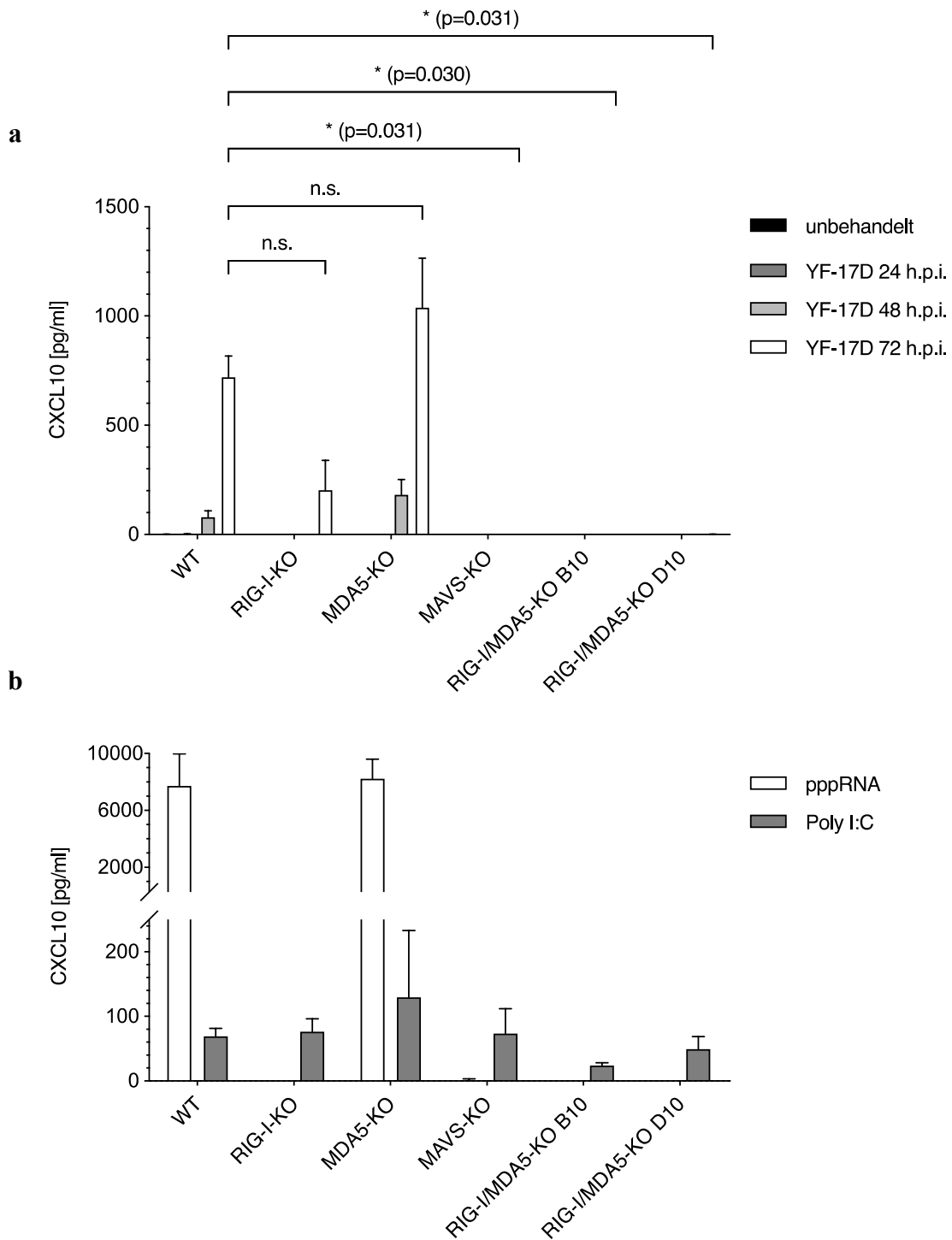


Abbildung 3.2 In der Abwesenheit von RIG-I und MDA5 induziert YF-17D keine CXCL10-Antwort in 1205Lu-Zellen WT-, MDA5-, RIG-I-, MAVS-KO- sowie RIG-I/MDA5-Doppel-KO-1205Lu-Zellen wurden mit YF-17D (MOI zwischen 1 und 5 PFU/Zelle) infiziert. (a) Überstände wurden 24, 48 und 72 h.p.i. abgenommen und die CXCL10-Konzentration mittels ELISA analysiert. (b) Die gleichen Zellen wie in (a) wurden mit 5'-Triphosphat-RNA beziehungsweise Poly I:C transfiziert und die CXCL10-Konzentration in den Überständen nach 24 Stunden mittels ELISA bestimmt. Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier (a) bzw. drei (b) unabhängigen Experimenten werden gezeigt. p-Werte wurden mittels Welch-Test berechnet, beziehen sich auf die Unterschiede in den Proben 72 h.p.i. der KO-Zellen verglichen mit WT-Zellen und wurden mittels Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angepasst. n.s. = nicht signifikant;

3.1.3 RIG-I wird in YF-17D-infizierten Zellen verstärkt exprimiert

RIG-I stellt einerseits einen bedeutenden intrazellulären Sensor für Virusinfektionen dar, andererseits wird dieser Rezeptor selbst, als Interferon-stimuliertes Gen, durch die Immunantwort gegen Viren vermehrt exprimiert. Unter homöostatischen Bedingungen kommen die RLR nur in geringen Mengen intrazellulär vor. Im Zuge einer Virusinfektion kommt es durch die Aktivierung von RIG-I beziehungsweise MDA5 zu einer positiven *Feed-back*-Schleife, die zur gesteigerten Expression der Rezeptoren selbst führt (Matsumiya et al. 2010).

Um die Kinetik der Antwort des angeborenen Immunsystems während der YF-17D-Infektion besser beschreiben zu können, wurden 1205Lu Zellen mit dem Gelbfieberimpfvirus infiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten mit Formaldehyd fixiert. Anschließend wurde RIG-I mittels Immunfluoreszenz gefärbt und seine Expression mit Hilfe von konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie analysiert. Zusätzlich wurden GAPDH-Antikörper verwendet um das Zytoplasma der Zellen zu visualisieren.

Zwölf Stunden nach der Infektion war keine über den Hintergrund gesteigerte RIG-I-Expression in den Zellen zu erkennen. Zum 24-Stunden-Zeitpunkt zeigten vereinzelte Zellcluster bereits eine dezente zytosolische Anreicherung von RIG-I, während sich in anderen Zellen noch kein Signal nachweisen ließ. Hierbei könnte es sich um ein Korrelat der ersten Infektionsrunde mit parakrinen Interferon-Effekten handeln. Die Anzahl der RIG-I-positiven Zellen nahm im Verlauf der Infektion immer weiter zu, sodass nach 72 Stunden nahezu sämtliche Zellen erhöhte Mengen an RIG-I aufwiesen.

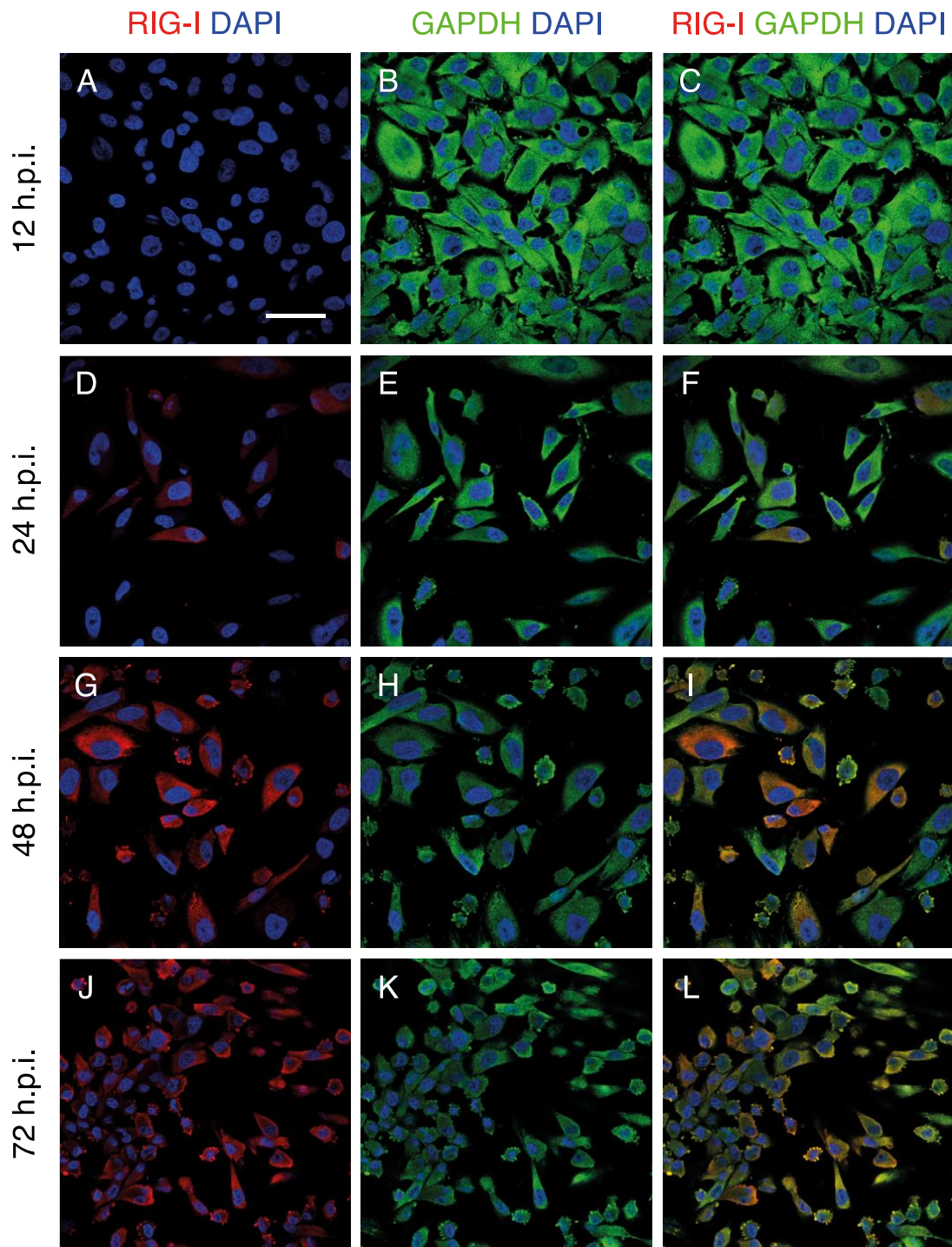


Abbildung 3.3 Im Verlauf der YF-17D-Infektion wird RIG-I verstärkt exprimiert 1205Lu Zellen wurden mit einer MOI von 1 PFU/Zelle mit YF-17D infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (12, 24, 48 und 72 Stunden) wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und RIG-I wurden mit indirekter Immunfluoreszenz gefärbt. Der Maßstab in (A) entspricht 50 μ m.

3.2 Notwendige molekulare Muster für die Aktivierung einer Interferonantwort nach YF-17D-Infektion

3.2.1 Im Laufe der Gelbfieberinfektion entstehen doppelsträngige RNA-Replikationsintermediate

Doppelsträngigkeit von RNA ist ein wichtiges Merkmal der Liganden von sowohl RIG-I als auch von MDA5. Längere doppelsträngige RNA (dsRNA) kommt unter homöostatischen Bedingungen nicht im Zytosol von eukaryontischen Zellen vor, kann jedoch während der Replikation von RNA- und DNA-Viren entstehen (Schlee & Hartmann 2016). Da sich in den vorangegangenen Experimenten gezeigt hatte, dass während der Infektion mit YF-17D die RIG-I-*like*-Rezeptoren aktiviert werden, wurde als Nächstes versucht dsRNA in infizierten Zellen nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden 1205Lu-Zellen mit dem Gelbfieberimpfvirus infiziert und mit Hilfe von Immunfluoreszenz und konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie analysiert.

Es wurden 1205Lu-Wildtypzellen auf Deckgläsern ausgesät und am nächsten Tag mit einer *Multiplicity of infection* von 1 PFU/Zelle mit YF-17D infiziert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Zellen fixiert. Doppelsträngige RNA wurde mit einem monoklonalen Antikörper (J2, *Scicons*) nachgewiesen, der Sequenz-unabhängig doppelsträngige RNA mit einer Länge von über 40 Basenpaaren bindet. Des Weiteren wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase als zytosolisches Protein mit einem polyklonalen Antikörper gefärbt.

24 Stunden nach der Virusinfektion konnte noch keine doppelsträngige RNA in den Zellen detektiert werden (Abbildung 3.2 A bis C). Zum 48-Stunden-Zeitpunkt war es jedoch möglich dsRNA im Zytoplasma zahlreicher Zellen nachzuweisen. Die doppelsträngige RNA erschien in diskreten, in ihrer Größe variablen, runden Ansammlungen im Zytoplasma der Zellen (Abbildung 3.2 D bis F). Nach 72 Stunden war der Großteil der Zellen positiv für dsRNA. Außerdem bildeten sich im Durchmesser größere dsRNA-Ansammlungen, die teilweise zu konfluieren begannen (Abbildung 3.2 G bis I).

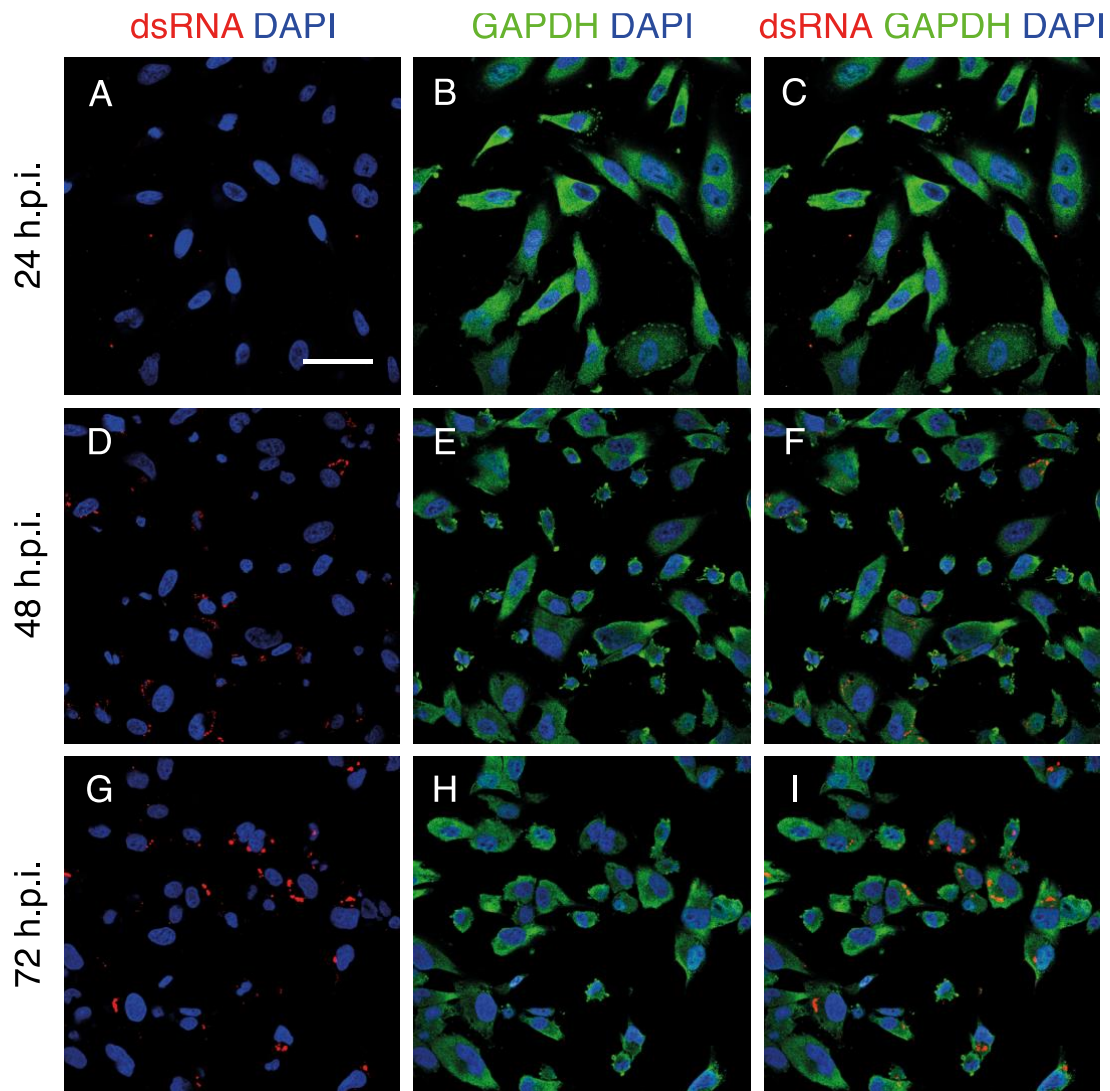


Abbildung 3.4 In Gelbfielervirus-infizierten Zellen entsteht Doppelsträngige RNA
 1205Lu-Zellen wurden mit einer MOI von 1 PFU/Zelle mit YF-17D infiziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion (24, 48 und 72 Stunden) wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS fixiert. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und doppelsträngige RNA (dsRNA) wurden mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Der Maßstab in (A) entspricht 50 μm . Gezeigt wird ein repräsentatives von zwei unabhängigen Experimenten.

3.2.2 Doppelsträngigkeit von RNA ist eine Voraussetzung für die Interferon-Antwort gegen das Gelbfieberimpfvirus in 1205Lu Zellen

Das Gelbfieberimpfvirus beinhaltet ein einzelsträngiges RNA-Genom, während seines Replikationszyklus entstehen jedoch doppelsträngige RNA-Intermediate (siehe 3.2.1). Um das PAMP, das von den RLR erkannt wird, näher beschreiben zu können, wurde aus 1205Lu-Wildtypzellen 48 Stunden nach YF-17D-Infektion ihre Gesamt-RNA isoliert. Die RNA-Isolate wurden darauffolgend mit Enzymen verdaut, die spezifische molekulare Muster von RNA entfernen.

Um die Bedeutung von Phosphatresten an den 5'-Enden von RNA für die Immunantwort zu testen, wurde die 5'-Polyphosphatase sowie die FastAP verwendet. Diese hydrolysieren Tri- und Diphosphatgruppen von RNA-Molekülen. Die RNase R ist eine 3'→5'-Exonuklease, die spezifisch einzelsträngige RNA spaltet, während die RNase III ein Enzym mit Endonuklease-Aktivität ist, welches dsRNA abbaut. RiboShredder ist eine Mischung aus verschiedenen RNasen, die sämtliche RNA zu Nucleosidmonophosphaten degradiert. Als Referenz wurde RNA verwendet, die sämtliche Schritte des RNA-Verdaus parallel durchgemacht hatte, jedoch wurde statt Enzym Wasser hinzugefügt.

Die enzymatisch modifizierten RNA-Isolate wurden anschließend zur Transfektion von 1205Lu-Wildtypzellen verwendet und 24 Stunden später wurde die CXCL10-Konzentration in den Überständen quantifiziert (Abbildung 3.5). Als zusätzliche Kontrolle wurde RNA aus nicht-infizierten 1205Lu Zellen isoliert und mit den gleichen Enzymen behandelt. Nach der Transfektion neuer Zellen wurde ebenfalls CXCL10 im Überstand bestimmt. In keiner dieser Kontrollbedingungen konnte CXCL10 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Wenn sämtliche doppelsträngige RNA vor der Transfektion mithilfe der RNase III degradiert wurde, konnte nach 24 Stunden kein CXCL10 im Überstand nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 b). Die Spaltung einzelsträngiger RNA durch die RNase R führte zu keiner signifikanten Reduktion der CXCL10-Sekretion. Das Entfernen von Tri- und Diphosphat-Resten von den 5'-Enden der RNA hingegen hatte eine signifikant verminderte CXCL10-Antwort zur Folge.

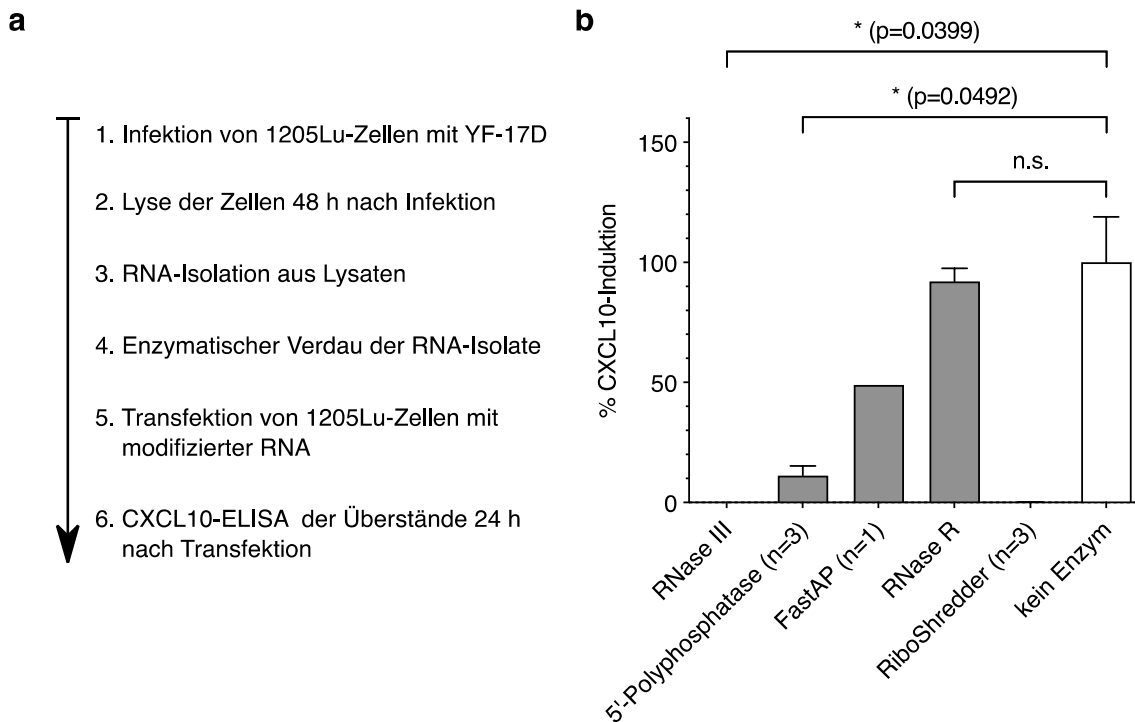


Abbildung 3.5 Doppelsträngige RNA und 5'-Triphosphat-Reste spielen eine bedeutende Rolle in der Erkennung von YF-17D 1205Lu-Wildtypzellen wurden mit RNA transfiziert, die aus 1205Lu-Wildtypzellen 48 Stunden nach YF-17D-Infektion isoliert wurde. Die RNA-Isolate wurden vor der Transfektion mit den genannten Enzymen behandelt. (a) Übersicht über den Versuchsaufbau; (b) Relative Konzentration von CXCL10 im Überstand 24 Stunden nach der Transfektion im Vergleich zur Transfektion mit unverdauter RNA. Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten werden gezeigt, außer wenn anders angemerkt. p-Werte wurden mittels Welch-Test berechnet und mittels Bonferroni-Korrektur für multiples Testen angepasst. n.s. = nicht signifikant

3.2.3 5'-Triphosphat-Reste liefern einen größeren Beitrag zur Immunantwort zu frühen Zeitpunkten nach der YF-17D-Infektion

In den vorangegangenen Experimenten mit RIG-I-*Knock-out*-Zellen (Abbildungen 3.1 und 3.2) zeigte sich eine Tendenz, dass ohne diesen Rezeptor die Typ-I-Interferon-Antwort insbesondere zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion reduziert ausfällt. Um zu testen, ob sich diese Dynamik auch auf Ebene der RLR-Liganden nachweisen lässt, wurden weitere Experimente durchgeführt. Da 5'-Triphosphatgruppen an dsRNA den typischen RIG-I-Liganden darstellen, wurde überprüft, ob diese zu Zeitpunkten früh nach der Infektion von besonderer Bedeutung für die Immunerkennung sind.

RNA wurde aus 1205Lu-Wildtypzellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion mit dem Gelbfiebervirus 17D isoliert und mit den RNA-modifizierenden Enzymen RNase III beziehungsweise mit Phosphatasen behandelt. Folgend wurde die RNA zur Transfektion von 1205Lu-Wildtypzellen verwendet. 24 Stunden später wurden

die Überstände abgenommen und die CXCL10-Konzentration in ihnen mittels ELISA bestimmt. Um den relativen Anteil der CXCL10-Induktion durch die jeweiligen molekularen Muster zu veranschaulichen, wurden die CXCL10-Konzentrationen in den unterschiedlichen Konditionen als prozentualer Anteil der CXCL10-Konzentration nach Stimulation mit unbehandelter RNA gezeigt.

Wie schon oben für den Zeitpunkt 48 Stunden nach Infektion gezeigt werden konnte (Abbildung 3.5), führte auch der Verdau von doppelsträngiger RNA mithilfe von RNase III aus Proben 24 und 72 Stunden nach der Virusinfektion zum Ausbleiben einer CXCL10-Induktion. Die relative Reduktion der Immunantwort durch Entfernen von Phosphatresten war 24 Stunden nach Infektion mit YF-17D besonders stark ausgeprägt, sodass im Mittel nur noch 8 % der CXCL10-Menge gemessen werden konnte. Zu den späteren zwei Zeitpunkten blieben nach der Phosphatase-Behandlung noch etwa 30 % der CXCL10-Produktion erhalten. Diese Ergebnisse liefern weitere Hinweise dafür, dass früh nach der Infektion mit dem Gelbfieberevirus 17D die Erkennung durch RIG-I von größter Bedeutung ist, während später MDA5 ebenfalls einen deutlichen Beitrag zur Typ-I-Interferonantwort liefert.

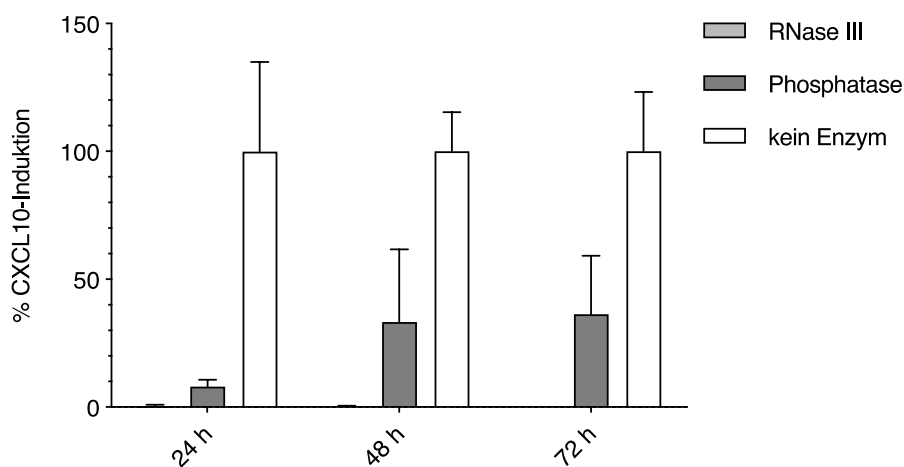


Abbildung 3.6 5'-Triphosphat-RNA ist der führende Auslöser der CXCL10-Antwort zu frühen Zeitpunkten nach YF-17D-Infektion 1205Lu-Wildtypzellen wurden mit RNA transfiziert, die aus 1205Lu-Wildtypzellen 24, 48 und 72 Stunden nach YF-17D-Infektion isoliert wurde. Die RNA-Isolate wurden vor der Transfektion mit den genannten Enzymen behandelt. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Überstände abgenommen und mittels ELISA auf ihre CXCL10-Konzentration untersucht. Ergebnisse sind als relative Konzentrationen im Vergleich zur „kein Enzym“-Kondition des jeweiligen Zeitpunktes dargestellt. Daten des 48-Stunden-Zeitpunktes sind auch in Abbildungen 3.5 enthalten. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.3 Abhängigkeit der Immunantwort von Virusreplikation

3.3.1 Virusreplikation verstärkt die Typ-I-Interferon-Antwort nach Gelbfiebervirus-17D-Infektion

Da Doppelsträngigkeit von RNA eine absolute Voraussetzung für eine CXCL10-Antwort in 1205Lu Zellen zu sein scheint (siehe Abschnitt 3.2.2), stellt sich die Frage, ob die Synthese eines zum Gelbfiebervirusgenom komplementären Negativstrangs während der Replikation notwendig ist, um eine Infektion mit YF-17D von den *RIG-I-like*-Rezeptoren erkennbar zu machen. Doppelsträngige RNA, die RLR aktiviert, kann entweder durch intermolekulare oder durch intramolekulare Basenpaarung entstehen. Um herauszufinden, ob das aktivierende Muster für die Interferon-Antwort in Gelbfieber-17D-infizierten Zellen erst während der Virusreplikation entsteht oder bereits die genomische RNA in der Lage ist, erkannt zu werden, wurde in den folgend beschriebenen Experimenten versucht, die Virusreplikation zu hemmen.

1205Lu-Wiltypzellen wurden mit YF-17D infiziert, wobei eine Stunde vor dem ersten Viruskontakt in die entsprechenden Wells Ribavirin (RBV) hinzugefügt wurde. Ribavirin hemmt die virale RNA-Synthese und somit die Replikation (Leyssen et al. 2005). Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen für die RNA-Isolation lysiert. Die Typ-I-Interferon-Antwort wurde anhand der CXCL10-Induktion, einerseits auf Protein-, andererseits auf mRNA-Ebene, quantifiziert.

Sowohl zum 48-Stunden-, als auch zum 72-Stunden-Zeitpunkt nach YF-17D-Infektion zeigte sich die CXCL10-Antwort in RBV-behandelten Zellen deutlich reduziert. Dies ließ sich auf Protein und mRNA-Ebene zeigen (Abbildung 3.7). 24 Stunden nach der Infektion konnten jedoch noch keine Unterschiede in der Interferon-Antwort zwischen der replikationsgehemmten und der ungehemmten Kondition beobachtet werden.

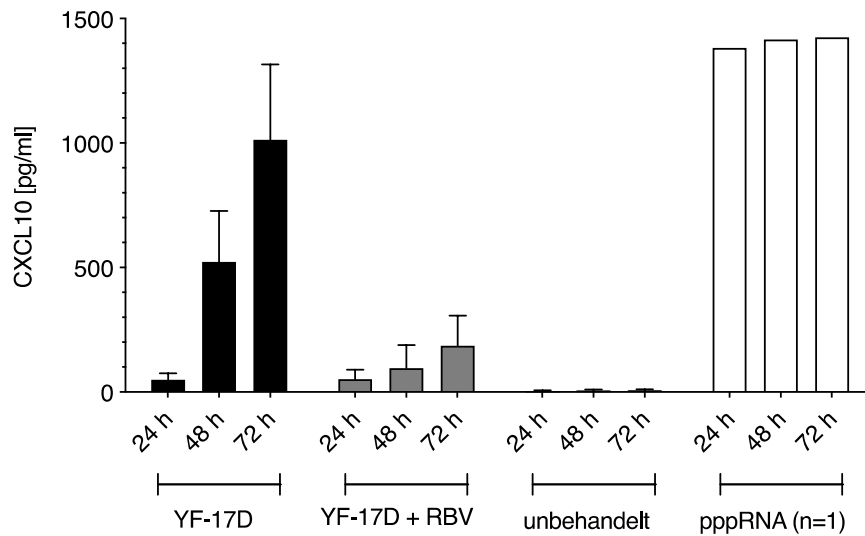
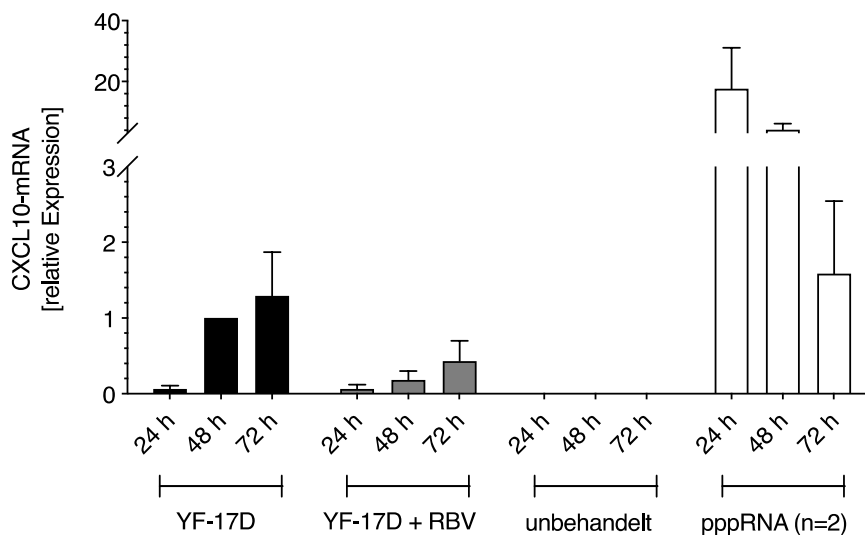
a**b**

Abbildung 3.7 Hemmung der Virusreplikation führt zu einer reduzierten CXCL10-Antwort 1205Lu-Wildtypzellen wurden mit YF-17D in einer MOI von 25 PFU/Zelle infiziert, beziehungsweise als Positivkontrolle mit 5'-Triphosphat-RNA (pppRNA; 500 ng/ml) transfiziert. Die Virusreplikation wurde in den entsprechenden Proben mit 100 µg/ml Ribavirin (RBV) gehemmt. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurden die Überstände abgenommen und die Zellen lysiert. **(a)** CXCL10-Konzentration in den Überständen wurde zu den genannten Zeitpunkten mittels ELISA bestimmt **(b)** RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion aus den Lysaten isoliert und die CXCL10- und GAPDH-mRNA wurde per qPCR quantifiziert. CXCL10-mRNA pro GAPDH-mRNA wurde berechnet und ist als Vielfaches der Expression der YF-17D-Kondition 48 h.p.i. ohne RBV angegeben. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei unabhängigen Experimenten, außer wenn anders angemerkt.

3.3.2 RNA-Replikationsintermediate stimulieren die Typ-I-Interferon-Antwort potenter als genomische Virus-RNA

Da Ribavirin die Virusreplikation zwar reduzieren jedoch nicht vollständig verhindern kann, wurden weitere Experimente durchgeführt, um die Notwendigkeit von RNA-Replikation für die Erkennung der YF-17D-Infektion durch RIG-I-*like*-Rezeptoren näher zu beleuchten. Hier sollte die Produktion der viralen RdRp – und damit auch der viralen RNA – mit Hilfe des Translationshemmers Cycloheximid (CHX) blockiert werden. Anschließend wurden die immunstimulatorischen Eigenschaften von genomischer Virus-RNA (gRNA) und Replikationsintermediaten direkt miteinander verglichen.

Dazu wurden parallel gRNA und RNA-Replikationsintermediate in 1205Lu-Wildtypzellen eingebracht. Anschließend wurde die Interferon- β -mRNA-Induktion mittels qPCR gemessen. Virusgenome wurden durch Phenol-Chloroform-Extraktion aus Virusstocks gewonnen. Um Replikationsintermediate zu erhalten, wurden 1205Lu-Wildtypzellen mit dem Gelbfieberimpfvirus infiziert und nach 24, 48 und 72 Stunden für die RNA-Isolation lysiert. Auch hier wurde die Phenol-Chloroform-Methode eingesetzt, um möglichst alle RNA-Spezies (icRNA, zelluläre RNA aus infizierten Zellen) unabhängig von ihren strukturellen Eigenschaften oder zellulären Lokalisation zu erhalten (Sultan et al. 2014). Zwei Stunden vor der Transfektion neuer 1205Lu-Wildtypzellen mit den verschiedenen RNA-Isolaten wurde die Behandlung mit CHX begonnen. Acht Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für die RNA-Isolation lysiert und die Typ-I-Interferon-Antwort mittel IFN- β -qPCR quantifiziert (Abbildung 3.8 a).

Ein initiales Experiment ist in Abbildung 3.8 d gezeigt. Hier wurde die IFN- β -Induktion erst 24 Stunden nach der Transfektion bestimmt. Ohne Replikationshemmung durch CHX führte die Stimulation mit gRNA unter diesen Bedingungen zu einer mehr als fünffach höheren Expression von IFN- β -mRNA. Um den Effekt von eventuell auch unter Translationshemmung vorkommender Virusreplikation zu reduzieren, wurde für weitere Experimente als früherer Zeitpunkt acht Stunden nach Transfektion verwendet. Weil in diesem Versuch je 100 ng icRNA beziehungsweise gRNA für die Transfektion verwendet wurden, war zudem ein Vergleich zwischen den Konditionen erschwert.

Da die viralen Replikationsintermediate nur einen kleinen Anteil der gesamten RNA in den infizierten Zellen ausmachen, wurde die Anzahl der Kopien des

Gelbfieberimpfvirusgenoms pro Nanogramm RNA sowohl in den RNA-Isolaten aus den infizierten Zellen als auch in den RNA-Isolaten aus den Virusstocks bestimmt. Die Menge an Gelbfieberevirus-RNA-Kopien wurde für die Experimente in Abbildung 3.8 b zur Vergleichbarkeit adjustiert. Zur Transfektion wurden dann je 100 Nanogramm RNA der icRNA verwendet und die Menge an gRNA, die der YF-17D-Kopienanzahl in 100 Nanogramm icRNA 48 Stunden nach Infektion entsprach (etwa 1,3 ng). Interessanterweise zeigte sich bei der Quantifizierung der YF-17D-RNA in infizierten Zellen, dass die Zahl der Viruskopien bis zum 48-Stunden-Zeitpunkt zunimmt, 72 nach Infektion jedoch deutlich vermindert erscheint (Abbildung 3.8 b).

Übereinstimmend damit zeigte sich eine zunehmende IFN- β -Induktion bei Stimulation mit icRNA vom 24- und 48-Stunden-Zeitpunkt und die geringste Menge an IFN- β -mRNA nach Transfektion mit RNA aus Zellen 72 Stunden nach Infektion. Im Vergleich zwischen der Transfektion mit Replikationsintermediaten aus Zellen 48 Stunden nach Infektion und genomischer Virus-RNA zeigte sich ein signifikant höherer Anstieg der Interferon- β -mRNA durch die Stimulation mit icRNA. Durch die Adjustierung dieser beiden Proben auf die gleiche Kopienanzahl an YF-17D-RNA kann die immunstimulatorische Potenz direkt miteinander verglichen werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass RNA, welche während der Virusreplikation entsteht, das angeborene Immunsystem stärker aktiviert als die initial ankommenden Virusgenome selbst.

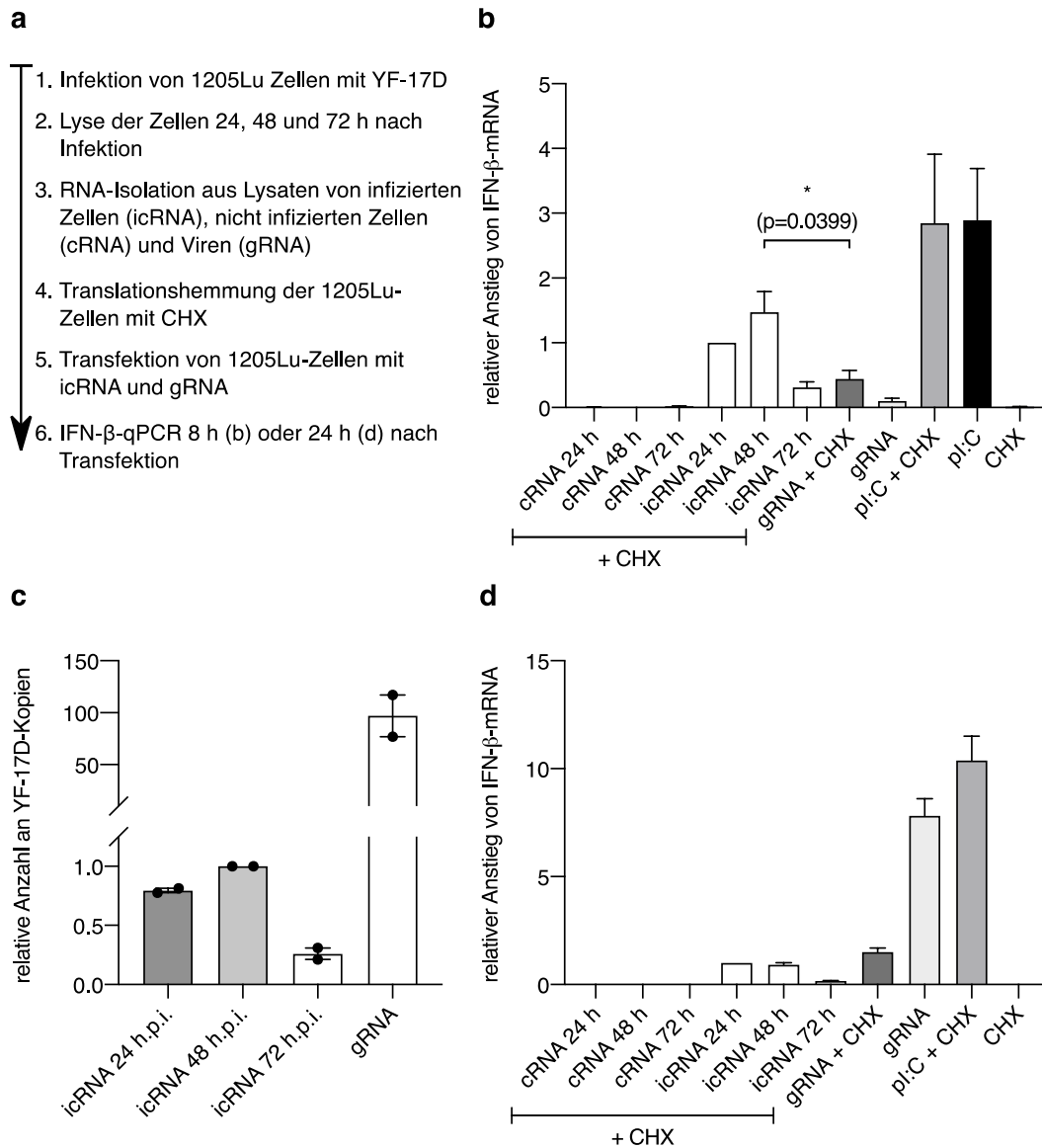


Abbildung 3.8 RNA-Replikationsintermediate stimulieren die Interferon- β -Antwort stärker als genomische Virus-RNA

1205Lu-Wildtypzellen wurden mit YF-17D infiziert (icRNA) beziehungsweise unbehandelt belassen (cRNA) und nach 24, 48 und 72 Stunden lysiert und die RNA aus ihnen isoliert. Genomische RNA (gRNA) wurde aus aufgereinigten YF-17D-Virusstocks extrahiert. Die RNA-Aufreinigung wurde in beiden Fällen mittels Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. (a) Schema des Versuchsaufbaus (b) Das Medium der 1205Lu-Zellen wurde in den angemarkten Konditionen zwei Stunden vor Transfektion der Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Cycloheximid (CHX) versetzt. Danach wurden die Zellen mit 100 ng icRNA oder cRNA transfiziert. Für die gRNA-Kondition wurde RNA mit der gleichen Anzahl an YF-17D-Kopien wie in der icRNA 48 h.p.i. für die Transfektion verwendet. Acht Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für die RNA-Extraktion lysiert. Die Anzahl der IFN- β -mRNA-Kopien pro GAPDH wurde per qPCR bestimmt. Die Ergebnisse sind als Vielfaches der „icRNA 24 h“-Kondition dargestellt. (c) Relative Anzahl von YF-17D-Kopien in identischer Masse RNA dargestellt als Vielfaches der Kopienzahl in icRNA 48 h.p.i. (d) Initiales Experiment mit Versuchsaufbau wie in (b), jedoch wurden 100 ng gRNA transfiziert und die Zellen erst nach 24 Stunden Stimulation lysiert. Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardfehlern aus vier unabhängigen Experimenten für (b), Mittelwerte, Einzelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten für (c) und Mittelwerte mit Standardabweichungen aus technischen Triplikaten aus einem Experiment für (d). p-Wert wurde mittels Welch-Test ermittelt.

4. Diskussion

4.1 Ergebnisübersicht

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Typ-I-Interferon-Antwort nach der Infektion mit dem Gelbfieberimpfvirus im verwendeten Zellkulturmodell (1205Lu-Melanom-Zelllinie) sowohl mit Hilfe von RIG-I als auch durch MDA5 ausgelöst wird, jedoch durch keine anderen Rezeptoren. Die Kinetik der Immunantwort wies eine relativ langsame Induktion von CXCL10 (auf Proteinebene erst nach 48 Stunden messbar) sowie Interferon- β auf und gab Hinweise auf eine zeitlich versetzte Aktivierung von RIG-I und MDA5. RIG-I scheint zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion die Interferon-Antwort zu stimulieren, während MDA5 erst im späteren Verlauf das Virus zu detektieren scheint.

Um dieses Phänomen zu erklären, wurden die molekularen Muster näher untersucht, die für die Einleitung einer Interferon-Antwort notwendig sind. Hierzu wurde RNA aus infizierten Zellen isoliert und enzymatisch bestimmte PAMP entfernt. Anschließend wurden Zellen mit dieser modifizierten RNA stimuliert. Hier zeigte sich, dass doppelsträngige RNA für die Erkennung durch das angeborene Immunsystem notwendig ist. Auch das Vorhandensein von 5'-Tri- oder Diphosphat-Gruppen trug maßgeblich zur Immunaktivierung bei, insbesondere zu frühen Zeitpunkten (24 Stunden) nach der Infektion. Mit diesen Ergebnissen im Einklang konnte gezeigt werden, dass es im Laufe der Infektion mit YF-17D zur Bildung von dsRNA im Zytoplasma kommt. Diese RNA-Spezies konnten jedoch erst 48 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden und spiegeln somit möglicherweise das Substrat der MDA5-Aktivierung wider.

Da es sich bei YF-17D um ein einzelsträngiges RNA-Virus handelt, die Immunantwort jedoch von dsRNA abhängig ist, wurde die Bedeutung von Replikation für die Interferon-Antwort untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase mit Ribavirin die Induktion von CXCL10 reduziert werden kann. Zusätzlich wurden die immunstimulatorischen Eigenschaften der genomischen Virus-RNA mit denen von RNA-Produkten der Virusreplikation verglichen. Hier zeigte sich eine stärkere Induktion von Interferon- β durch Replikationsintermediate als durch Virusgenome.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass im Rahmen der YF-17D-Infektion doppelsträngige RNA sowohl von RIG-I als auch von MDA5 erkannt wird und dass

Virusreplikation eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der molekularen Muster spielt, die die angeborene Immunantwort auslösen.

4.2 Die Rolle der RIG-I-like Rezeptoren bei der Erkennung des Gelbfieberimpfvirus

4.2.1 Das Gelbfieberimpfvirus wird MAVS-abhängig erkannt

Die initialen Experimente mit RIG-I- beziehungsweise MDA5-Einzel-KO-Zelllinien und mit MAVS-defizienten Zellen zeigten, dass die Typ-I-Interferonantwort in dem verwendeten Modell (1205Lu Melanom-Zelllinie) vollständig MAVS-abhängig induziert wird. Mustererkennungsrezeptoren mit anderen Signalwegen scheinen nicht in der Lage zu sein, diese antivirale Reaktion auszulösen. Da sich in den Experimenten mit 1205Lu-MAVS-KO-Zellen jedoch nach Stimulation mit dem synthetischen dsRNA-Analogen Poly I:C eine Interferoninduktion nachweisen ließ, scheint es auch MAVS-unabhängige RNA-Sensoren in dieser Zelllinie zu geben. Hierbei könnte es sich um TLR3 handeln, einen bekannten Rezeptor für Poly I:C (Alexopoulou et al. 2001). In der Arbeitsgruppe konnte passend dazu gezeigt werden, dass die Zugabe von Poly I:C ohne Transfektionsreagenzien ebenfalls eine CXCL10-Induktion bewirkt (Bothe, 2019). Unter diesen Bedingungen kann Poly I:C nicht in das Zytosol gelangen und somit nur Rezeptoren auf der Zelloberfläche oder in den Endosomen aktivieren. Die Abwesenheit einer Immunaktivierung durch eine YF-17D-Infektion in MAVS-KO-Zellen legt daher nahe, dass TLR3 bei der Typ-I-Interferon-Antwort gegen das Gelbfieberimpfvirus eine untergeordnete Rolle einnimmt. In den durchgeführten Experimenten wurde die Expression von funktionellem TLR3 in der 1205Lu-Zelllinie jedoch nicht gezeigt. Weitere Versuche zum Nachweis des Rezeptors wären von Interesse, um die Bedeutung von TLR3 bei der Erkennung des Gelbfieberimpfstoffes zu klären. Da dieser Mustererkennungsrezeptor in der Immunantwort gegen andere Flaviviren wie WNV und DENV beschrieben wurde, wäre eine Rolle im Zuge der Immunantwort gegen YF-17D denkbar (Daffis et al. 2008, Tsai et al. 2009).

Die Bedeutung der Erkennung von YF-17D durch RLR für die adaptive Immunantwort zeigt sich auch in ihrer Rolle in dendritischen Zellen. Für das Gelbfieberimpfvirus konnte gezeigt werden, dass es in der Lage ist, dendritische Zellen zu infizieren (Barba-Spaeth & Longman et al. 2005) und dass es in plasmazytoiden dendritischen Zellen zu einer RLR-induzierten IFN-Produktion kommt (Bruni et al. 2015). Interessanterweise führt die Infektion von MAVS-KO-Mäusen mit WNV zwar zu einer höheren Antikörperproduktion

als die Infektion von WT-Mäusen, diese Immunglobuline verfügen jedoch über eine vielfach geringere Neutralisierungsaktivität als die Antikörper der Mäuse mit intaktem MAVS (Suthar et al. 2010). Das RLR Signaling scheint bei dieser Flavivirusinfektion also von herausragender Bedeutung für die Entwicklung einer humoralen Immunität zu sein, wobei ähnliche Mechanismen für die Gelbfieberimpfung denkbar wären.

4.2.2 Sowohl RIG-I als auch MDA5 detektieren die YF-17D-Infektion

Dass sowohl RIG-I-KO- als auch MDA5-KO-Zellen eine Interferon-Antwort auf die YF-17D-Infektion auslösen können, Zellen ohne MAVS jedoch nicht, legt die Hypothese nahe, dass beide RLR in der Lage sind das Virus zu detektieren. Da aber auch andere RNA-Rezeptoren existieren, die eine MAVS-abhängige Typ-I-Interferon-Induktion einleiten können, ließen sich die beschriebenen experimentellen Ergebnisse auch über die Aktivierung eines dieser Sensoren erklären (Abbildung 4.1). Hierbei könnte es sich zum Beispiel um die Proteine NOD2, NLRP6, DHX15, ZNFX1, DHX9 und DHX33 handeln (Liu & Gack 2020). Um die Immunantwort sicher auf RIG-I und MDA5 zurückführen zu können, wurden RIG-I/MDA5-Doppel-*Knock-out*-Zellen mittels CRISPR/Cas9-basiertem *Genome Editing* generiert. Die Infektion dieser Zellen mit dem Gelbfieberimpfvirus führte ebenfalls zu keiner messbaren Induktion von CXCL10 und spiegelte somit die Ergebnisse aus den MAVS-defizienten Zellen wider (Abbildung 3.2). Diese Ergebnisse zeigen, dass in 1205Lu-Zellen die YF-17D-Infektion sowohl durch RIG-I als auch durch MDA5 erkannt wird, jedoch keine anderen Rezeptoren eine Interferon-Antwort auslösen können.

Im Einklang damit konnte für die Flaviviren DENV, WNV und ZIKV ebenfalls gezeigt werden, dass beide RLR in der Lage sind die Infektion zu detektieren (Nasirudeen et al. 2011, Fredericksen et al. 2008, Ma et al. 2018). Auch für das Gelbfiebervirus 17D gab es bereits Hinweise für eine Aktivierung von RIG-I und MDA5, jedoch bislang keine eindeutigen Daten aus *Knock-out*-Zellen (Querec & Akondy et al. 2009). Nachdem hier nun gezeigt werden konnte, dass beide Rezeptoren eine Immunantwort auf YF-17D auslösen können, stellt sich die Frage, ob es sich hierbei um rein redundante Mechanismen der Erkennung handelt oder ob es funktionelle Unterschiede gibt.

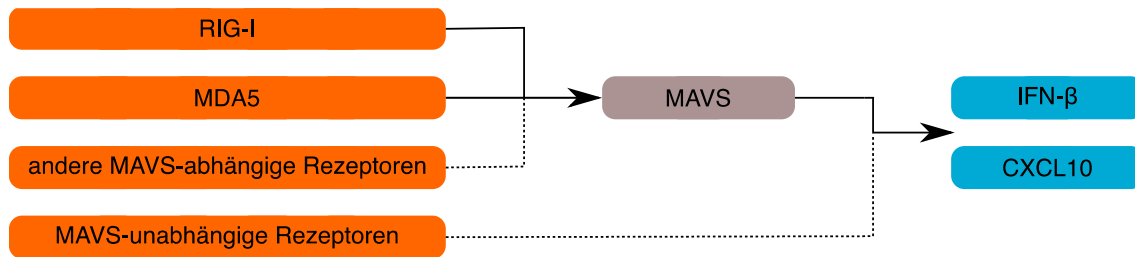


Abbildung 4.1 Unterschiedliche Wege der Typ-I-Interferon-Induktion Schema der verschiedenen Signalwege, die zu einer Typ-I-Interferon-Antwort führen können. Bei der Erkennung von YF-17D durch MAVS-unabhängige Signalwege würde die Immunantwort in MAVS-KO-Zellen erhalten bleiben. Ein Ausbleiben der CXCL10- bzw. IFN- β -Induktion im MAVS-KO – nicht jedoch im RIG-I- und MDA5-Einzel-KO – kann entweder durch die Erkennung durch beide RLR oder durch andere MAVS-abhängige Rezeptoren erklärt werden. Da keine Immunantwort im RIG-I/MDA5-Doppel-KO zustande kommt, wird YF-17D sowohl durch RIG-I als auch durch MDA5, jedoch keine anderen Rezeptoren des Typ-I-IFN-Signalweges erkannt.

4.2.3 YF-17D aktiviert RIG-I- und MDA5 mit unterschiedlicher Dynamik

In den verschiedenen Experimenten mit RIG-I- und MDA5-defizienten Zellen (Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2) zeigte sich reproduzierbar ein Trend zu einer unterschiedlichen Dynamik der CXCL10-Induktion. In Abwesenheit von RIG-I scheint sich die Immunantwort erst verzögert auszubilden. Am deutlichsten war der Unterschied 48 Stunden nach der Infektion mit YF-17D zu erkennen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Errett und Kollegen bei der Infektion mit WNV gemacht. Von ihnen konnte gezeigt werden, dass es in Zellen ohne RIG-I zu einer verzögerten Interferon- β -Induktion und einer gesteigerten initialen Virusreplikation kommt. Im MDA5-KO zeigte sich hingegen eine reduzierte Induktion von IFN- α 2a, einem Protein der späten Phase der Typ-I-Interferon-Antwort (Errett et al. 2013). Dies legt nahe, dass es sich bei der Erkennung des Gelbfieberimpfvirus durch die RLR nicht um vollständig redundante Mechanismen handelt. Errett et al. stellten dazu in Bezug auf WNV die Hypothese auf, dass RIG-I notwendig sei, um die initiale Virusvermehrung einzudämmen. MDA5 solle hingegen zur Aufrechterhaltung und Diversifizierung der angeborenen Immunantwort beitragen. Interessanterweise konnte in einer anderen Arbeit gezeigt werden, dass ein MDA5-*Knock-out* im Mausmodell zu einer gestörten CD8⁺-T-Zell-Antwort gegen WNV führt und folglich für ein effektives *Priming* dieser antiviralen Lymphozyten notwendig sein könnte (Lazear et al. 2013). Es erscheint plausibel, dass die Aktivierung der nicht-redundanten Funktionen der RLR maßgeblich zu den Charakteristika der adaptiven Immunantwort auf die Gelbfieberimpfung beiträgt.

4.3 Die Bedeutung der Virusreplikation für die Erkennung von YF-17D durch das angeborene Immunsystem

4.3.1 Replikation des Gelbfieberimpfvirus steigert die Interferonantwort

Sich vermehrende Virus-RNA im Zytosol von Zellen stellt ein typisches molekulares Muster dar, das von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt wird. Die Rolle von Replikation in der Erkennung des Gelbfieberimpfvirus ist aus mehreren Gründen von Interesse: Einerseits handelt es sich bei YF-17D um ein einzelsträngiges RNA-Virus, das im Verlauf der Infektion RIG-I und MDA5 aktiviert. Für die Liganden beider Rezeptoren ist jedoch Doppelsträngigkeit von RNA eine Voraussetzung (siehe Abschnitt 3.2.2). Wie hier gezeigt werden konnte, entstehen während der Genomreplikation des Virus dsRNA-Intermediate (Abbildung 3.4), die das nötige molekulare Muster für die Aktivierung darstellen könnten.

Andererseits unterscheidet sich YF-17D von vielen anderen Impfungen dadurch, dass es sich um eine Lebendvaccine handelt. Diese Impfstoffe definieren sich durch ihre Fähigkeit zu replizieren. Im Allgemeinen führen Lebendimpfstoffe zu länger anhaltender Immunität, einer wünschenswerten Eigenschaft, die die Gelbfieberimpfung besonders auszeichnet. Beispielhaft ist dieser Unterschied an der FSME-Impfung zu erkennen. Die Immunisierung gegen dieses mit dem Gelbfieber verwandte Flavivirus wird durch einen Totimpfstoff durchgeführt. Daher besteht die Empfehlung, sie alle drei bis fünf Jahre aufzufrischen. Außerdem sind für die Grundimmunisierung gegen das FSME-Virus drei Impfdosen notwendig – im Gegensatz zu der einzigen Dosis der Gelbfieberimpfung (Kaiser 2016).

Möglicherweise liegt in der Aktivierung von zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren durch virale Replikation einer der entscheidenden Unterschiede zwischen langlebigen Immunantworten auf Lebendimpfungen und kürzer anhaltender Immunität durch Totimpfstoffe. Die Bedeutung von Signalen, die spezifisch für lebende Mikroorganismen sind, konnte kürzlich für die adaptive Immunantwort gegen Bakterien gezeigt werden (Ugolini et al. 2018). Vergleichbar wurde für DENV berichtet, dass die Follikuläre-T-Helferzell-Antwort und Antikörperproduktion von der Aktivierung von RIG-I und MDA5 und von Virusreplikation abhängig sei (Sprokholt et al. 2017). Das Wissen um die Bedeutung von Replikation für die angeborene Immunantwort auf die Gelbfieberimpfung könnte sich letztlich für das Design von Impfstoffen oder Adjuvantien in der Zukunft als hilfreich erweisen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hemmung der Virusreplikation durch das Virostatikum Ribavirin zu einer reduzierten Induktion von CXCL10 führt (Abbildung 3.7). Dies gab Hinweise auf die Auswirkungen von Replikation des Gelbfieberimpfvirus auf die Antwort des angeborenen Immunsystems. Obwohl RBV die virale RNA-Synthese hemmt (Graci & Cameron 2006), ist davon auszugehen, dass eine Restaktivität der RdRp von YF-17D bestehen bleibt. Somit kam es in diesen Experimenten wahrscheinlich zwar zu einer deutlichen Reduktion der viralen RNA-Produktion, jedoch konnte die Entstehung von Replikationsintermediaten und damit neuen PAMP vermutlich nicht vollständig verhindert werden. So erklären sich die niedrigeren CXCL10-Konzentrationen nach Behandlung mit RBV möglicherweise durch einen quantitativen Unterschied in RLR-Liganden durch reduzierte Replikation und nicht rein durch einen qualitativen im Sinne von vollständig abwesenden molekularen Mustern, die nur während der Virusreplikation entstehen.

4.3.2 Replikationsintermediate aktivieren die angeborene Immunantwort stärker als die ankommenden Virusgenome

Um Unterschiede in den immunstimulatorischen Eigenschaften von ankommenden Virusgenomen und RNA, die nur im Zuge der Replikation entsteht, erkennen zu können, wurde eine weitere Reihe von Experimenten durchgeführt. Das Ziel dieser Versuche war es, die Interferon-Antwort auf genomische Virus-RNA und auf RNA-Replikationsintermediate direkt zu vergleichen. Dafür war es notwendig, die Replikation des Virus möglichst vollständig zu unterdrücken. Da das Genom des Gelbfieberimpfvirus gleichzeitig die mRNA für alle viralen Proteine darstellt, beginnt der virale Replikationszyklus, sobald die Nukleinsäure in das Zytosol einer Zelle eingebracht wird. Für die Versuche wurde RNA aus Viruspartikeln und infizierten Zellen isoliert, um andere Zellen damit zu transfizieren. In diesen Zielzellen wurde die Translation mit Hilfe von Cycloheximid inhibiert, um die Produktion von für die Replikation notwendigen Virusproteinen zu verhindern. Da dies auch die Synthese von Zytokinen durch die Zelle hemmt, wurde die Quantifizierung von IFN- β -mRNA mittels qPCR anstatt eines CXCL10-ELISA durchgeführt. Um den Effekt von potentiell weiterhin auftretender Replikation zusätzlich zu verringern, wurde mit acht Stunden nach Transfektion ein relativ früher Zeitpunkt gewählt.

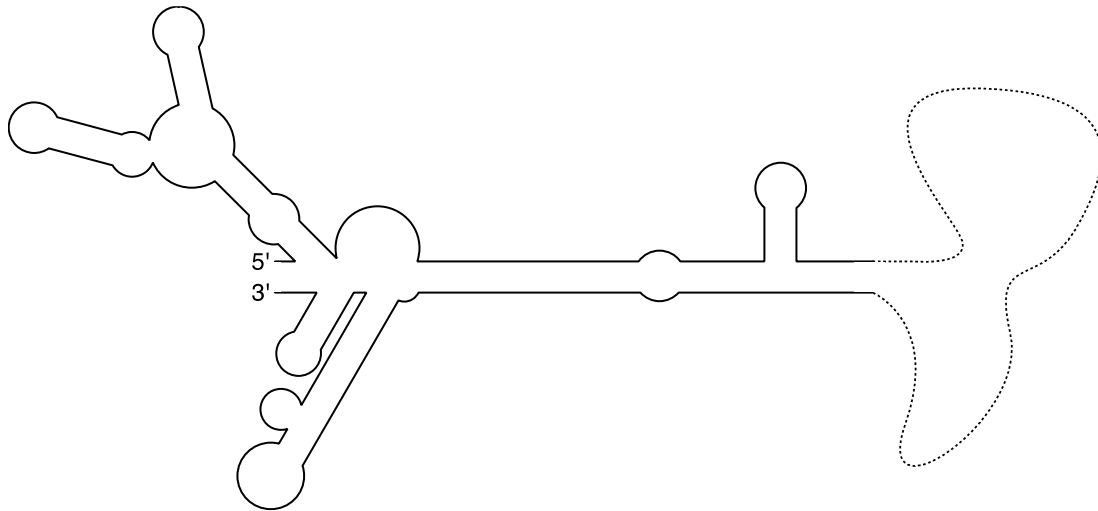


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung der genomischen Flavivirus-RNA Die RNA von Flaviviren bildet insbesondere an ihrem 5'- und 3'-Ende komplexe Sekundärstrukturen aus, welche unterschiedliche biologische Funktionen haben. Hier dargestellt ist die zirkularisierte Form eines Flavivirusgenoms, bei der es zu einer intramolekularen Interaktion zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der RNA kommt. Detailliert sind hier nur die 5'- und 3'-Regionen des Genoms dargestellt. Der Großteil der Virus-RNA ist nur symbolisch und verkleinert als gepunktete Linie abgebildet. (Modifiziert nach Mazeaud & Freppel 2018)

Die Replikationsintermediate führten zu einer signifikant höheren Interferon-Induktion im Vergleich zur genomischen RNA, wenn die gleiche Anzahl an Kopien von YF-17D-RNA zur Stimulation verwendet wurde (Abbildung 3.8). Diese Ergebnisse zeigen, dass während der RNA-Replikation des Gelbfieberimpfvirus molekulare Muster generiert werden, die die Immunantwort potenter anregen als die initial ankommenden Virusgenome. Ob die RLR in der Lage sind, die genomische RNA selbst zu erkennen, kann auch hier nicht sicher beantwortet werden. Es handelt sich bei der Erbinformation von YF-17D um ein einzelsträngiges RNA-Molekül, das mit einem Typ-I-Cap versehen ist. Damit entspricht es nicht den in der Literatur beschriebenen klassischen Liganden von RIG-I oder MDA5. Andererseits ist bekannt, dass Flavivirusgenome komplexe Sekundärstrukturen ausbilden, mit Abschnitten doppelsträngiger RNA insbesondere in ihren 5'- und 3'-UTR (Abbildung 4.2) (Mazeaud & Freppel et al. 2018). Möglicherweise könnten diese bereits von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt werden. In dem hier gewählten experimentellen Aufbau ist es jedoch auch möglich, dass durch eine inkomplette Translationshemmung durch Cycloheximid Replikation noch in einem geringen Ausmaß weiterhin stattfindet und dadurch die reduzierte, jedoch messbare Interferon-Induktion erklärbar ist. Experimente mit einer replikationsdefizienten Virusmutante könnten in der Zukunft abschließend klären, ob nur Replikationsintermediate oder auch das Virusgenom selbst von den RLR erkannt werden kann. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Replikation eine bedeutende Rolle für die Induktion der Typ-I-Interferonantwort auf die YF-17D-Infektion einnimmt.

4.3.3 Die Menge an immunstimulatorischer RNA erreicht ihren Höhepunkt 48 Stunden nach Infektion

In dieser Versuchsreihe zeigten sich noch weitere interessante Phänomene. Die intrazelluläre Viruslast nahm über die ersten 48 Stunden nach der primären Infektion zu, nach 72 Stunden war sie jedoch reproduzierbar stark vermindert (Abbildung 3.8 c). Auch die immunstimulatorischen Eigenschaften der RNA-Isolate aus diesen Zellen spiegelten dies mit einem deutlichen Abfall zum 72-Stunden-Zeitpunkt wider (Abbildung 3.8 b). Diese Beobachtungen könnten durch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems erklärbar sein. So wird durch Typ-I-Interferon ein antiviraler Zustand in Zellen induziert. Durch die Aktivität von RNase L, die in der Anwesenheit von dsRNA über Produkte von OAS-Proteinen aktiviert wird, könnte beispielsweise die Virus-RNA abgebaut werden. Für einige Flaviviren konnte ein antiviraler Effekt durch die OAS-RNase-L-Achse bereits gezeigt werden, unter anderem auch in einer Studie mit dem Gelbfieberimpfvirus in Mäusen (Berthoux 2020, Madden et al. 2019).

Eine unerwartete Beobachtung war, dass in der Kondition mit Translationshemmung durch CHX die Transfektion mit gRNA nach acht Stunden zu einer höheren Interferon- β -Induktion führte als in der Bedingung ohne CHX. Initial scheint dies gegen die Hypothese zu sprechen, dass virale Replikation zu einer gesteigerten Immunantwort führe. Wenn man jedoch den Zeitpunkt 24 Stunden nach der Transfektion betrachtet, zeigt sich das erwartete Bild. Ohne Replikationshemmung durch CHX induziert gRNA hier eine vielfach stärkere Interferonantwort als mit (Abbildung 3.8 d). Eine höhere Interferon-Induktion in der Gegenwart von CHX zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion konnte in der Vergangenheit auch für die Infektion mit dem Sendaivirus beobachtet werden (Ye & Maniatis 2011). Ein Erklärungsansatz für die Beobachtungen acht Stunden nach Transfektion besteht darin, dass durch die Wirkung von CHX keine Proteine des Virus produziert werden können, die die Interferon-Antwort unterdrücken. Für die Flaviviren DENV, WNV, JEV und ZIKV sind Mechanismen bekannt, mit denen ihre Nicht-Strukturproteine die Signalkaskade der RLR unterdrücken (Dalrymple et al. 2015, Ye et al. 2017, Ma et al. 2018). Es erscheint naheliegend, dass YF-17D über vergleichbare Mechanismen verfügt und sich dadurch anfänglich unter Translationshemmung eine stärkere Interferon-Induktion ausbilden könnte. Zu späteren Zeitpunkten, wenn Replikationsintermediate in Zellen ohne CHX-Behandlung zu akkumulieren beginnen, überwiegt jedoch der immunstimulatorische Effekt dieser gegenüber möglichen inhibitorischen Wirkungen der viralen Proteine.

4.4 Pathogen-assoziierte Muster des Gelbfieber-Replikationszyklus

4.4.1 RIG-I-like-Rezeptoren erkennen doppelsträngige RNA während der YF-17D-Infektion

Durch den enzymatischen Verdau von RNA aus infizierten Zellen konnte gezeigt werden, dass Doppelsträngigkeit der RNA eine absolute Voraussetzung für eine Interferonantwort in diesem Modell ist. Diese Daten passen zu den Ergebnissen, dass RIG-I und MDA5 die einzigen Rezeptoren in 1205Lu-Zellen sind, die zu einer Typ-I-Interferonantwort im Zuge einer YF-17D-Infektion führen. Für beide RLR ist Basenpaarung von RNA eine Voraussetzung für ihre Aktivierung (Rehwinkel & Gack 2020). Im Einklang damit konnte die Entstehung von dsRNA während der Virusreplikation konfokal-mikroskopisch nachgewiesen werden. Passend zu der relativ langsamen Interferon-Induktion konnten diese RNA-Spezies auch erst 48 Stunden nach der Infektion nachgewiesen werden (Abbildung 3.4).

Obwohl es sich beim Gelbfiebervirus 17D um ein einzelsträngiges RNA-Virus handelt, entstehen während der Replikation doppelsträngige RNA-Intermediate. Diese kommen durch die Synthese eines komplementären Negativstranges zum positiv-orientierten Virusgenom zustande. Die virale RNA-Produktion findet in Replikationskomplexen statt, die vesikelartige Einstülpungen in das ER darstellen (Klema et al. 2015). Die dsRNA in den infizierten Zellen erscheint nicht diffus im Zytosol, sondern als viele klar definierte Ansammlungen (Abbildung 3.4). Dieses Verteilungsmuster ist möglicherweise durch die lokale Konzentrierung der dsRNA in viralen Replikationskomplexen entlang des ER zu erklären. Neben der Bedeutung für eine effiziente virale RNA-Replikation geht man davon aus, dass die Replikationskomplexe auch eine Rolle bei der Immunevasion spielen. Flavivirale RNA soll in den Membraneinstülpungen vor der Erkennung durch zytosolische Rezeptoren geschützt werden (Överby et al. 2010, Espada-Murao & Morita 2011). Im Laufe der Infektion könnte es jedoch zu einer solchen Akkumulation von viraler RNA kommen, dass die abschirmenden Mechanismen nicht mehr ausreichen, und es letztlich doch zur Aktivierung von RLR kommt. Möglicherweise erklärt sich hierdurch teilweise auch die späte Typ-I-Interferon-Induktion durch YF-17D.

4.4.2 Unterschiedliche molekulare Muster spielen im Verlauf der Infektion eine Rolle

Neben Doppelsträngigkeit der RNA leisten 5'-Tri- oder 5'-Diphosphatgruppen ebenfalls einen bedeutenden Beitrag zur Immunantwort. Das Entfernen dieser Phosphate von der RNA führt zu einer signifikanten Reduktion der CXCL10-Induktion. Es bleibt jedoch eine Restantwort des angeborenen Immunsystems bestehen (Abbildung 3.5). Diese Beobachtungen passen zur Aktivierung mehrerer RLR, da ein Phosphatase-Verdau zwar die postulierten RIG-I-Liganden entfernt, jedoch keinen Einfluss auf die Erkennung mittels MDA5 haben sollte. Weil die Experimente mit KO-Zelllinien den Hinweis gaben, dass zu frühen Zeitpunkten nach der Infektion die Typ-I-Interferonantwort in erster Linie durch RIG-I ausgelöst wird, wurden die Daten aus den RNA-Verdau-Experimenten in Hinblick auf ihre zeitliche Dynamik analysiert. 24 Stunden nach der Infektion war die CXCL10-Induktion um über 90 % reduziert, wenn die verwendete RNA mit Phosphatasen behandelt wurde, während zu den späteren Zeitpunkten etwa ein Drittel der CXCL10-Sekretion bestehen blieb (Abbildung 3.6).

Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass initial nach der Infektion RNA-Spezies entstehen, die abhängig von 5'-Phosphatgruppen RIG-I aktivieren. Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es auch zur Produktion von MDA5-Liganden, die RIG-I-unabhängig zu einer Typ-I-Interferonantwort führen. Parallel zur Aktivierung von MDA5 lassen sich auch zunehmende Mengen an dsRNA in den infizierten Zellen nachweisen.

Die Aktivierung von RIG-I könnte durch die Synthese des Negativstranges erklärbar sein. Das ankommende Genom des Gelbfieberimpfvirus entspricht dem Positivstrang, der mit einem Typ-I-Cap versehen ist. Durch die Methylierung der ersten regulären Base an der 2'-O-Position sollte die Erkennung durch RIG-I verhindert werden (Schuberth-Wagner et al. 2015). Während der Replikation entsteht jedoch ein komplementärer Negativstrang, für den bislang keine 2'-O-Methylierung nachgewiesen werden konnte (Dong et al. 2014). Da das effiziente *Capping* abhängig von RNA-Sekundärstrukturen am 5'-Ende des Virusgenoms ist, erscheint es denkbar, dass negativ-orientierte RNA nicht oder nur unvollständig methyliert wird (Dong & Ray et al. 2007). Somit könnte während der Virusreplikation dsRNA ohne Basenüberhänge und mit freier 5'-Triphosphatgruppe entstehen. Dies entspricht den Voraussetzungen für klassische RIG-I-Liganden (Rehwinkel & Gack 2020). Die Hypothese wäre darüber hinaus kompatibel mit einer Replikationsabhängigkeit der Immunantwort auf das Gelbfieberimpfvirus. Ebenfalls passend dazu ist die verzögerte Aktivierung von MDA5 parallel zur Entstehung von detektierbaren Mengen dsRNA während der viralen RNA-Synthese.

4.5 Ausblick

4.5.1 Entstehen RLR-Liganden nur während der Virusreplikation?

Eine Möglichkeit, die Frage nach der Notwendigkeit von RNA-Replikation für die Erkennung durch das Immunsystem abschließend zu klären, besteht darin, replikationsdefiziente YF-17D-Viren zu generieren. Es wurde dafür ein experimentelles Konzept erarbeitet, bei dem Gelbfieberimpfviren mit defekter RdRp erzeugt werden. Hierzu wurden im Rahmen der Laborarbeit bereits Plasmide kloniert, die das Gelbfiebergenom kodieren, jedoch eine Deletion von neun Basen im NS5-Gen tragen. Um die RdRp-Aktivität dieses Proteins auszuschalten, wurde ein konserviertes Motiv von drei Aminosäuren entfernt (Δ GDD). Es konnte für die RNA-Polymerasen anderer Flaviviren gezeigt werden, dass dies zu einem Funktionsverlust führt (Khromykh et al. 1999). Die Virusproduktion könnte mittels Trans-Komplementierung durch Expression von funktionellem NS5 von einer mit der viralen Sequenz transduzierten Zelllinie geschehen.

Im Rahmen eines zukünftigen Projektes könnten diese Zellen generiert und anschließend replikationsdefizientes Virus produziert werden. Darauf folgend könnten Infektionsversuche mit diesem modifizierten Virus dann klären, ob die Aktivierung von RIG-I und MDA5 nur durch replizierendes Virus möglich ist.

4.5.2 Welche Bereiche der Gelbfieberimpfvirus-RNA binden an RIG-I und MDA5?

Um die immunstimulatorischen Liganden der RLR während der YF-17D-Infektion genauer beschreiben zu können, wurde im Rahmen dieses Projekts die Etablierung einer neuen Methode begonnen. *In vivo proximity labeling* (IPL) stellt eine Möglichkeit dar, Interaktionspartner (sowohl Proteine als auch RNA) von Proteinen mit einer Biotin-haltigen Sonde und Aktivierung durch UV-Licht zu markieren (Beck et al. 2014). Diese kann anschließend genutzt werden, um die gebundenen Moleküle mittels Streptavidin-gekoppelten *Beads* aufzureinigen und im Falle von RNA zu sequenzieren (Abbildung 4.3). Der Vorteil zu herkömmlicher Ko-Immunpräzipitation (Co-IP) besteht darin, dass die interagierenden Moleküle in der lebenden intakten Zelle bereits kovalent markiert werden. Dies soll Bindungen erhalten, die möglicherweise unter veränderten Pufferbedingungen während der Lyse oder weiteren Aufbereitungsschritten verlorengehen würden. Zugleich sollen unspezifische Signale durch Interaktionen, die erst außerhalb der Zelle während herkömmlicher Co-IP entstehen, verhindert werden.

Zu diesem Zweck wurden Plasmide für die retrovirale Transduktion kloniert, die RIG-I oder MDA5 enthalten. Für die Verwendung in IPL-Experimenten wurden die RLR mit einem monomeren Streptavidin-Tag versehen, der über einen flexiblen Linker mit entweder dem N- oder C-terminalen Ende der Rezeptoren verbunden ist. Im Rahmen des nachfolgenden Promotionsprojektes von Giulia Spielmann sollen diese Konstrukte genutzt werden um RNA-Liganden von RIG-I und MDA5 aus YF-17D-infizierten Zellen zu isolieren und durch *massive parallel sequencing näher* zu charakterisieren.

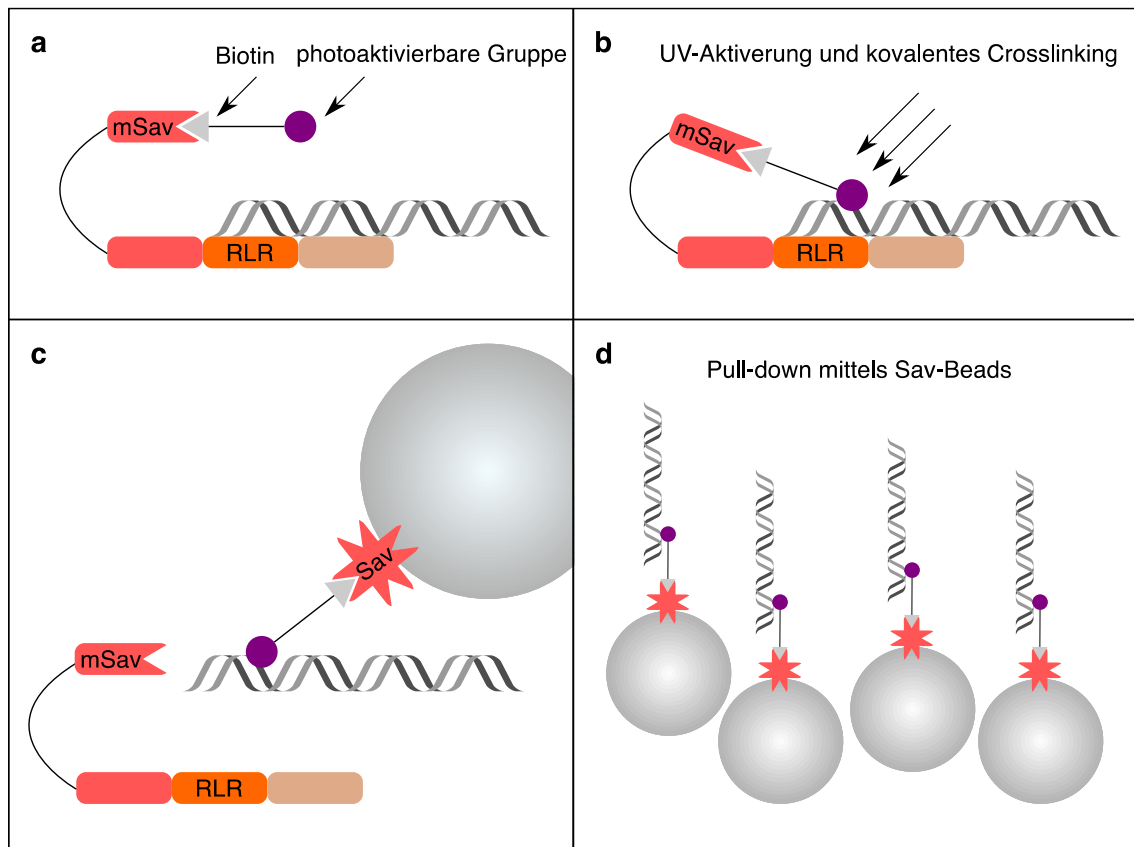


Abbildung 4.3 In vivo proximity labeling Schematische Darstellung der Methode (a) Zellen, die RIG-I oder MDA5 mit einem monomeren Streptavidin-Tag (mSav) exprimieren, werden mit Gelbfieber 17D infiziert. Zu bestimmten Zeitpunkten wird eine Sonde hinzugefügt, die an einem Ende eine Biotin- und am anderen eine photoaktivierbare Gruppe beinhaltet. Die Sonde wird durch das mSav zu den RIG-I-like-Rezeptoren (RLR) rekrutiert. (b) Durch Bestrahlung mit UV-Licht bindet die photoaktivierbare Gruppe an Liganden der RLR. (c) Nach Lyse der Zellen werden Streptavidin-Beads hinzugefügt. Durch die höhere Affinität von Biotin zu multimerem Streptavidin (Sav) als zu mSav bindet die Sonde präferentiell an die Beads. (d) Mittels Zentrifugation können schließlich die markierten Liganden der RLR aufgereinigt werden und anschließend durch RNA-Sequencing genauer charakterisiert werden.

5. Zusammenfassung

Die Gelbfieberimpfung stellt eine der effektivsten Impfungen der Geschichte dar. Eine einzelne Dosis dieser viralen Lebendvakzine induziert bei über 95 % der Geimpften eine neutralisierende Antikörperreaktion gegen das pathogene Gelbfiebervirus, die der Empfehlungen der WHO zufolge lebenslangen Schutz bietet. Die molekularen Mechanismen, die sich hinter der Induktion dieser Immunantwort verbergen, sind bislang nicht vollständig verstanden. Im Zuge der SARS-CoV-2-Pandemie wurde jedoch wieder deutlich, wie wichtig die Erforschung von Impfungen und der Antwort des Immunsystems auf Virusinfektionen ist. Beim Gelbfieberimpfstoff handelt es sich um ein attenuiertes Virus (YF-17D), das der Gattung der Flaviviren angehört. Zu diesen positiv-orientierten Einzelstrang-RNA-Viren zählen neben dem Gelbfiebervirus weitere hochrelevante humane Pathogene wie etwa das Dengue-Virus, Zika-Virus, Japanische-Enzephalitis-Virus, West-Nil-Virus und FSME-Virus.

Die frühe Erkennung einer Infektion durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems ist von besonderer Bedeutung, da die hierdurch ausgelösten Signale die Weichen für die Art der anschließenden adaptiven Immunantwort stellen. RIG-I und MDA5 sind zytosolische Proteine, die intrazelluläre Virus-RNA erkennen und zur Einleitung einer antiviralen Immunantwort führen. Ein besseres Verständnis der initialen Detektion der Infektion mit dem Gelbfieberimpfvirus könnte dazu beitragen, die Voraussetzungen für die Entstehung einer langlebigen, protektiven Immunität gegenüber Pathogenen zu klären.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Virusinfektion intrazellulär von den Rezeptoren RIG-I und MDA5 erkannt wird. Nach deren Aktivierung kommt es zu einer MAVS-abhängigen Typ-I-Interferon-Antwort. Es ergaben sich Hinweise darauf, dass die angeborene Immunantwort initial in erster Linie durch RIG-I vermittelt wird und MDA5 erst im weiteren Verlauf aktiviert wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Doppelsträngigkeit von RNA eine Voraussetzung für die Induktion von Typ-I-Interferonen ist. 5'-Tri- oder 5'-Diphosphatgruppen tragen ebenfalls zur Immunaktivierung bei, insbesondere zu frühen Zeitpunkten nach der YF-17D-Infektion. Passend dazu konnte mittels konfokaler *Laser-Scanning*-Mikroskopie die Entstehung von doppelsträngigen RNA-Replikationsintermediaten in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Virale Replikation stellte sich als entscheidend für die Erkennung durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems heraus.

Die Erkenntnisse der hier präsentierten Experimente könnten zukünftig zur rationalen Entwicklung neuer Impfstoffe und Adjuvantien beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Akondy RS, Johnson PLF, Nakaya HI, Edupuganti S, Mulligan MJ, Lawson B, Miller JD, Pulendran B, Antia R, Ahmed R. Initial viral load determines the magnitude of the human CD8 T cell response to yellow fever vaccination. *Proc Natl Acad Sci* 2015;112(10):3050–5.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413(6857):732–8.
- Appaiahgari MB, Vrati S. IMOJEV®: a Yellow fever virus-based novel Japanese encephalitis vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2010;9(12):1371–84.
- Aznar MA, Molina C, Teijeira A, Rodriguez I, Azpilikueta A, Garasa S, Sanchez-Paulete AR, Cordeiro L, Etxeberria I, Alvarez M, Rius-Rocabert S, Nistal-Villan E, Berraondo P, Melero I. Repurposing the yellow fever vaccine for intratumoral immunotherapy. *EMBO Mol Med* 2020;12(1):e10375.
- Barba-Spaeth G, Longman RS, Albert ML, Rice CM. Live attenuated yellow fever 17D infects human DCs and allows for presentation of endogenous and recombinant T cell epitopes. *J Exp Med* 2005;202(9):1179–84.
- Barrett ADT. Yellow Fever in Angola and Beyond — The Problem of Vaccine Supply and Demand. *N Engl J Med* 2016;375(4):301–3.
- Barrows NJ, Campos RK, Liao K, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh S, Schott-Lerner G, Pompon J, Sessions OM, Bradrick SS, Garcia-Blanco MA. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev* 2018;118(8):4448–82.
- Bastard P, Michailidis E, Hoffmann H, et al. Auto-antibodies to type I IFNs can underlie adverse reactions to yellow fever live attenuated vaccine. *J Exp Med* 2021;218(4):e20202486.
- Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370(6515):eabd4585.
- Beck DB, Narendra V, Drury WJ, Casey R, Jansen PWTC, Yuan Z-F, Garcia BA, Vermeulen M, Bonasio R. In Vivo Proximity Labeling for the Detection of Protein–Protein and Protein–RNA Interactions. *J Proteome Res* 2014;13(12):6135–43.
- Berthoux L. The Restrictome of Flaviviruses. *Virology* 2020;35(4):363–77.
- Bothe V. Identification and characterization of activators and modulators in the antiviral RIG-I-like receptor pathway. 2019;
- Brisse M, Ly H. Comparative Structure and Function Analysis of the RIG-I-Like

- Receptors: RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 2019;10:1586.
- Brownell J, Bruckner J, Wagoner J, Thomas E, Loo Y-M, Gale M, Liang TJ, Polyak SJ. Direct, Interferon-Independent Activation of the CXCL10 Promoter by NF- κ B and Interferon Regulatory Factor 3 during Hepatitis C Virus Infection. *J Virol* 2014;88(3):1582–90.
- Bruni D, Chazal M, Sinigaglia L, Chauveau L, Schwartz O, Desprès P, Jouvenet N. Viral entry route determines how human plasmacytoid dendritic cells produce type I interferons. *Sci Signal* 2015;8(366):ra25–ra25.
- Chow KT, Gale M, Loo Y. RIG-I and Other RNA Sensors in Antiviral Immunity. *Annu Rev Immunol* 2018;36(1):667–94.
- Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol* 2015;15(4):231–42.
- Daffis S, Samuel MA, Suthar MS, Gale M, Diamond MS. Toll-Like Receptor 3 Has a Protective Role against West Nile Virus Infection. *J Virol* 2008;82(21):10349–58.
- Dalrymple NA, Cimica V, Mackow ER. Dengue Virus NS Proteins Inhibit RIG-I/MAVS Signaling by Blocking TBK1/IRF3 Phosphorylation: Dengue Virus Serotype 1 NS4A Is a Unique Interferon-Regulating Virulence Determinant. *MBio* 2015;6(3):e00553-15.
- De Giovanni M, Cutillo V, Giladi A, Sala E, Maganuco CG, Medaglia C, Di Lucia P, Bono E, Cristofani C, Consolo E, Giustini L, Fiore A, Eickhoff S, Kastenmüller W, Amit I, Kuka M, Iannaccone M. Spatiotemporal regulation of type I interferon expression determines the antiviral polarization of CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2020;21(3):321–30.
- Dong H, Fink K, Züst R, Lim SP, Qin C-F, Shi P-Y. Flavivirus RNA methylation. *J Gen Virol* 2014;95(4):763–78.
- Dong H, Ray D, Ren S, Zhang B, Puig-Basagoiti F, Takagi Y, Ho CK, Li H, Shi P-Y. Distinct RNA Elements Confer Specificity to Flavivirus RNA Cap Methylation Events. *J Virol* 2007;81(9):4412–21.
- Errett JS, Suthar MS, McMillan A, Diamond MS, Gale M. The Essential, Nonredundant Roles of RIG-I and MDA5 in Detecting and Controlling West Nile Virus Infection. *J Virol* 2013;87(21):11416–25.
- Espada-Murao LA, Morita K. Delayed Cytosolic Exposure of Japanese Encephalitis Virus Double-Stranded RNA Impedes Interferon Activation and Enhances Viral Dissemination in Porcine Cells. *J Virol* 2011;85(13):6736–49.
- Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini

- A, Despres P, Sauvonnnet N, Arenzana-Seisdedos F, Jouvenet N, Amara A. Vaccine and Wild-Type Strains of Yellow Fever Virus Engage Distinct Entry Mechanisms and Differentially Stimulate Antiviral Immune Responses. *MBio* 2016;7(1):e01956-15.
- Fredericksen BL, Keller BC, Fornek J, Katze MG, Gale M. Establishment and Maintenance of the Innate Antiviral Response to West Nile Virus Involves both RIG-I and MDA5 Signaling through IPS-1. *J Virol* 2008;82(2):609–16.
- Garcia-Blanco MA, Vasudevan SG, Bradrick SS, Nicchitta C. Flavivirus RNA transactions from viral entry to genome replication. *Antiviral Res* 2016;134:244–9.
- Garske T, Van Kerkhove MD, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Staples JE, Perea W, Ferguson NM. Yellow Fever in Africa: Estimating the Burden of Disease and Impact of Mass Vaccination from Outbreak and Serological Data. *PLoS Med* 2014;11(5):e1001638.
- Gitlin L, Barchet W, Gilfillan S, Cella M, Beutler B, Flavell RA, Diamond MS, Colonna M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. *Proc Natl Acad Sci* 2006;103(22):8459–64.
- Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schubert C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti J a., Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. *Nature* 2014;514(7522):372–5.
- Graci JD, Cameron CE. Mechanisms of action of ribavirin against distinct viruses. *Rev Med Virol* 2006;16(1):37–48.
- Helms MW, Jahn-Hofmann K, Gnerlich F, Metz-Weidmann C, Braun M, Dietert G, Scherer P, Grandien K, Theilhaber J, Cao H, Wagenaar TR, Schnurr MM, Endres S, Wiederschain D, Scheidler S, Rothenfußer S, Brunner B, König LM. Utility of the RIG-I Agonist Triphosphate RNA for Melanoma Therapy. *Mol Cancer Ther* 2019;18(12):2343–56.
- Hernandez N, Bucciol G, Moens L, et al. Inherited IFNAR1 deficiency in otherwise healthy patients with adverse reaction to measles and yellow fever live vaccines. *J Exp Med* 2019;216(9):2057–70.
- Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzozka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann K-K, Schlee M, Endres S, Hartmann G. 5'-Triphosphate RNA Is the Ligand for RIG-I. *Science* 2006;314(5801):994–7.

- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc London Ser B - Biol Sci 1957;147(927):258–67.
- Kaiser R. Frühsommermeningoenzephalitis. Nervenarzt 2016;87(6):667–80.
- Khromykh A a, Kenney MT, Westaway EG. trans-Complementation of Flavivirus RNA Polymerase Gene NS5 by Using Kunjin Virus Replicon-Expressing BHK Cells. J Virol 1998;72(9):7270–9.
- Klema V, Padmanabhan R, Choi K. Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. Viruses 2015;7(8):4640–56.
- Koyama S, Aoshi T, Tanimoto T, Kumagai Y, Kobiyama K, Tougan T, Sakurai K, Coban C, Horii T, Akira S, Ishii KJ. Plasmacytoid Dendritic Cells Delineate Immunogenicity of Influenza Vaccine Subtypes. Sci Transl Med 2010;2(25):25ra24.
- Labun K, Montague TG, Gagnon JA, Thyme SB, Valen E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. Nucleic Acids Res 2016;44(W1):W272–6.
- Lazear HM, Pinto AK, Ramos HJ, Vick SC, Shrestha B, Suthar MS, Gale M, Diamond MS. Pattern Recognition Receptor MDA5 Modulates CD8+ T Cell-Dependent Clearance of West Nile Virus from the Central Nervous System. J Virol 2013;87(21):11401–15.
- Lazear HM, Schoggins JW, Diamond MS. Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. Immunity 2019;50(4):907–23.
- Leyssen P, Balzarini J, De Clercq E, Neyts J. The Predominant Mechanism by Which Ribavirin Exerts Its Antiviral Activity In Vitro against Flaviviruses and Paramyxoviruses Is Mediated by Inhibition of IMP Dehydrogenase. J Virol 2005;79(3):1943–7.
- Liu G, Gack MU. Distinct and Orchestrated Functions of RNA Sensors in Innate Immunity. Immunity 2020;53(1):26–42.
- Ma J, Ketkar H, Geng T, Lo E, Wang L, Xi J, Sun Q, Zhu Z, Cui Y, Yang L, Wang P. Zika Virus Non-structural Protein 4A Blocks the RLR-MAVS Signaling. Front Microbiol 2018;9:1350.
- Madden JC, Cui D, Brinton MA. RNase L Antiviral Activity Is Not a Critical Component of the Oas1b-Mediated Flavivirus Resistance Phenotype. J Virol 2019;93(22):1–14.
- Matsumiya T, Stafforini DM. Function and Regulation of Retinoic Acid-Inducible Gene-I. Crit Rev Immunol 2010;30(6):489–513.

- Mazeaud C, Freppel W, Chatel-Chaix L. The Multiples Fates of the Flavivirus RNA Genome During Pathogenesis. *Front Genet* 2018;9(December):595.
- Nasirudeen AMA, Wong HH, Thien P, Xu S, Lam K-P, Liu DX. RIG-I, MDA5 and TLR3 Synergistically Play an Important Role in Restriction of Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5(1):e926.
- Nazmi A, Dutta K, Hazra B, Basu A. Role of pattern recognition receptors in flavivirus infections. *Virus Res* 2014;185:32–40.
- Överby AK, Popov VL, Niedrig M, Weber F. Tick-Borne Encephalitis Virus Delays Interferon Induction and Hides Its Double-Stranded RNA in Intracellular Membrane Vesicles. *J Virol* 2010;84(17):8470–83.
- Paules CI, Fauci AS. Yellow Fever — Once Again on the Radar Screen in the Americas. *N Engl J Med* 2017;376(15):1397–9.
- Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* 2020;5(6):796–812.
- Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. *Nat Rev Immunol* 2009;9(10):741–7.
- Pulendran B, Ahmed R. Immunological mechanisms of vaccination. *Nat Immunol* 2011;12(6):509–17.
- Querec TD, Akondy RS, Lee EK, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol* 2009;10(1):116–25.
- Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, Akira S, Ahmed R, Pulendran B. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *J Exp Med* 2006;203(2):413–24.
- Rehwinkel J, Gack MU. RIG-I-like receptors: their regulation and roles in RNA sensing. *Nat Rev Immunol* 2020;20(9):537–51.
- Reikine S, Nguyen JB, Modis Y. Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5. *Front Immunol* 2014;5:342.
- Sanchez-Felipe L, Vercruyssen T, Sharma S, et al. A single-dose live-attenuated YF17D-vectored SARS-CoV-2 vaccine candidate. *Nature* 2021;590(7845):320–5.
- Schlee M, Hartmann G. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat Rev Immunol* 2016;16(9):566–80.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex

- Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol* 2014;32(1):513–45.
- Schoggins JW. Interferon-Stimulated Genes: What Do They All Do? *Annu Rev Virol* 2019;6(1):567–84.
- Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, et al. A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA. *Immunity* 2015;43(1):41–51.
- Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 2016;351(6268):84–8.
- Sprokholt JK, Kaptein TM, van Hamme JL, Overmars RJ, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH. RIG-I-like receptor activation by dengue virus drives follicular T helper cell formation and antibody production. *PLOS Pathog* 2017;13(11):e1006738.
- Staples JE, Barrett ADT, Wilder-Smith A, Hombach J. Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. *npj Vaccines* 2020;5(1):54.
- Sultan M, Amstislavskiy V, Risch T, Schuette M, Dökel S, Ralser M, Balzereit D, Lehrach H, Yaspo M-L. Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics* 2014;15(1):675.
- Suthar MS, Ma DY, Thomas S, Lund JM, Zhang N, Daffis S, Rudensky AY, Bevan MJ, Clark EA, Kaja M, Diamond MS, Gale M. IPS-1 Is Essential for the Control of West Nile Virus Infection and Immunity. *PLoS Pathog* 2010;6(2):e1000757.
- Tripathi NK, Shrivastava A. Recent Developments in Recombinant Protein-Based Dengue Vaccines. *Front Immunol* 2018;9:1919.
- Tsai Y-T, Chang S-Y, Lee C-N, Kao C-L. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. *Cell Microbiol* 2009;11(4):604–15.
- Ugolini M, Gerhard J, Burkert S, et al. Recognition of microbial viability via TLR8 drives TFH cell differentiation and vaccine responses. *Nat Immunol* 2018;19(4):386–96.
- Wieten RW, Jonker EFF, van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, ten Berge IJM, de Visser AW, van Genderen PJJ, Goorhuis A, Visser LG, Grobusch MP, de Bree GJ. A Single 17D Yellow Fever Vaccination Provides Lifelong Immunity; Characterization of Yellow-Fever-Specific Neutralizing Antibody and T-Cell Responses after Vaccination. *PLoS One* 2016;11(3):e0149871.
- Ye J, Chen Z, Li Y, Zhao Z, He W, Zohaib A, Song Y, Deng C, Zhang B, Chen H, Cao S. Japanese Encephalitis Virus NS5 Inhibits Type I Interferon (IFN) Production by Blocking the Nuclear Translocation of IFN Regulatory Factor 3 and NF- κ B. *J Virol* 2017;91(8):e00039-17.

- Ye J, Maniatis T. Negative Regulation of Interferon- β Gene Expression during Acute and Persistent Virus Infections. *PLoS One* 2011;6(6):e20681.
- Yoneyama M, Onomoto K, Jogi M, Akaboshi T, Fujita T. Viral RNA detection by RIG-I-like receptors. *Curr Opin Immunol* 2015;32:48–53.
- Zhang Q, Bastard P, Liu Z, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science* 2020;370(6515):eabd4570.
- Züst R, Cervantes-Barragan L, Habjan M, Maier R, Neuman BW, Ziebuhr J, Szretter KJ, Baker SC, Barchet W, Diamond MS, Siddell SG, Ludewig B, Thiel V. Ribose 2'-O-methylation provides a molecular signature for the distinction of self and non-self mRNA dependent on the RNA sensor Mda5. *Nat Immunol* 2011;12(2):137–43.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

6-FAM	6-Carboxyfluorescein
APC	Antigenpräsentierende Zellen
C	Capsid
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
CHX	Cycloheximid
Co-IP	Ko-Immunpräzipitation
cRNA	RNA aus nicht-infizierten Zellen
CTD	<i>C-terminal domain</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DENV	Dengue-Virus
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige Ribonukleinsäure
E	<i>Envelope proteine</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fetales Kälberserum
FSME	Frühsommer-Meningoenzephalitis
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gRNA	Genomische Virus-RNA
h.p.i.	Stunden nach Infektion (<i>hours post infection</i>)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
icRNA	RNA aus infizierten Zellen
IFN	Interferon
IFN-I	Typ-I-Interferon
IFNAR1	Interferon- α/β -Rezeptoruntereinheit-1
IFNAR2	Interferon- α/β -Rezeptoruntereinheit-2
ILC	Angeborene lymphatische Zellen
IPL	<i>In vivo proximity labeling</i>
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimulierte Gene
JEV	Japanische-Enzephalitis-Virus
KO	<i>Knock-out</i>
LGP2	<i>Laboratory of Genetics and Physiology 2</i>

M	<i>Membrane protein</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i>
MHC-I	<i>Major histocompatibility complex I</i>
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger-RNA
mSav	Monomeres Streptavidin
NEB	New England Biolabs
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NS	Nicht-Struktur-Protein
OAS	Oligoadenylat-Synthase
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFU	<i>Plaque forming unit</i>
PKR	Proteinkinase R
Poly I:C	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure
pppRNA	Triphosphat-RNA
prM	<i>Precursor of membrane protein</i>
PRR	<i>Pattern-recognition-Rezeptor</i>
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RBV	Ribavirin
RD	<i>Repressor domain</i>
RdRp	RNA-abhängige RNA-Polymerase
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
RLR	<i>RIG-I-like-Rezeptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
Sav	Streptavidin
sgRNA	<i>Single guide RNA</i>
ssRNA	Einzelsträngige Ribonukleinsäure
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus (FSME-Virus)</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
UTR	Untranslatierte Region
WNV	West-Nil-Virus

WT	Wildtyp
YF-17D	Gelbfieberimpfvirus 17D
YFV	Yellow fever virus
ZIKV	Zika-Virus

8. Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Professor Simon Rothenfuß, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem Projekt zu arbeiten und immer ein freundliches, kollegiales Umfeld geschaffen hat. Besonders schätze ich, dass es stets möglich war auf Augenhöhe miteinander zu diskutieren.

Ich möchte mich auch bei Professor Stefan Endres für seine Hilfe und sein persönliches Mentoring bedanken. Durch seine Bemühungen herrschte immer eine familiäre Atmosphäre in der Abteilung für Klinische Pharmakologie.

Ich möchte mich bei Dr. Julia Thorn-Seshold für die wissenschaftliche Betreuung und Einarbeitung bedanken.

Mein Dank gilt auch Dr. Dharmendra Pandey, Dr. Lars Koenig und Dr. Viktoria Bothe für die hervorragende Hilfe bezüglich methodischer Fragen. Außerdem möchte ich mich bei Giulia Spielmann für die Fortsetzung des Projektes bedanken.

Vielen Dank an Natalie Röder und Frank Dahlström für die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium in dieser Form ermöglicht haben und mich ermutigt haben, meinen wissenschaftlichen Interessen in dieser Tiefe zu folgen. Außerdem möchte ich mich bei ihnen für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Schwestern Bernadette und Lisa für ihre Unterstützung bedanken.

Ich möchte mich bei Dr. Leonie Kertess für die fachlichen Diskussionen und den wissenschaftlichen Input bedanken. Vielen Dank für das Korrekturlesen und sämtliche Unterstützung während der Arbeit an meiner Dissertation.

9. Veröffentlichungen

Buffolo F, Pecori A, Reincke M, Outland M, Veglio F, **Schwarzlmüller P**, Bidlingmaier

- M, Kunz S, Stremmel C, Mengozzi G, Priolo G, Mulatero P, Adolf C, Monticone S. Long-Term Follow-Up of Patients With Elevated Aldosterone-to-Renin Ratio but Negative Confirmatory Test: The Progression of Primary Aldosteronism Phenotypes. *Hypertension* 2024;81(2):340–7.
- Bruedgam D, Adolf C, Schneider H, **Schwarzmueller P**, Mueller L, Handgriff L, Bidlingmaier M, Kunz S, Zimmermann P, Deniz S, Williams TA, Beuschlein F, Reincke M, Heinrich DA. Postoperative ACTH-stimulated aldosterone predicts biochemical outcome in primary aldosteronism. *Eur J Endocrinol* 2023;189(6):611–8.
- Schwarzmueller P**, Corradini S, Seidensticker M, Zimmermann P, Schreiner J, Maier T, Triebig A, Knösel T, Pazos M, Pfluger T, Weigand I, Belka C, Ricke J, Reincke M, Schmidmaier R, Kroiss M. High-Dose Rate Brachytherapy Combined with PD-1 Blockade as a Treatment for Metastatic Adrenocortical Carcinoma – A Single Center Case Series. *Horm Metab Res* 2024;56(01):30–7.
- Spyroglou A, Handgriff L, Müller L, **Schwarz Müller P**, Parasiliti-Capriano M, Fuss CT, Remde H, Hirsch A, O'Toole SM, Thuzar M, Petramala L, Letizia C, Deflorenne E, Amar L, Vrckovnik R, Kocjan T, Zhang CD, Li D, Singh S, Katabami T, Yoneda T, Murakami M, Wada N, Inagaki N, Quinkler M, Ghigo E, Maccario M, Stowasser M, Drake WM, Fassnacht M, Bancos I, Reincke M, Naruse M, Beuschlein F. The metabolic phenotype of patients with primary aldosteronism: impact of subtype and sex – a multicenter-study of 3566 Caucasian and Asian subjects. *Eur J Endocrinol* 2022;187(3):361–72.
- Scheck MK, Lehmann L, Zaucha M, **Schwarzmueller P**, Huber K, Pritsch M, Barba-Spaeth G, Thorn-Seshold O, Krug AB, Endres S, Rothenfusser S, Thorn-Seshold J. FluoRNT: A robust, efficient assay for the detection of neutralising antibodies against yellow fever virus 17D. *PLoS One* 2022;17(2):e0262149.
- Linder A, Bothe V, Linder N, **Schwarzmueller P**, Dahlström F, Bartenhagen C, Dugas M, Pandey D, Thorn-Seshold J, Boehmer DFR, Koenig LM, Kobold S, Schnurr M, Raedler J, Spielmann G, Karimzadeh H, Schmidt A, Endres S, Rothenfusser S. Defective Interfering Genomes and the Full-Length Viral Genome Trigger RIG-I After Infection With Vesicular Stomatitis Virus in a Replication Dependent Manner. *Front Immunol* 2021;12(April):5953