

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Leiter: Prof. Dr. med. Stefan Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Die Bedeutung der Mitochondrien in der angeborenen intrazellulären anti-viralen Immunität: Charakterisierung des mitochondrialen Proteins CRIF1

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Simon Hirschberger

aus Bobingen

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichtersteller: Prof. Dr. med. Simon Rothenfuß

Mitberichterstellerinnen: PD Dr. Barbara Adler
PD Dr. Ursula Zimmer-Strobl

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Christian Wißkirchen

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2019

„Was man zu verstehen gelernt hat, fürchtet man nicht mehr.“
(Marie Curie, 1867-1934)

Meiner Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	8
1.1	Mitochondrien und ihre Rolle im Zellstoffwechsel	8
1.1.1	Mitochondrien als eukaryotische Zellorganellen	8
1.1.2	Die Endosymbiontentheorie über die Abstammung der Mitochondrien	8
1.1.3	Die Ox-Tox-Hypothese als Erklärung für die Endosymbiontentheorie	9
1.1.4	Struktur der Mitochondrien	10
1.1.5	Vielfältige Helfer: Physiologische Aufgaben der Mitochondrien	10
1.1.6	Mitochondriale Energiebereitstellung: Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung	11
1.1.7	Das mitochondriale Membranpotential	12
1.1.8	<i>Reactive Oxygen Species</i>	13
1.2	Die angeborene antivirale Immunität	14
1.2.1	<i>First line of defense</i> : Grundlagen des angeborenen Immunsystems	14
1.2.2	Die <i>Rig-I-like</i> Rezeptoren	15
1.2.3	Typ I Interferone	18
1.2.4	Pro-inflammatorische Zytokine	18
1.2.5	Die Funktion von MAVS	19
1.3	Fragestellung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	23
2.1	Material	23
2.1.1	Technische Ausstattung	23
2.1.2	Chemikalien für biochemische Methoden	24
2.1.3	Chemikalien für zellbiologische Methoden	25
2.1.4	Chemikalien für molekularbiologische Methoden	26
2.1.5	Reagenziensätze	27
2.1.6	Materialien für die Zellkultur	28
2.1.7	Zelllinien	28
2.1.8	Zellkulturmedien	29
2.1.9	Lösungen für molekularbiologische und biochemische Methoden	29
2.1.10	Viren	30
2.1.11	siRNA	30
2.1.12	Plasmide	30
2.1.13	Primer	31
2.1.14	Antikörper	32
2.1.15	Software	32
2.2	Methoden	33
2.2.1	Zellkultur	33
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.3	Restriktionsenzymverdau	34

2.2.4	DNA-Ligation	35
2.2.5	LB-Medium	35
2.2.6	Bakterientransformation	35
2.2.7	Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien (Miniprep)	36
2.2.8	Ethidiumbromid Gelelektrophorese	36
2.2.9	Durchflusszytometrie	37
2.2.10	Mitochondriale Membranfärbung mit JC-1	37
2.2.11	FCCP	38
2.2.12	siRNA <i>knock-down</i>	38
2.2.13	Das Cre-Lox-Rekombinationssystem	39
2.2.14	Die CRIF1 Genomregion	41
2.2.15	Das MSCV-Cre System	41
2.2.16	Das Tat-NLS-Cre System	42
2.2.17	Das Tet-On Cre System	43
2.2.18	Herstellung der stabilen MEF flx/flx CRIF1 Tet-on Cre Zelllinie	46
2.2.19	poly I:C Immunstimulation	49
2.2.20	VSV-Infektionsassays	49
2.2.21	Viraler <i>Entry</i>	49
2.2.22	VSV-GFP-Konfokalmikroskopie	50
2.2.23	VSV-GFP-FACS	50
2.2.24	<i>Enzyme-linked Immunosorbent assay</i> (ELISA)	50
2.2.25	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot	51
2.2.26	Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR	51
2.2.27	Messung der zellulären LDL-Aufnahme	53
2.2.28	Quantifizierung des zellulären Proteingehaltes: <i>Bradford-Assay</i>	53
2.2.29	Darstellung der Zellviabilität mittels <i>CellTiter Blue Assay</i>	53
2.2.30	<i>Seahorse extracellular flux analyzer</i> : Messung des Sauerstoffverbrauchs in Zellkultur	54
2.2.31	Statistik	55
3	ERGEBNISSE	56
3.1	Der <i>knock-out</i> von CRIF1 durch retrovirale Cre Überexpression führt zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials	56
3.2	CRIF1 <i>knock-out</i> durch Tat-NLS-Cre Transduktion	58
3.2.1	Tat-NLS-Cre Transduktion führt zur vollständigen Deletion von CRIF1	58
3.2.2	Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials nach CRIF1 <i>knock-out</i>	59
3.2.3	Verstärkte Interferon- β Expression nach 12-stündiger poly I:C Stimulation unter CRIF1 <i>knock-out</i>	60
3.3	Erfolgreicher Tet-on Cre vermittelter CRIF1 <i>knock-out</i>	62
3.4	CRIF1 ist unabdingbar für das Überleben von murinen embryonalen Fibroblasten	64
3.5	Verlust von CRIF1 führt zu einer Verminderung der Expression der Atmungskettenkomplexe und einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials	65
3.5.1	Deutlicher Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials nach Tet-On Cre induziertem CRIF1 <i>knock-out</i>	65
3.5.2	Keine Veränderung der CRIF1-Expression und des mitochondrialen Membranpotentials durch das Antibiotikum Doxycyclin	65
3.5.3	Verlust der Atmungskettenproteine durch CRIF1-Depletion	66
3.6	Verringerter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach CRIF1 <i>knock-out</i>	67

3.7	Verstärkte Immunantwort in CRIF1 -/- MEF	69
3.7.1	Gesteigerte antivirale Zytokinexpression in Doxycyclin-induzierten CRIF1 -/- MEF	69
3.7.2	Verstärkte Zytokinantwort in MEF CRIF1 -/- nach poly I:C Stimulation beruht nicht auf einer schnelleren Induktion der Immunantwort	70
3.7.3	Zunahme der Immunantwort bei VSV-Infektion	71
3.7.4	Keine Veränderung der basalen Zytokinlevel nach CRIF1 <i>knock-out</i>	71
3.7.5	Die Inhibition der poly I:C induzierten Zytokinproduktion durch Blockade des Interferonrezeptors ist unabhängig von der An- oder Abwesenheit von CRIF1	72
3.7.6	FCCP führt zu einer Abnahme der Immunantwort in MEF	73
3.8	Die antivirale Bedeutung von Rad23A im Rahmen des CRIF1 <i>knock-outs</i>	75
3.8.1	Rad23A <i>knock-down</i> durch CRIF1-Depletion	75
3.8.2	siRNA vermittelter CRIF1 <i>knock-down</i> verursacht quantitativ unveränderten Rad23A- <i>knock-down</i>	75
3.8.3	siRNA vermittelter Rad23A <i>knock-down</i> wirkt immunsuppressiv in MEF	76
3.9	Erhöhte virale Suszeptibilität nach CRIF1 <i>knock-out</i>	78
3.9.1	Verstärkte Virusinfektion in CRIF1-defizienten Zellen	78
3.9.2	Verstärkter Virus-Entry nach CRIF1 <i>knock-out</i>	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	81
4.2	CRIF1 ist essentiell für die Expression und Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette	83
4.3	CRIF1 als negativer Regulator der angeborenen antiviralen Immunität	84
4.3.1	Gesteigerte antivirale Zytokinproduktion unter CRIF1 <i>knock-out</i>	84
4.3.2	CRIF1 <i>knock-out</i> beeinflusst die antivirale Immunität vor Aktivierung des IFNAR	84
4.3.3	Kein spezifischer Einfluss von Rad23A auf die angeborene Immunität	85
4.4	Der Einfluss des mitochondrialen Membranpotentials auf die RIG-I Signalkaskade	86
4.5	Ursachen der gesteigerten viralen Suszeptibilität in CRIF1 -/- MEF	87
4.5.1	Gesteigerte virale Suszeptibilität kann nicht durch veränderte Rezeptor-Expression oder gesteigerte Zellpermeabilität erklärt werden	87
4.5.2	Auswirkungen des CRIF1 <i>knock-outs</i> auf die Post-Internalisierungs-Phase von VSV	88
4.5.3	Gesteigerte Virusreplikation durch optimierte Energiebereitstellung in CRIF1 -/- MEF	89
4.6	ROS als möglicher CRIF1-abhängiger Modulator der antiviralen Immunität	90
4.6.1	Der Einfluss von CRIF1 und des mitochondrialen Membranpotentials auf ROS	90
4.6.2	Der Einfluss von ROS auf die RLR-Signalkaskade	90
4.6.3	CRIF1-abhängige Modulation der antiviralen Zytokinproduktion durch ROS	90
4.7	Der antivirale Warburg-Effekt: „trained immunity“	92
4.8	Wechselwirkungen zwischen Metabolismus, Struktur und angeborener Immunität: Ein mögliches Modell für die Folgen des CRIF1 <i>knock-outs</i>	93
4.8.1	Dynamik der mitochondrialen Morphologie	93
4.8.2	Die Bedeutung des mitochondrialen Netzwerkes für die Bildung von MAVS-Prionen	93
4.8.3	Zusammenfassende Hypothese über die metabolisch-strukturell-immunologischen Folgen des CRIF1 <i>knock-outs</i>	94

5	ZUSAMMENFASSUNG	96
6	LITERATURVERZEICHNIS	98
7	VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND AKRONYME	110
8	DANKSAGUNG	114
9	PUBLIKATIONEN	115
10	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	116

1 Einleitung

1.1 Mitochondrien und ihre Rolle im Zellstoffwechsel

1.1.1 Mitochondrien als eukaryotische Zellorganellen

Alle aufbauenden Prozesse in einer Zelle oder einem Organismus sind unabdingbar auf die Bereitstellung chemischer Energie angewiesen. Das universelle Speichermolekül dafür ist Adenosintriphosphat (ATP), welches aufgrund seiner energiereichen Phosphorsäureanhydridbindungen einen Energiegehalt von rund 30,5 kJ/mol besitzt. Aerobe Lebewesen nutzen die bei der oxidativen Phosphorylierung freiwerdende Energie, um damit letztlich aus ADP und anorganischem Phosphat neues ATP zu generieren.

In eukaryotischen Zellen finden diese elementaren Prozesse in Mitochondrien statt. Dabei handelt es sich um ubiquitär vorkommende Organellen mit einer Phospholipiddoppelmembran. Diese Eigenschaft unterscheidet Mitochondrien von anderen Zellorganellen. Darüber hinaus besitzen sie als einzige eukaryotische Zellorganellen eigene genetische Informationen, welche in mitochondrialer DNA (mtDNA) kodiert sind. Dieses Wissen hat bereits früh die Frage nach der phylogenetischen Abstammung der Mitochondrien aufgeworfen.

1.1.2 Die Endosymbiontentheorie über die Abstammung der Mitochondrien

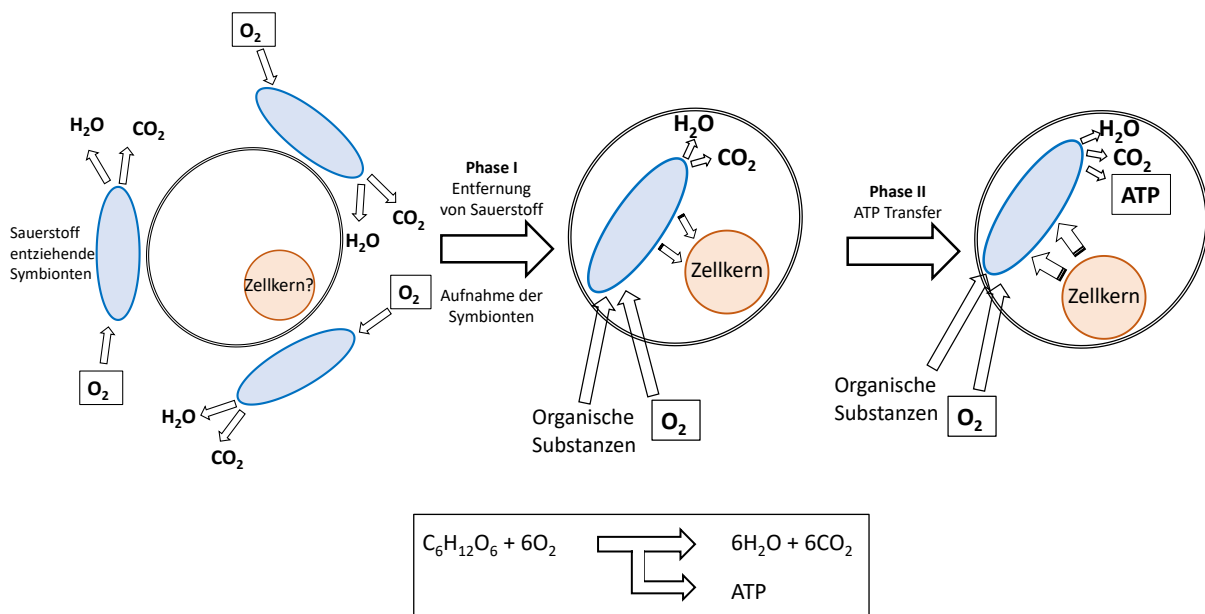
Erste Theorien über die Abstammung der Mitochondrien beschrieben diese als ursprünglich bakteriellen Ursprungs. Demnach wurden fakultativ aerobe Bakterien von frühen anaeroben Eukaryoten aufgenommen und entwickelten sich über die Zeit zu regulären Zellorganellen. Als biochemische Begründung dafür wurden die Bereitstellung von Stoffwechselsubstraten und physischem Schutz im Austausch gegen ATP aus der oxidativen Phosphorylierung genannt [1].

In der Tat konnte durch Untersuchung der Genomsequenzen nachvollzogen werden, dass Mitochondrien von α -Proteobakterien abstammen. Das obligat intrazelluläre Bakterium *Rickettsia prowazekii* wurde durch phylogenetische Analyse als der am engsten mit eukaryotischen Mitochondrien verwandte Organismus identifiziert [2]. Wenngleich somit dieser Aspekt der Endosymbiontentheorie als zutreffend charakterisiert werden konnte, scheint doch die ursprüngliche Begründung der Symbiose nicht haltbar. So wurde gezeigt, dass die – für die Bereitstellung von

ATP durch die Mitochondrien essenzielle – ATP/ADP-Translokase in der nukleären DNA codiert wird. Daher ist es wahrscheinlich anzunehmen, dass der Austausch von ATP erst geraume Zeit nach dem initialen Zeitpunkt der Endosymbiose relevant wurde [1].

1.1.3 Die Ox-Tox-Hypothese als Erklärung für die Endosymbiontentheorie

Das derzeit wahrscheinlichste Modell zur Begründung der Endosymbiose zwischen fakultativ aeroben Proteobakterien und frühen primitiven Eukaryoten stellt die so genannte „Ox-Tox-Hypothese“ [1] dar. Demnach versetzte der vor circa zwei Milliarden Jahren vermutete Anstieg atmosphärischen Sauerstoffes anaerobe Organismen in existenzielle Schwierigkeiten. Eine Möglichkeit, sich den veränderten Umweltbedingungen anzupassen, war demnach die Ausnutzung der Fähigkeiten fakultativ aerober Bakterien, den Sauerstoffgehalt ihrer unmittelbaren Umgebung durch die Verstoffwechslung von Sauerstoff drastisch zu senken. Durch die Aufnahme der Bakterien in die eukaryotische Zelle konnte dieser Prozess nochmals erheblich effizienter ablaufen (Abbildung 1.1). Erst später wurde die ATP-Produktion durch die Koppelung der metabolischen Abläufe von Eukaryot und Bakterium zu einem entscheidenden Element der Symbiose [1].

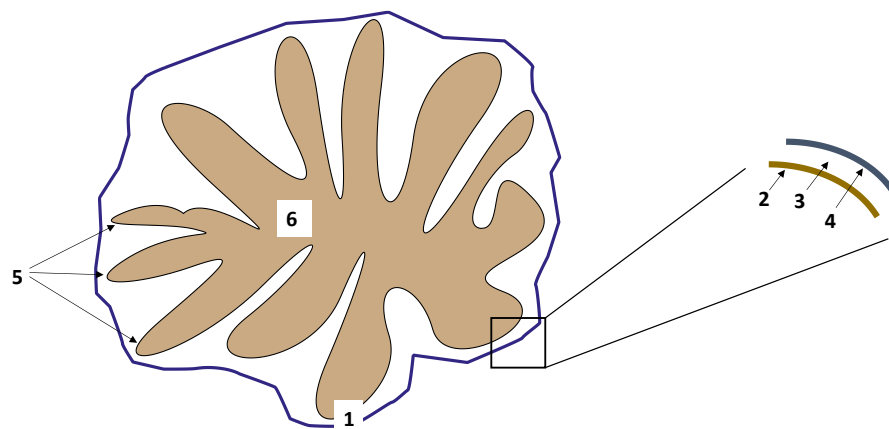


1.1 Die Ox-Tox Hypothese als Begründung für die Endosymbiose zwischen primitiven obligat anaeroben Eukaryoten und fakultativ aeroben Proteobakterien. Anaerobe Organismen nutzen die Fähigkeit fakultativ aerober Prokaryoten zur lokalen Detoxifikation von Sauerstoff. In einem zweiten Schritt erfolgt die Aufnahme der Bakterien in eukaryotische Zellen zur Effizienzsteigerung dieses Deoxygenierungsprozesses. Schließlich gelingt die Koppelung der metabolischen Vorgänge zwischen Pro- und Eukaryoten und damit die O_2 -Nutzung zur ATP-Synthese. Schematische Darstellung, modifiziert nach [1].

1.1.4 Struktur der Mitochondrien

Mitochondrien besitzen eine äußere und eine innere Phospholipidmembran. Daraus ergibt sich die strukturelle Gliederung in vier Kompartimente: die mitochondriale Matrix, die innere mitochondriale Membran, den intermembranösen Spalt und die äußere mitochondriale Membran (Abbildung 1.2). Die innere Membran der Mitochondrien wird durch unzählige Faltungen, so genannte Cristae, erheblich vergrößert [3].

- + 1 Phospholipiddoppelmembran
- + 2 Innere Mitochondrienmembran
- + 3 Intermembranöser Raum
- + 4 Äußere Mitochondrienmembran
- + 5 Cristae
- + 6 Mitochondriale Matrix



1.2 Schematische Darstellung der mitochondrialen Struktur. Mitochondrien sind als einzige eukaryotische Zellorganellen von einer Phospholipiddoppelmembran umgeben. Diese strukturiert Mitochondrien in ein Matrix-Kompartiment und die innere und äußere mitochondriale Membran mit dem dazwischen liegenden intermembranösen Spalt. Durch als Cristae bezeichnete Faltungen wird die Oberfläche der inneren Membran drastisch vergrößert. Schematische Darstellung.

Mitochondrien sind die einzigen Zellorganellen, die eigene genetische Informationen (mtDNA) besitzen. Die knapp 17 kbp der menschlichen mtDNA kodieren für insgesamt 12 Peptide - primär Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe - sowie für zwei rRNAs und 14 tRNAs [4, 5]. Der Großteil der mitochondrialen Proteine wird hingegen nukleär kodiert und nach Proteintranslation in die Mitochondrien transportiert [6].

1.1.5 Vielfältige Helfer: Physiologische Aufgaben der Mitochondrien

Mitochondrien werden auch als zelluläre „Kraftwerke“ der Eukaryoten bezeichnet [7]. Grund hierfür ist die Tatsache, dass Mitochondrien durch die Synthese von ATP im Rahmen des Systems der oxidativen Phosphorylierung für einen Großteil der zellulären Energieproduktion verantwortlich sind [8].

Allerdings konnte im Laufe der letzten Jahrzehnte umfangreiche Evidenz über weitere vielfältige physiologische Aufgaben der Mitochondrien erbracht werden: So spielen sie eine bedeutende Rolle im Rahmen des Kalzium-Stoffwechsels und Kalzium-gesteuerter Signalwege, beteiligen sich fundamental an der Häm- und Steroid-Synthese, übernehmen Funktionen in der Thermoregulation und sind elementare Bestandteile der zellulären Apoptose-Mechanismen [9-13].

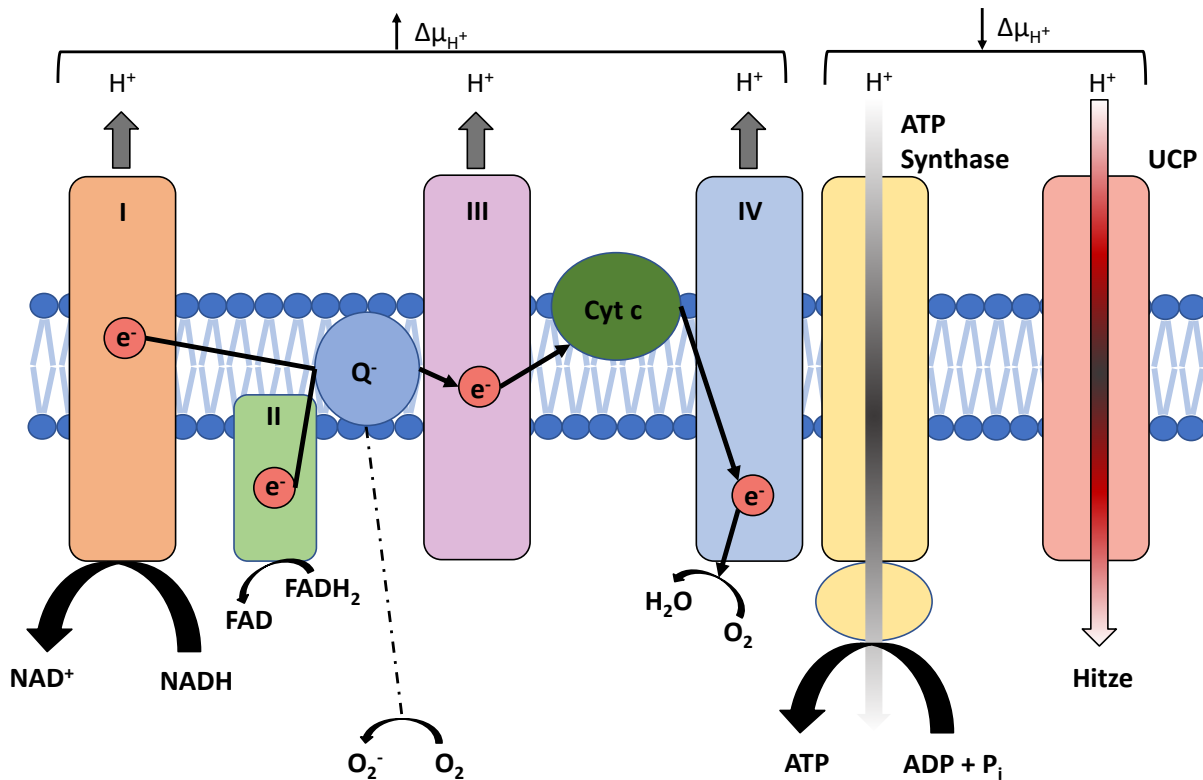
1.1.6 Mitochondriale Energiebereitstellung: Das Prinzip der oxidativen Phosphorylierung

Im Vergleich zur Glykolyse entsteht durch mitochondriale Verstoffwechslung von Glucose im Rahmen der oxidativen Phosphorylierung eine vielfache Menge des Energiespeichers ATP. Dadurch werden Mitochondrien als die effizientesten Energielieferanten für eukaryotisches Leben angesehen [14].

An der inneren Membran der Mitochondrien befinden sich die so genannten Komplexe I - IV der Atmungskette. Diese sind in der Lage, die Elektronendonatoren NADH und FADH_2 zu oxidieren, deren Elektronen über verschiedene Intermediärschritte letztlich auf elementaren Sauerstoff zu übertragen und diesen dadurch zu H_2O zu reduzieren (Abbildung 1.3). Diese Prozesse laufen als exotherme chemische Reaktionen ab. Die dabei freiwerdende Energie wird aber nicht wie im Rahmen der Glykolyse oder des Citratzyklus zur unmittelbaren Phosphorylierung von ADP (und somit Bildung von ATP) genutzt. Vielmehr ermöglicht der Elektronentransfer – wahrscheinlich durch Konformationsänderungen an den beteiligten Komplexen – die Translokalisierung von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum und somit den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über der inneren mitochondrialen Membran [15].

Peter Mitchell stellte 1961 erstmalig die Hypothese auf, dass dieser durch den Elektronentransport ermöglichte Transfer von Protonen einen chemisch-osmotischen Gradienten erzeuge, der wiederum die Phosphorylierung von ADP zu ATP sicherstellen würde: Das Prinzip der „chemisch-osmotischen Koppelung“ [16, 17].

Erreicht wird dies mittels der ATP-Synthase, die den Protonen – im Gegensatz zur impermeablen inneren mitochondrialen Membran – einen Rückfluss zur mitochondrialen Matrix ermöglicht und diesen mit der Synthese von ATP koppelt [15].



1.3 Die Atmungskettenkomplexe und ihre Funktionsweise. Durch Oxidation der Elektronendonatoren NADH und $FADH_2$ und schrittweise Übertragung dieser Elektronen auf Coenzym Q, Cytochrom C und schließlich elementaren Sauerstoff, sind die Atmungskettenkomplexe I-IV in der Lage, Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu translokalisieren und dadurch einen elektrochemischen Gradienten zu generieren. Dieser wird durch die F_0F_1 ATP-Synthase zur Produktion des universellen Energielieferanten ATP ausgenutzt. Schematische Darstellung, modifiziert nach [18].

1.1.7 Das mitochondriale Membranpotential

Durch die Arbeit der Atmungskettenkomplexe entsteht ein Gradient von circa -180 mV über die innere mitochondriale Membran. Neben der chemischen Komponente (eine Änderung des pH-Wertes aufgrund der erhöhten Anzahl an Protonen) ergibt sich durch die positive Ladung der Protonen auch ein elektrisches Potential - das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\psi_m$) [19].

Neben den vorangehend bereits aufgeführten eminent bedeutenden Funktionen dieses Membranpotentials im Rahmen der zellulären Energiebereitstellung, werden mittlerweile weitere physiologische Aufgaben mit $\Delta\psi_m$ in Verbindung gebracht. So scheinen Apoptose-Mechanismen mit dem Membranpotential gekoppelt zu sein: Ein Abfall von $\Delta\psi_m$ führt zur Kondensation der mitochondrialen Matrix und Auffaltung der Cristae, wodurch Cytochrom C freigesetzt und apoptotische Prozesse initiiert werden können [20-23]. Zudem wurde die Hyperpolarisation von $\Delta\psi_m$ entsprechend als Aktivierungssignal von Immunzellen beschrieben und mehrere Arbeitsgruppen konnten eine Verbindung zwischen dem Membranpotential und Signalmechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität aufzeigen [24, 25].

Die Stärke des mitochondrialen Membranpotentials wird dabei durch die relativen Level der oxidierten und reduzierten Nukleotide NADH/NAD, die Anzahl der freien Radikale sowie die verfügbaren Mengen des antioxidativen Glutathions (GSH) im Verhältnis zu seiner oxidierten Form Glutathion-Disulfid (GSSG) beeinflusst [26].

1.1.8 *Reactive Oxygen Species*

Bereits 1954 konnten Commoner et al. die Existenz von freien (Sauerstoff-)Radikalen in biologischem Gewebe nachweisen [27]. *Reactive Oxygen Species* (ROS) entstehen primär an den Komplexen I, II und III der Atmungskette: Bedingt durch (verfrühten) nicht-enzymatischen Transfer eines einzelnen Elektrons auf molekularen Sauerstoff werden Superoxid-Anionen (O_2^-) als Vorläufer der ROS gebildet. Darüber hinaus scheint auch eine mitochondriale Dysfunktion mit der Bildung von Superoxidionen in Verbindung zu stehen; zudem sind auch Enzyme der Glykolyse in der Lage, ROS zu generieren [28]. ROS können durch Oxidation von Proteinen, Lipiden oder auch mitochondrialer DNA (mtDNA) zu erheblichen Schäden führen. Um die negativen Effekte der ROS so gering wie möglich zu halten, existiert in menschlichen Zellen und insbesondere in Mitochondrien ein ausgedehntes antioxidatives Sicherungssystem. So wird vor allem durch die Superoxid-Dismutase (SOD), welche Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid umsetzen kann, die Konzentration an O_2^- möglichst gering gehalten [29]. Durch oxidativen Stress und andere Mediatoren – z.B. NF κ B – wird die Expression der SOD in der mitochondrialen Matrix gesteigert [30]. Daneben sind weitere vielfältige Bausteine an der ROS-Abwehr beteiligt: Glutathionperoxidasen, Katalasen, Ubiquinol, Cytochrom-C (Oxidase) oder auch Vitamin E in der inneren mitochondrialen Membran [31-35].

Schon sehr früh wurden diese Radikale für schädliche Prozesse wie biologische Alterung oder maligne Transformation von Zellen verantwortlich gemacht [36]. In ihrer gedachten Daseinsbeschränkung auf zerstörerische Prozesse (und Krankheiten wie Diabetes Mellitus oder Neurodegeneration) wurden mitochondriale ROS (mROS) zu Beginn daher als „notwendiges Übel des oxidativen Metabolismus [angesehen], [als] (...) Produkt eines imperfekten Systems“ [37].

Erst zu Beginn der 90er Jahre des vergangenen Jahrhunderts wurden erste Berichte darüber veröffentlicht, dass ROS auch bedeutende physiologische Funktionen wahrnehmen: Eine in Homöostase gehaltene Konzentration freier Radikale zeichnet so zum Beispiel verantwortlich für die Steuerung der Aktivitätslevel von Transkriptionsfaktoren wie HIF-1[38], HO-1 [39] oder NF- κ B [40], sowie die Beeinflussung des Gefäßtonus und der Thrombozytenaggregation [41, 42].

Sena et al. schlussfolgerten, dass die Produktion von mROS allgemein durch zellulären Stress – wie Hypoxie, Substratmangel oder Infektionen – ausgelöst wird [37]. Dieses mROS-basierte „Alarmsystem“ ermöglicht der Zelle, auf die veränderte Umwelt zu reagieren, indem diese freien

Radikale entsprechende Signalkaskaden zur metabolischen oder immunologischen Adaptation aktivieren. Mittlerweile ist eine zentrale Bedeutung von ROS im Rahmen der angeborenen Immunität etabliert. Bereits lange bekannt ist eine antimikrobielle Funktion, beispielsweise zur Eliminierung phagozytierter Bakterien [43]. Zunehmend wird auch eine Rolle der freien Radikale im Rahmen der Signalwege der angeborenen antiviralen Immunität diskutiert [44, 45].

1.2 Die angeborene antivirale Immunität

1.2.1 *Firstline of defense*: Grundlagen des angeborenen Immunsystems

Viren sind obligat intrazelluläre Parasiten. Teilweise werden sie als die einfachste aller Lebensformen bezeichnet, andere Autoren wiederum sprechen sich sogar gegen die Zugehörigkeit der Viren zu den Lebewesen aus. Grund hierfür ist ihre Unfähigkeit, eigenständig Stoffwechsel zu betreiben. Viren enthalten lediglich DNA oder RNA als Träger der genomischen Information, verpackt in Proteine oder Lipide. Für sämtliche Transkriptions- und Replikationsvorgänge sind Viren daher auf die zellulären Stoffwechselmechanismen und –enzyme angewiesen. Trotz – oder vielleicht auch aufgrund – dieses simplen und unselbstständigen Prinzips sind Viren für eine Vielzahl an zum Teil schwerwiegenden Infektionskrankheiten beim Menschen verantwortlich. Sie sorgen darüber hinaus regelmäßig für Notstände im Rahmen regional-epidemischer oder auch global-pandemischer Ausbrüche; z.B. die so genannte Spanische Grippe 1918-1920 durch das Influenza A/H1N1 Virus mit über 20 Millionen Todesopfern oder die Ebolavirus-Epidemie in Westafrika 2014 mit über 10.000 Todesfällen [46, 47].

Die menschliche Immunabwehr allgemein – wie auch im Rahmen der Abwehr von Virusinfektionen – wird in zwei Teilbereiche gegliedert: Die angeborene unspezifische Immunabwehr sowie die adaptive Immunität. Das angeborene Immunsystem ist dadurch gekennzeichnet, dass es mit vorgegebenen Mitteln (Zellen und Rezeptoren) eine große Zahl an Gefahren erkennen kann und daraufhin mit kurzer Latenz ein festgelegtes Abwehrprogramm initiiert. Demgegenüber erfordern die Abwehrmechanismen der adaptiven Immunität eine deutliche längere Zeitspanne, bis sie wirkungsvoll eingesetzt werden können. Dies begründet sich in der speziell auf den jeweiligen Angreifer gerichteten, erst nach klonaler Selektion und Proliferation spezifischer B- oder T-Zellen funktionell effektiven spezifischen Abwehr; sowohl humoral durch Antikörper als auch zellulär, beispielsweise durch zytotoxische T-Zellen. Die angeborene Immunität wird hingegen gerne auch als *first line of defense* betrachtet, da sie bereits nach kurzer Zeit eine universelle Immunantwort bereitstellen kann [48]. Darüber hinaus ist das angeborene Immunsystem allerdings auch für die Initiierung und spätere Anpassung der adaptiven Immunantwort verantwortlich [49].

Grundlage der angeborenen antiviralen Immunität ist die Erkennung von konservierten Strukturen, die für die Zellen des menschlichen Organismus als gefährlich betrachtet werden: So genannte *pathogen associated molecular patterns (PAMP)*. Diese werden von entsprechenden *pattern recognition receptors (PRR)* erkannt und initiieren eine Signalkaskade, die ein Genprogramm in der Zelle aktiviert, welches es Viren erschwert, in der infizierten Zelle zu überleben [50].

Bisher sind bereits eine Vielzahl an Rezeptoren gefunden worden, die im Rahmen der angeborenen Immunität für die Erkennung von PAMPs sorgen: *Toll-like* Rezeptoren (TLR), *C-type lectin* Rezeptoren, *NOD-like* Rezeptoren oder zytosolische DNA Rezeptoren [51-53]. Neben membran-gebundener TLRs, die eine Vielzahl mikrobieller Strukturen erkennen (TLR7 detektiert beispielsweise einzelsträngige RNA) [54], zeichnet für die Erkennung von Viren insbesondere eine Gruppe von zytoplasmatischen PRRs verantwortlich: Die *RIG-I-like* Rezeptoren [55]. Diese Rezeptorenfamilie umfasst drei Mitglieder: *retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)*, *melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)* und *laboratory of genetics and physiology 2 (LGP2)* [56-58].

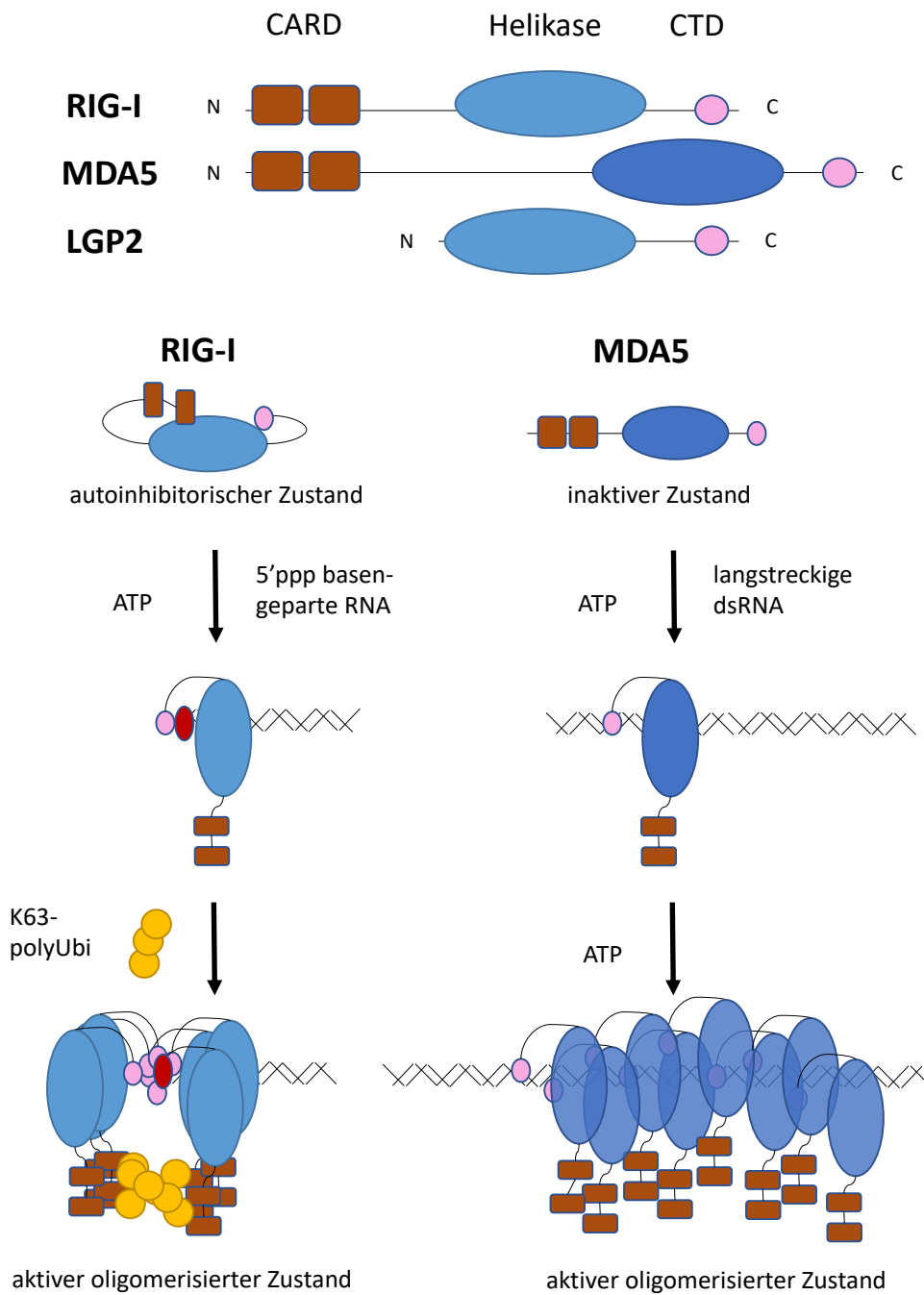
1.2.2 Die *Rig-I-like* Rezeptoren

RNA-Partikel von RNA- (teilweise auch DNA-) Viren werden von den *Rig-I-like* Rezeptoren (RLR) RIG-I und MDA5 als PAMP erkannt; sie reagieren darauf mit der Aktivierung spezifischer Signalwege, die letztlich zur Produktion von Typ I Interferonen (IFN) und pro-inflammatorischer Zytokine führen, sowie nachfolgend zur Transkriptionsaktivierung Interferon-stimulierter Gene (ISG) [50]. In diesen Charakteristika sind die RLR allerdings vergleichbar mit dem TLR3-Rezeptor. Im Gegensatz zu diesem erkennen RLR allerdings nicht über Endozytose-vermittelte Mechanismen internalisierte originär extrazelluläre Nukleinsäuren, sondern vielmehr durch virale Transkription entstandene intrazelluläre RNA; sie sind somit in der Lage aktive Virusinfektionen zu detektieren [59]. Neuere Erkenntnisse deuten zudem darauf hin, dass RLR auch im Rahmen der Erkennung und Abwehr von Bakterien eine Rolle spielen könnten [60, 61]. Eine Übersichtsdarstellung der RLR bietet Abbildung 1.4.

In der Abwesenheit geeigneter PAMP liegen RIG-I und MDA5 in einem durch Autoinhibition gekennzeichneten Inaktivitätszustand vor. Dieser ist bedingt durch Interaktionen zwischen dem PAMP-bindenden Helikase-Element und den signalgebenden n-terminalen *caspase activation and recruitment (CARD)*-Elementen. Durch das Binden viraler RNA durchlaufen die RLR Konformationsänderungen, die den Auslöser für die folgende antivirale Signalkaskade darstellen. Durch TRIM25-vermittelte Ubiquitinierungsprozesse und Freilegung sowie Oligomerisierung der CARD-Domänen wird die Interaktion mit dem Adapterprotein MAVS (vgl. 1.2.5) ermöglicht. Dadurch können die Rezeptoren indirekt die Kinasen TBK1 und IKK- ϵ sowie IKK α und IKK β

aktivieren. Diese wiederum sorgen über Phosphorylierungsmechanismen für die Freisetzung der Transkriptionsfaktoren IRF3/7 beziehungsweise NF κ B, wodurch schließlich die Transkription von Typ I Interferonen und pro-inflammatorischen Zytokinen erfolgen kann [50, 59, 62, 63].

Obgleich Sequenzanalysen einen hohen Übereinstimmungsgrad zwischen LGP2 und den anderen beiden RLR gezeigt haben [62], bleibt seine Rolle im Rahmen der antiviralen Immunität unklar. Wie die anderen Mitglieder der RLR-Familie exprimiert LGP2 eine regulatorische Domäne am C-Terminus und eine zentrale Helikase-Einheit. Allerdings fehlen vollständig die n-terminalen CARD-Elemente [64]; da diese unabdingbar für den nachfolgenden Signalweg zu sein scheinen, wird eine Aktivierung der nachgeschalteten Kaskade durch LGP2 als unwahrscheinlich angesehen [65, 66]. In weiteren Studien sind je nach experimentellem Layout sowohl positiv als auch negativ regulatorische Effekte von LGP2 auf die RLR-Signalkaskade beschrieben worden [58, 67-69]. Mit neueren Ergebnissen schlagen Bruns et al. ein Modell vor, wonach LGP2 in enger Kooperation mit MDA5 dessen weiteren Signalweg moduliert: So soll zu Beginn einer Infektion bei niedriger zellulärer Konzentration von LGP2 dieses durch seine hohe RNA-Bindungsaffinität eine beschleunigende Wirkung und damit Verstärkerfunktion auf den MDA5-Signalweg ausüben. Infolge der ansteigenden IFN-Konzentration kommt es dann auch zu einem Expressionsanstieg des durch IFN stimulierbaren LGP2. Höhere LGP2-Konzentrationen führen in Folge dessen schließlich im Sinne einer negativen Rückkoppelung zur Suppression der antiviralen Kaskade [68, 70].



1.4 Übersichtsdarstellung der Rig-I-like Rezeptoren Die RLR RIG-I, MDA5 und LGP2 zeigen einen modularen Aufbau mit vielen Gemeinsamkeiten. Neben der zentralen Helikase-Einheit haben alle RLR eine gemeinsame c-terminale Domäne (CTD). Lediglich RIG-I und MDA5 allerdings exprimieren die für die antivirale Signalkaskade benötigte n-terminale CARD-Einheit. Die ATP-abhängige Aktivierung von RIG-I und MDA5 wird durch verschiedene PAMPs ausgelöst: 5'ppp basen-geparte RNA für RIG-I und langstreckige Doppelstrang-RNA im Falle von MDA5. Durch Polyubiquitinierung und Oligomerisation werden die Rezeptoren schließlich in einen signalaktiven Zustand gebracht und können damit den antiviralen Signalweg initiieren. Schematische Darstellung nach [64].

1.2.3 Typ I Interferone

Interferone sind eine multigenetische Familie zellulärer Proteine, die bei ihrer Erstentdeckung als mit Virusvermehrung „interferierend“ aufgefallen sind. Sie wirken antiviral, aber auch anti-proliferativ und somit antineoplastisch und werden klinisch darüber hinaus aufgrund ihrer immunmodulatorischen Wirkungen eingesetzt. Entsprechend ihrer zellulären Herkunft und Signalwege werden drei verschiedene Klassen von Interferonen unterschieden. Im Rahmen der antiviralen Immunität sind primär die Typ I Interferone elementare Zytokine insbesondere der angeborenen Immunität. Zu diesem Typ I Interferonen gehören die IFN α -Familie, IFN β , sowie die IFN ω , - ϵ , - κ und - δ . Insbesondere IFN α und IFN β sind in den verschiedensten Zellpopulationen exprimiert. Alle Typ I Interferone initiieren ihre Effektorkaskade nach Aktivierung des heterodimeren IFNAR-Rezeptors. Dadurch aktivieren sie Transkriptionsfaktoren, welche wiederum die Expression so genannter *IFN-stimulated genes* (ISG) initiieren, die den antiviralen Effekt der Typ I Interferone vermitteln. [63, 71-73]

Ein wichtiger Aspekt bei Betrachtung der Typ I Interferone ist ihr positiver Verstärkermechanismus: Sie sind in der Lage, die Expression der RLR erheblich zu steigern. Da diese RLR selbst durch ihre Aktivierung die Transkription von Typ I Interferonen initiieren, entsteht ein sich verstärkender Rückkopplungsmechanismus [62, 74]. Typ I Interferone sind die wahrscheinlich zentralsten zellulären antiviralen Effektoren. Sie sind in der Lage, das Wachstum Virus-infizierter Zellen zu stoppen und gleichzeitig die Erkennung entsprechender Zellen durch das adaptive Immunsystem über eine Hochregulation der MHC-Rezeptoren zu verbessern [75]. Durch Aktivierung der Transkription zahlreicher Gene, die für die Suppression zellulären Wachstums, Apoptose-Induktion und die Verstärkung der angeborenen wie der adaptiven Immunität verantwortlich sind, versetzen Typ I Interferone Zellen in einen antiviralen Verteidigungsmodus [76].

1.2.4 Pro-inflammatorische Zytokine

Die pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin-1 und *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) werden als elementare Mediatoren von Entzündungsreaktionen angesehen. Nachdem TNF α ursprünglich gemäß seines Namens als ein Nekrosen bei Tumoren verursachendes Protein beschrieben wurde, konnte später seine entscheidende Rolle bei inflammatorischen Prozessen und in der Folge bei zahlreichen Entzündungs-assoziierten Erkrankungen nachgewiesen werden [77-79].

Nach transkriptioneller Aktivierung – insbesondere durch NF- κ B – bindet TNF α an die sowohl membrangebundenen als auch löslichen Rezeptoren TNFR1/2. Die durch diese Rezeptoren ausgelöste Signalkaskade resultiert in der Expression zahlreicher Transkriptionsfaktoren mit weitreichenden Auswirkungen auf Zellproliferation, -differenzierung oder auch Apoptose [80, 81].

Neben einer entscheidenden antibakteriellen Funktion – insbesondere gegenüber intrazellulärer Erreger wie *Mycobacterium tuberculosis* – spielt TNF α auch eine wichtige Rolle bei der Abwehr viraler Infektionen, entweder direkt oder auch indirekt über supportive Effekte der Inflammation auf die antivirale Immunität [80, 82, 83].

1.2.5 Die Funktion von MAVS

Das *mitochondrial antiviral signaling* Protein MAVS (auch als Cardif, IPS-1 oder VISA bezeichnet [84-86]) wurde 2005 von Seth et al. als unabdingbares mitochondriales Adapterprotein im Rahmen des RLR-Signalweges beschrieben. In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass MAVS zudem auch auf Peroxisomen und Mitochondrien-assoziierten Membranen (MAMs) exprimiert wird [87, 88].

Es enthält ein C-terminales Transmembran-Element zur Verankerung in der äußeren mitochondrialen Membran, sowie eine N-terminale *caspase activation and recruitment* (CARD-) Domäne zur Interaktion mit den RLR sowie zur Aktivierung der subsequenten antiviralen Signalkaskade [89]. Darüber hinaus existiert im zentralen Abschnitt des Moleküls noch eine *prolin-rich region*. Diese bietet funktionell zwei *tumor necrosis factor receptor-associated factor* (TRAF) *binding motifs*, wodurch die Bindung und Interaktion mit TRAF3 und TRAF6 ermöglicht wird [90, 91].

Wenngleich es ein bedeutendes mitochondriales Protein darstellt, wird MAVS (wie der überwiegende Großteil aller mitochondrialen Proteine) nukleär codiert und zeigt eine über verschiedene Spezies reichende hochgradig konservierte Struktur [92].

Wie bereits in 1.2.2 kurz dargestellt, ist MAVS ein entscheidender Adapter im Rahmen der angeborenen antiviralen RLR- Signalkaskade. Die CARD-Domänen der RLR interagieren nach Virus-getriggelter Aktivierung und Oligomerisierung mit den CARD-Domänen von MAVS und initiieren dadurch die nachfolgenden Signalwege.

Dabei liegt MAVS nicht als singuläres Protein vor. Vielmehr wird von mehreren Arbeitsgruppen das Konzept eines MAVS „Signalosom“ postuliert. Dabei führt die RLR-bedingte Aktivierung von MAVS zu dessen Polymerisierung – ein kritischer Zwischenschritt für den nachfolgenden antiviralen Signalweg [93]. Infolge dessen werden weitere (Adapter-)Proteine – neben den oben bereits erwähnten TRAF-Proteinen auch TRAF *family member-associated NF- κ B activator* (TANK) oder *TNFR1-associated death domain protein* (TRADD) – mit dem MAVS-Multimer zu einem Superkomplex zusammengefügt [94, 95]. Dieser wiederum ist dann in der Lage, die Transkriptionsfaktoren IRF3/7 und NF κ B zu aktivieren, welche nach nukleärer Translokation die Expression von Typ I Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen initiieren (vgl. 1.2.2).

Hou et al. konnten darlegen, dass MAVS-Proteine nach Virusinfektion – wahrscheinlich über ihre CARD-Domänen – zu Prionen-ähnlichen Aggregaten zusammengefügt werden, welche nicht nur in hohem Maße zur Aktivierung von IRF3/7 im Stande sind, sondern auch mit erheblicher Effizienz bisher naives endogenes MAVS in entsprechende neue Aggregate konvertieren können. Dies wird als Mechanismus angesehen, mit dem selbst durch geringste Mengen Virus und/oder Rezeptor eine „ultrasensitive und robuste antivirale Antwort“ ausgelöst werden kann [96].

Auch morphologische Alterationen der Mitochondrien werden für Verstärkung oder Abschwächung des MAVS-vermittelten antiviralen Signalweges verantwortlich gemacht. Mitochondrien sind als dynamische Zellorganellen – intrazellulär auch als Netzwerk – beschrieben, die andauernd morphologischen Veränderungen (Fusion und Fission) unterliegen. Diese Prozesse scheinen zum Beispiel für Replikations- und Apoptosevorgänge unabdingbar zu sein [97-99].

Castanier et al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von MAVS zu einer Vergrößerung des mitochondrialen Netzwerkes führt; dementsprechend bedingt eine Unterbrechung des Netzwerkes einen abgeschwächten antiviralen Signalweg [100]. Auch die im Rahmen dieser Netzwerk-Dynamik entscheidenden Proteine Mitofusin 1 und 2 (Mfn1 und Mfn2) konnten gemäß ihrer antiviralen Wirkung charakterisiert werden: Mfn1 als positiver, Mfn2 hingegen als negativer Regulator des RLR-initiierten MAVS-Signalweges [101, 102]. Dadurch wurde erstmals auch die funktionelle Relevanz der Dynamik der Mitochondrien im Rahmen der angeborenen antiviralen Immunität dargestellt.

1.3 Fragestellung

Bei seiner Erstbeschreibung wurde der *CR6-interacting factor 1* (CRIF1) von Chung et al. als ausschließlich nukleär lokalisiertes Protein beschrieben, das über Interaktionen mit Proteinen der *growth arrest and DNA damage inducible 45* (Gadd45) Familie an der Regulation von Zellzyklus und -wachstum beteiligt sein soll [103]. Weitere Arbeiten stützten sich auf die Annahme der nukleären Lokalisation und erbrachten Indizien für eine Regulation der zellulären Proliferation durch CRIF1 und beschrieben CRIF1 als Ko-Regulator des Kernrezeptors Nur77, als Ko-Repressor des Androgenrezeptors oder als transkriptioneller Ko-Aktivator von STAT3 und Elf3 [104-110].

Die Suche nach Interaktionspartnern von RIG-I in unserer Arbeitsgruppe hatte in einem Experiment - das Proteine, die mit RIG-I co-immunopräzipitieren, massenspektrometrisch analysierte - CRIF1 als potentiellen Interaktionspartner von RIG-I identifiziert. Die daraufhin von Stefanie Lietke in ihrer Promotionsarbeit durchgeführten Analysen konnten zeigen, dass es keine direkte Interaktion von RIG-I und CRIF1 gibt, CRIF1 - bedingt durch eine n-terminale *Mitochondrial Targeting Sequence* (MTS) - jedoch mitochondrial lokalisiert ist und die früher beschriebene nukleäre Lokalisation von CRIF1 wahrscheinlich als Überexpressionsartefakt zu werten ist. Frau Lietke beobachtete zudem, dass die Herunterregulierung von CRIF1 mittels siRNA dazu führt, dass in den Zellen mit vermindertem CRIF1 RNA-Viren besser replizieren und die Infektion zu einer verminderten Produktion von Interferon-induzierten Zytokinen führt. Kim et al. bestätigten in ihrer Arbeit die mitochondriale Lokalisation von CRIF1 und schrieben CRIF1 eine funktionelle Rolle zu in der Translation mitochondrial-kodierter und für die oxidative Phosphorylierung relevanter Proteine [111].

Für die *loss of function* Experimente von Frau Lietke wurden primär siRNA-basierte Methoden verwendet. Da die Applikation von siRNA-Molekülen in der Untersuchung von RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptoren etwas problematisch und fehleranfällig ist, sollte ihre Beobachtung, die CRIF1 eine Rolle in der antiviralen Immunität zuschreibt, mit einer weiteren - immunologisch weniger Einfluss nehmenden - Methode validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, mit Hilfe eines immunologisch möglichst inertem Systems CRIF1 *knock-out* Zellen zu generieren und mit deren Hilfe die Rolle von CRIF1 und des mitochondrialen Metabolismus für die antivirale Immunität zu untersuchen. Im Speziellen sollen folgende Fragestellungen geklärt werden:

a) Kann durch Verwendung von flx/flx CRIF1 Maus-Embryofibroblasten (MEF) ein stabil-reproduzierbares, konditionales *knock-out*-System für CRIF1 etabliert werden?

- b) Welchen Einfluss hat der *knock-out* von CRIF1 auf die Effektoren der angeborenen antiviralen Immunität, insbesondere auf die Produktion von Typ I Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen?
- c) Werden Virusinfektionen und die darauffolgenden zellulären Reaktionen durch das Fehlen von CRIF1 relevant beeinflusst?
- d) Können Aussagen über die metabolischen Effekte von CRIF1 getroffen werden und stehen diese in Zusammenhang mit etwaigen Beobachtungen im Rahmen der antiviralen Immunität?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Ausstattung

Gerätename	Hersteller
2011 <i>Macrovue</i> Transilluminator	Fa. LKB Bromma (Sollentuna, S)
<i>Alpha Imager</i> HP	Fa. Alpha Innotech (San Leandro, CA, USA)
Bakterienbrutschrank	Fa. Heraeus (Hanau, D)
Begasungsbrutschrank BBD 6220	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Dampfsterilisator Varioklav	Fa. HP Medizintechnik (Oberschleißheim, D)
Durchflusszytometer FACS Calibur	Fa. BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Durchflusszytometer FACS Canto II	Fa. BD Biosciences (San Jose, CA, USA)
Eismaschine	Fa. Manitowoc (Manitowoc, WI, USA)
Elektrophorese <i>Power Supply Model 200</i>	Fa. Biorad (München, D)
Ethidiumbromid Gelkammern	Fa. Biorad (München, D)
Feinwaage SBC21	Fa. ScalTec (Bohemia, NY, USA)
Fluo-link	Fa. Vilber Lourmat (Marne-la-Vallée, F)
Grobwaage	Fa. Waagendienst Winkler (München, D)
Incubator <i>Shaker Innova 44</i>	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
<i>Lamin Air Flow</i> HB 2472 S	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
<i>Lamin Air Flow</i> HeraSafe KS	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
LAS 4000 mini	Fa. Fujifilm (Tokyo, J)
<i>Lightcycler</i> 480 II	Fa. Hoffmann-La Roche (Basel, CH)
Mikroskop Axiovert 25	Fa. Zeiss (Jena, D)
Mikroskop Axiovert 40c	Fa. Zeiss (Jena, D)
<i>Multiplate Reader</i> Mithras LB 940	Fa. Berthold Technologies (Bad Wildbach, D)
<i>PerfectBlue Dual Gel System</i>	Fa. PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
Spannungsgerät <i>Power Pac</i> 300	Fa. Biorad (München, D)
Spectrophotometer <i>NanoDrop</i> 2000c	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
T3 <i>Thermocycler</i>	Fa. Biometra (Göttingen, D)

Thermomixer comfort	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
<i>Thermoshake</i> (Laboshake)	Fa. Gerhardt (Königswinter, D)
Tischrüttler Vibrax VXR	Fa. IKA (Staufen, D)
Vortexer MS3 <i>basic</i>	Fa. IKA (Staufen, D)
Vortexer Vortex Genie 2	Fa. Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waage LP 6209	Fa. Sartorius (Göttingen, D)
XF 96 <i>Analyzer</i>	Fa. Seahorse (North Billerica, MA, USA)
Zentrifuge (<i>centrifuge</i> 5415 R)	Fa. Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge Multifuge 4KR	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge Multifuge 3L-R	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Zentrifuge Rotina 420 R	Fa. Hettich Lab Technology (Tuttlingen, D)

2.1.2 Chemikalien für biochemische Methoden

Materialien für den Western Blot

Reagenz	Hersteller
Ammoniumpersulfat (APS)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Blotting-Membran	Fa. Schleicher & Schuell (Düsseldorf, D)
Bromphenolblau	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure (EDTA)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Glycin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Immobilon-P Transfer Membran	Fa. Merck Millipore (Billerica, MA, USA)
Isopropanol (70 Vol%)	Apotheke der Uniklinik (München, D)
Methanol	Fa. Merck (Darmstadt, D)
Milchpulver	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Natriumchlorid	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Proteinmarker (nach Molekulargewicht)	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, D)
Rotiphoresis Gel 30	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
<i>SuperSignal West Pico Chemiluminescent</i>	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Tetramethylethylendiamine (TEMED)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Tris hydroxymethylaminomethan (TRIS)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
TRIS-HCL	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
β -Mercaptoethanol	Fa. Biorad (München, D)

Materialien für den ELISA

Reagenz	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Substratreagenzien	Fa. BD Biosciences (San Diego, CA, USA)
Tween 20	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)

Materialien für den Seahorse *Extracellular Flux Analyzer*

Reagenz	Hersteller
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)-Phenylhydrazon (FCCP)	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Oligomycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Rotenon	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
XF Assay Medium	Fa. Seahorse (North Billerica, MA, USA)
XF Calibrant	Fa. Seahorse (North Billerica, MA, USA)

2.1.3 Chemikalien für zellbiologische Methoden

Material für die Zellkultur

Reagenz	Hersteller
<i>Aqua ad injectabilia</i>	Fa. Braun (Melsungen, DE)
Doxycyclin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. GibcoBRL (Paisley, GB)
L-Glutamin	Fa. PAA (Linz, A)
OptiMEM	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Penicillin	Fa. PAA (Linz, A)
<i>Phosphate-buffered saline (PBS)</i>	Fa. PAA (Linz, A)
Streptomycin	Fa. PAA (Linz, A)
Trypanblau	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Trypsin	Fa. PAA (Linz, A)
Puromycin	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)
G418	Fa. Invivogen (San Diego, CA, USA)

Material für die Durchflusszytometrie

Reagenz	Hersteller
JC-1	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Material für Transfektionen

Reagenz	Hersteller
<i>GeneJuice Transfection Reagent</i>	Fa. EMD chemicals (San Diego, CA, USA)
Lipofectamine RNAiMax	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
poly I:C	Fa. GE Healthcare (Little Chalfont, E)
Tat-NLS-Cre	Fa. Excellgen (Rockville, MD, USA)

2.1.4 Chemikalien für molekularbiologische Methoden
Material für die Agarose-Gel-Elektrophorese

Reagenz	Hersteller
6x DNA <i>Loading Dye</i>	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Agarose	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
Ethidiumbromid	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>O'GeneRuler DNA-Ladder Mix</i>	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Tris-Acetat	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

Material für die Plasmidkonstruktion

Reagenz	Hersteller
Ampicillin	Fa. Roth (Karlsruhe, D)
Antimycin A	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
<i>Calf intestine alkaline phosphatase, CIAP</i>	Fa. Fermentas (St. Leon-Roth, DE)
DH5 α Bakterien	Fa. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EcoRI Restriktionsenzym	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
EcoRI-Puffer	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Kanamycin	Fa. Sigma-Aldrich (Steinheim, D)
LB Agar	Fa. Roth (Karlsruhe, D)

NotI Restriktionsenzym	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
O-Puffer für Restriktionsenzyme	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Pfu DNA Polymerase 2,5u/μl	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Phusion <i>High-Fidelity</i> Polymerase	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
Sall Restriktionsenzym	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
T4 DNA Ligase	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
XhoI Restriktionsenzym	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

Material für die Reverse Transkription und quantitative *real-time* PCR

Reagenz	Hersteller
dNTP Set	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
KAPA PROBE <i>Fast Universal</i>	Fa. PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
oligo-dT (dT) ₁₈	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
<i>RevertAid</i> H Minus RT 200u/μl	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
RiboLock RNase Inhibitor 40u/μl	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)

2.1.5 Reagenziensätze

Reagenziensatz	Hersteller
Ab133127 – LDL <i>Uptake Assay Kit</i>	Fa. Abcam (Cambridge, UK)
Bradford <i>Protein Assay</i>	Fa. Biorad (München, D)
<i>CellTiter-Blue Cell Viability Assay</i>	Fa. Promega (Madison, WI, USA)
<i>DuoSet Mouse</i> IP10 Elisa	Fa. R&D Systems (Minneapolis, MN, USA)
<i>Extracellular flux analyzer Kit</i>	Fa. Seahorse (North Billerica, MA, USA)
<i>GeneJet Plasmid Miniprep Kit</i>	Fa. Thermo Fisher (Waltham, MA, USA)
<i>GF-1 Nucleic Acid Extraction Kit</i>	Fa. Vivantis (Subang Jaya, Malaysia)
<i>JETQuick PCR Purification Kit</i>	Fa. Genomed (Löhne, D)
<i>peqGOLD Total RNA Kit</i>	Fa. PEQLAB Biotechnologie (Erlangen, D)
Plasmid Maxi Kit	Fa. Quiagen (Hilden, D)
XF 96 <i>cell culture microplates</i> V3-PET	Fa. Seahorse (North Billerica, MA, USA)

2.1.6 Materialien für die Zellkultur

Die für die Zellkultur erforderlichen Plastikmaterialien wurden von den Firmen Corning (Corning, NY, USA), Eppendorf (Hamburg, D), Falcon (Heidelberg, D) und Greiner (Frickenhausen, D) bezogen.

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Herkunft
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, Virginia, USA)
MEF wt	Murine embryonale Fibroblasten	Young-Yun Kong, Department of Biological Sciences, Seoul National University (Seoul, KOR)
MEF flx/flx CRIF1	Murine embryonale Fibroblasten, CRIF1 flankiert von zwei LoxP-Elementen	Young-Yun Kong, Department of Biological Sciences, Seoul National University (Seoul, KOR)
L929	Murine Fibroblastenzelllinie	Fa. Sigma Aldrich (Steinheim, D)

2.1.8 Zellkulturmedien

<u>DMEM-Vollmedium</u>	<u>High-FCS-Medium</u>	<u>DMEM-Selektionsmedium</u>
100 IU/ ml Penicillin	100 IU/ ml Penicillin	100 IU/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin	100 µg/ ml Streptomycin	100 µg/ ml Streptomycin
1,5 mM L-Glutamin	1,5 mM L-Glutamin	1,5 mM L-Glutamin
10 Vol% FCS	30 Vol% FCS	10 Vol% FCS
4,5 g/ l Glucose	4,5 g/ l Glucose	4,5 g/ l Glucose
in DMEM-Medium	in DMEM-Medium	4 µg/ ml Puromycin
		1 mg/ ml G418
		in DMEM-Medium
<u>Seahorse Präparationsmedium</u>	<u>Seahorse Analysemedium</u>	
100 IU/ ml Penicillin	1 mM Pyruvat	
100 µg/ ml Streptomycin	1 mM Glucose	
10 Vol% FCS	in XF Assay Medium	
1 mM Glucose		
in DMEM-Medium		

2.1.9 Lösungen für molekularbiologische und biochemische Methoden

<u>Laemmli-Puffer (5-fach)</u>	<u>Stacking Gel 5%:</u>	<u>Resolving Gel 10%</u>
250 mM Tris-HCl (pH 6,8)	2,26 ml H ₂ O	4,1 ml H ₂ O
40 Vol% Glycerol	0,69 ml Polyacrylamid (30 %)	3,3 ml Polyacrylamid (30%)
5 % (w/v) SDS	1,00 ml 0,5 M Tris (pH 6,8)	2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8)
10 Vol% Mercaptoethanol	0,04 ml APS	0,1 ml APS
0,05 % (w/v) Bromphenolblau	0,004 ml TEMED	0,004 ml TEMED
in Aqua dest.		
<u>TAE-Puffer</u>	<u>Transferpuffer</u>	<u>Laufpuffer</u>
2,0 mol/ l TRIS	192 mM Glycin	192 mM Glycin
1,0 mol/ l Essigsäure (100%)	25 mM Tris-Base	25 mM Tris-Base
0,05 mol/ l EDTA-2Na-2H ₂ O	10 Vol% Methanol	0,1 Vol% SDS
in Aqua dest.	in Aqua dest.	in Aqua dest.
<u>TBS-Tween</u>		
50 mM Tris, pH 7,5		
150 mM Natriumchlorid		
0,1 % Tween 20		

2.1.10 Viren

Das mutierte *Vesicular Stomatitis Virus* VSV M51R (GFP exprimierend) wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Oliver Ebert (Technische Universität München, D) zur Verfügung gestellt. Hierbei wird eine Mutation des viralen M-Proteins durch einen Basentausch an Position 51 der Aminosäuresequenz verursacht (Methionin wird ersetzt durch Arginin) [112]. Dadurch ist das VSV M-Protein nicht länger in der Lage, die Genexpression und antivirale Immunantwort der infizierten Zelle zu supprimieren.

2.1.11 siRNA

Name	Zielstruktur	Sequenz
siCO4	Keine	GCGCUAUCCAGCUUACGUA
siCRIF1	Murines CRIF1	GCAGAGUGCAUGGCCAAGA
siRad23A 106	Murines Rad23A	CCUGGUAAUUGGCUAAUUA
siRad23A 107	Murines Rad23A	GGCAAGUGAUUCAACAGA
siRad23B	Murines Rad23B	GGGCUCAUAUCCACAAUUA

2.1.12 Plasmide

Name	Vektor	Insert	Tag	Resistenz
MSCV-Cre	MSCV-EGFP	Cre	EGFP (C-terminal)	Ampicillin
pLVX- <i>Tight</i> -Puro	lentiviral	-		Ampicillin Puromycin
pLVX- <i>Tight</i> -Puro- Cre	lentiviral	Cre		Ampicillin Puromycin
pLVX-Tet-On <i>Advanced</i>	lentiviral	-		Ampicillin Neomycin
P5-CRIF1-mCherry	pcDNA5-FRT/TO- FA-mCherry	huCRIF1	mCherry (C-terminal)	Hygromycin
P5-mCherry	pcDNA5-FRT/TO- FA-mCherry	-	mCherry (C-terminal)	Hygromycin

2.1.13 Primer

DNA Primer

Name	Sequenz
pLVX_Tight_Puro <i>sequencing</i>	CTCCCTATCAGTGATAGAGAACG
pLVX_Tight_Puro <i>sequencing_2</i>	GCAGAGATCCAGT
Cre for pLVX rev	GAATTAGAATTCCCTAATCGCCATCTTCCAGC
Cre for pLVX for	GAATTAGCGGCCGCATGCCCAAGAAGAAGAGG
FloxP for	ATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTAT
FloxP rev	ATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTAT
Rad23/FloxP	ACCCCCACCGAGCTGTGGAGTACTTGCT
Crif-1/FloxP	GGACCCAAGGAGTGCTCGCTTCCAGGAACTA
Crif-1/FloxP_v2	GAGCTTAGCGACCATGCAAGAGTCGCTGC
LoxP_universell	ATAACTTCGTATA
Crif 3' UTR	CATATATATATTCATGTTTAAGAGGAAG
Crif 5' UTR	GAGAGAGAAAGGGGAATGGATG
rtTA <i>forward</i>	GCTAAATTCTGGCCGTTTTTG
rtTA <i>reverse</i>	CATATAGACAAACGCACACC
Cre for	GCATTACCGGTCGATGCAACGAGTGATGAG
Cre rev	GAGTGAACGAACCTGGTCGAAATCAGTGCG

qPCR Primer

Name	Sequenz	Zielstruktur	Sonden-Nr.
HPRT <i>left</i>	GGAGCGGTAGCACCTCCT	HPRT (Maus)	69
HPRT <i>right</i>	CTGGTTCATCATCGCTAATCAC		
IFN β 1 <i>left</i>	CTGGCTTCCATCATGAACAA	IFN β (Maus)	18
IFN β 1 <i>right</i>	AGAGGGCTGTGGTGGAGAA		
IP10 <i>left</i>	GCTGCCGTCATTTTCTGC	IP-10 (Maus)	3
IP10 <i>right</i>	TCTCACTGGCCCGTCATC		
CRIF1 <i>left</i>	GCTTAGCGACCATGCAAGA	CRIF1 (Maus)	32
CRIF1 <i>right</i>	GCCATGCACTCTGCGATA		
TNF α <i>left</i>	TCTTCTCATTCTGCTTGTGG	TNF α (Maus)	49
TNF α <i>right</i>	GGTCTGGGCCATAGAAGTGA		
mRAD23a <i>left</i>	GCAGCTGGGTCAGGAAAAC	Rad23a (Maus)	17
mRAD23a <i>right</i>	CTGGATGAACTGCTCCTGGT		

2.1.14 Antikörper

Name	Hersteller
<i>Anti-rabbit IgG, HRP-linked</i>	Fa. Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
<i>Crif1 antibody M-222</i>	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
<i>Ms mAb- anti-β-Actin, HRP-linked</i>	Fa. Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
<i>anti-mouse IFNAR-1</i>	Fa. BioLegend (San Diego, CA, USA)

2.1.15 Software

Programm	Entwickler
Adobe CS <i>Suite</i> 5.1	Fa. Adobe Systems (San Jose, CA, USA)
Endnote X8	Fa. Clarivate Analytics (Philadelphia, PA, USA)
FlowJo <i>Tree Star</i>	Fa. FlowJo (Ashland, OR, USA)
<i>GraphPad Prism</i> 5	Fa. GraphPad Software (La Jolla, CA, USA)
Microsoft Office 365	Fa. Microsoft (Redmond, WY, USA)
<i>Image J</i>	Wayne Rasband, National Institutes of Health (Washington D.C, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeine Bedingungen

Die verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken bei 37° C und 95 % Luftfeuchtigkeit sowie einem Kohlenstoffdioxid (CO₂)-Gehalt von 5 % kultiviert. Sämtliche Arbeiten an den Zellkulturen wurden innerhalb einer sterilen Werkbank vorgenommen.¹

Für die Kultivierung der Zelllinien wurden Zellkulturflaschen der Größe 75 cm² verwendet. Dabei erfolgte der Einsatz von DMEM-Vollmedium (teilweise versetzt mit Selektionsantibiotika). Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig lichtmikroskopisch untersucht. Infektionen mit Mykoplasmen wurden regelmäßig überprüft und konnten ausgeschlossen werden. Die Zellen wurden in der Regel zwei Mal wöchentlich passagiert. Nach der Abnahme des alten Mediums und einem Waschvorgang mit sterilem PBS wurde durch die Zugabe von 1 ml Trypsin/ EDTA-Lösung eine Ablösung des Zellrasens nach circa fünf Minuten Inkubation im Brutschrank erreicht. Die abgelösten Zellen wurden im Folgenden in neuem Medium aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren homogen resuspendiert. Dies ermöglichte es, überschüssige Zellen zu verwerfen und die benötigte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche zu setzen. Zur Versuchsdurchführung wurden die Zellen in definierter Anzahl in 6- bis 96-Well-Platten gesetzt.

2.2.1.2 Zellzählung

Die Bestimmung der Zellzahl innerhalb eines definierten Volumens wurde mittels Trypanblaufärbung und anschließender Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Dabei wurden lediglich farblose und somit vitale Zellen berücksichtigt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Technik der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifikation spezifischer DNA-Segmente. Durch die in jedem Reaktionsschritt erreichte Verdoppelung der genetischen Information ermöglicht die PCR eine exponentielle Vermehrung des gewünschten DNA-Abschnittes. Die Auswahl des zu amplifizierenden Segmentes geschieht durch die Verwendung zweier spezifischer Primer (jeweils am 5'- und am 3'-Ende der Zielregion). Durch entsprechendes Design der Primer können zudem Schnittstellen für Restriktionsenzyme in das PCR-Produkt mit eingebaut werden, da die Sequenz der Primer letztlich auch Bestandteil des finalen Amplifikates ist.

¹ Ausgenommen hiervon sind die JC-1-Färbungen unmittelbar vor der FACS-Analyse.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

100 ng	DNA
5 µl	10fach Pfu Puffer
1 µl	dNTP Mix 10 mM
1,25 µl	5'- / 3'-Primer (jeweils)
0,5 µl	Phusion <i>High Fidelity</i> DNA Polymerase
ddH ₂ O ad 50 µl	

Reaktionsprotokoll:

3 Minuten	95° C	Denaturierung der DNA-Stränge	} 35x
30 Sekunden	95° C	Denaturierung der Doppelstränge	
30 Sekunden	60° C	<i>Annealing</i> der Primer	
circa 1 Minute/ Kilobase (kb)	72° C	Strangsynthese	
3 Minuten	72° C	finale Strangsynthese	
bis Entnahme	4° C	Beendigung der biochemischen Prozesse	

2.2.3 Restriktionsenzymverdau

Der durchgeführte DNA-Verdau erfolgte sequentiell mit den Restriktionsenzymen (RE) NotI und EcoRI. Dabei wurde die maximal verfügbare Menge DNA verwendet.

Zusammensetzung des ersten Reaktionsgemisches:

0,5-5 µg	DNA
4µl	10fach EcoRI-Puffer
4µl	EcoRI
ddH ₂ O ad 40µl	

Der Verdau erfolgte bei 37° C für circa 60 Minuten. Die Beendigung der ersten Reaktion erfolgte durch einen Phosphatase-Verdau. Zu diesem Zweck wurde den Reaktionsgemischen 2 µl *Calf intestinal alkaline phosphatase* (CIAP) zugesetzt. Der Verdau wurde für 10 min bei 37° C durchgeführt und anschließend durch fünfminütiges Erhitzen auf 65° C beendet. Es folgte eine Aufreinigung des Verdau-Gemisches mittels *JETQuick PCR Purification Kit*. Das gereinigte Gemisch wurde im Folgenden dem zweiten Restriktionsenzymverdau zugeführt.

Zusammensetzung des zweiten Reaktionsgemisches:

30 µl	DNA-Elution aus dem vorangegangenen Reinigungsschritt
4 µl	10fach O-Puffer
2 µl	NotI
ddH ₂ O ad 40µl	

Auch dieser Verdau erfolgte bei 37° C für circa 60 min; die Beendigung des biochemischen Prozesses und die Aufreinigung der Verdauungsprodukte erfolgte durch eine direkt anschließende Agarose-Gel-Elektrophorese. Die entsprechenden Banden aus dem Gel wurden mit dem *GF-I Nulceic Acid Extraction Kit* extrahiert und ihr DNA-Gehalt photometrisch bestimmt.

Die SallI-Kontroll-Verdau-Reaktionen erfolgten entsprechend des ersten Reaktionsschrittes mit anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese. Abweichend wurden O-Puffer und SallI-Restriktionsenzyme verwendet.

2.2.4 DNA-Ligation

Die Zusammenfügung zuvor mit identischen Restriktionsenzymen geschnittener DNA-Segmente (auch als Vektor und *Insert* bezeichnet) erfolgte unter Verwendung der T4 DNA Ligase. Die Reaktionsdauer bei Raumtemperatur betrug circa 20 min. Der biochemische Prozess wurde in der Regel durch Transformation des Ligationsgemisches in kompetente Bakterien beendet.

Zusammensetzung des Reaktionsgemisches:

DNA	Verhältnis Insert: Vektor variabel; z.B. 3:1, 4:2 o.ä.
2 µl	10fach T4 DNA Ligase Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase
ddH ₂ O	ad 20 µl

2.2.5 LB-Medium

Zur Herstellung von LB-Medium wurde Reinwasser mit LB-Pulver im Massenverhältnis 40:1 vermischt und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlung <60° C erfolgte fakultativ die Zugabe von Antibiotika, z.B. Ampicillin.

2.2.6 Bakterientransformation

Zur Einbringung und Amplifizierung von auf Plasmiden kodierten genetischen Informationen in chemisch kompetente DH5α Bakterien wurde eine Hitzeschocktransformation angewendet. Die bei -80° C aufbewahrten Bakterien wurden in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit der gewünschten Menge Plasmid-DNA versetzt und 10 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien mit der zugegebenen DNA für 45 sec auf 42° C erhitzt und direkt danach erneut für 2 min auf Eis gegeben. Nach der Zugabe von 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika mussten die E. coli für eine Stunde bei 37° C inkubiert werden. 100 µl dieser Kultur wurden abschließend auf eine LB-

Ampicillin-Platte aufgetragen und über Nacht bei 37° C bebrütet. 12-16 Stunden später konnten etwaige entstandene Bakterienkolonien auf der Platte zur weiteren molekularbiologischen Arbeit verwendet werden.

2.2.7 Plasmid-DNA Aufreinigung aus Bakterien (Miniprep)

Zur Aufreinigung amplifizierter Plasmid-DNA aus kompetenten Bakterien (Miniprep) wurde das *GeneJet Plasmid Miniprep Kit* (Fa. Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) verwendet; die methodische Durchführung richtet sich nach dem Protokoll des Herstellers. Die Bakterien wurden zuerst abzentrifugiert und nach einer Resuspension lysiert. Es folgte die Zugabe von Neutralisationslösung sowie eine erneute Zentrifugation. Der die DNA enthaltene Überstand wurde anschließend in eine DNA-bindende Säule gegeben, zentrifugiert, zweimal gewaschen und abschließend mit 50µl Elutionspuffer gelöst. Die Menge der so präparierten DNA kann durch photometrische Messung ermittelt werden.

2.2.8 Ethidiumbromid Gelelektrophorese²

Zur Vorbereitung der Agarose-Gelelektrophorese wurde Biozym-LE-Agarose mit 200 ml 1x TAE-Puffer bis zu Agarose-Konzentrationen von 0,8 % bis 2,5 % versetzt. Geringere Agarosekonzentrationen wurden dabei für die Detektion erwartbar größerer DNA-Segmente verwendet, höhere Konzentrationen mit einer resultierenden geringeren Laufgeschwindigkeit dagegen für die bessere Differenzierbarkeit sehr kleiner DNA-Abschnitte.

Das Gemisch aus Pulver und Puffer wurde anschließend für 3 min bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt, daraufhin mit 10µl Ethidiumbromid versetzt und in die vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach dem Einsetzen eines Kammes zur Freihaltung der Ladungsräume erfolgte die Trocknung des Gels bei Raumluft für 30-45 min. Währenddessen wurden die DNA-Proben 1:6 mit 6x *Loading Dye* versetzt. Nach Entfernen des Kammes konnten die Ladungskammern mit 5 µl DNA-*Ladder* bzw. 15-20 µl Probengemisch beladen werden. Die Kammer wurde abschließend mit 1x TAE-Puffer befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 mV.

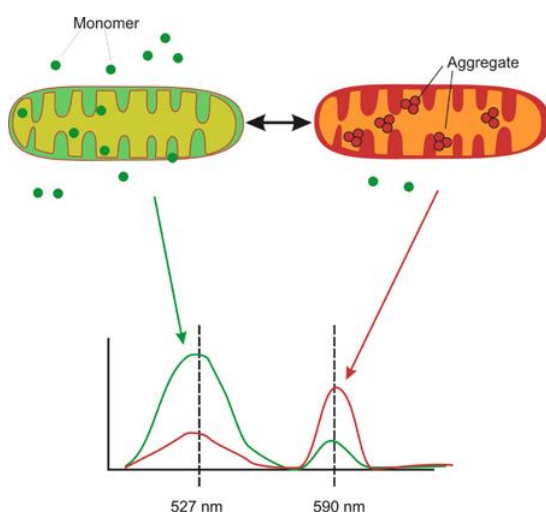
² Aufgrund der Kanzerogenität von Ethidiumbromid erfolgten die Arbeiten zur Ethidiumbromid-Gelelektrophorese in einem Luftabzugs-Reinraum unter Verwendung von Nitril-Schutzhandschuhen.

2.2.9 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, oder auch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), können Zellen hinsichtlich ihrer Granularität, Größe und verschiedener Fluoreszenzmerkmale charakterisiert werden. Dabei wird ein Einzelzellstrahl durch einen oder mehrere (Farb-)Laser gelenkt. Durch die Analyse der Streuung können dabei Granularität und Größe ermittelt werden. Zusätzlich ermöglicht das FACS die Anwendung von Fluoreszenz-Farbstoffen (z.B. JC-1) oder -Proteinen (z.B. GFP), die durch die spezifische Wellenlänge der Laser angeregt werden können. Das charakteristische Farb-Emissionsspektrum wiederum kann dann in der Durchflusszytometrie detektiert und auf die analysierten Zellpopulationen bezogen werden.

2.2.10 Mitochondriale Membranfärbung mit JC-1

Zur Beurteilung der mitochondrialen Membran und des Zustandes ihres - für die Funktion der Mitochondrien essentiellen - Membranpotentials wurde der Farbstoff JC-1 verwendet. JC-1 ist ein kationischer membranpermeabler Carbocyanin-Farbstoff, der als Monomer und im aggregierten Zustand Emissionsmaxima unterschiedlicher Wellenlängen besitzt. Er zeigt dadurch eine Potential-abhängige Anreicherung in Mitochondrien durch einen in der Durchflusszytometrie oder im Fluoreszenzmikroskop detektierbaren Wechsel der Fluoreszenz-Emission von grün (~529 nm) zu rot (~590 nm) an, hervorgerufen durch die konzentrationsabhängige Bildung rot fluoreszierender J-Aggregate (Abbildung 2.1). Somit kann eine Depolarisation der mitochondrialen Membran über einen Abfall des Verhältnisses roter/grüner Fluoreszenz oder die Abnahme der Rotfluoreszenz allein nachgewiesen werden [113].



2.1 Potentialabhängige Fluoreszenzänderung des Carbocyanin-Farbstoffs JC-1. Das (intakte) mitochondriale Membranpotential ist charakterisiert durch ein zum intermembranösen Raum hin positives Potential. Dieses sorgt für eine Aggregatbildung des Farbstoffes JC-1 und in Folge dessen zu einem Wechsel der Wellenlänge des Fluoreszenzsignals. Entsprechend ist eine Depolarisation von $\Delta\psi_m$ bedingt durch den dann primär als Monomer vorliegenden Farbstoff mit einem Abfall der roten Fluoreszenz vergesellschaftet. Modifiziert nach [114].

Zur Färbung mit JC-1 wurden 2×10^5 Zellen in 1 ml PBS suspendiert und mit $100 \mu\text{l}$ $15 \mu\text{M}$ JC-1-Färbelösung versetzt. Anschließend inkubierten die Zellen für 30 min bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ im Dunkeln. Es folgte eine Abzentrifugation der Zellen (bei 400g für 5 min) und zweimaliges

Waschen mit 1 ml PBS (jeweils gefolgt von einer erneuten Zentrifugation bei 400 g für 5 min). Das entstandene Zellpellet wurde in 300 μ l PBS gelöst und unmittelbar im Durchflusszytometer analysiert.

2.2.11 FCCP

Als Positivkontrolle für eine erfolgte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials wurde sowohl für die JC-1-Färbungen als auch im Rahmen von Zytokin-Expressionsversuchen das Protonophor FCCP (Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) verwendet. Es handelt sich dabei um ein Wasserstoff-Ionophor, welches in der Lage ist, H^+ -Protonen abseits der Atmungskettenkomplexe über die innere mitochondriale Membran zu transportieren. Diese sogenannte Entkoppelung der Atmungskette führt letztlich über einen Ausgleich des elektrochemischen Gradienten und damit über die Depolarisation von $\Delta\psi_m$ zum Zusammenbruch der ATP-Synthese [115, 116].

Bei Anwendung im Rahmen der Fluoreszenzmessungen wurden die entsprechenden Kontrollen zusätzlich mit 1,25 μ l 4 mM FCCP-Lösung versetzt. Alle anderen Spezifikationen und Arbeitsschritte entsprachen den in 2.2.10 dargestellten Vorgaben.

Für die Versuche zur Evaluierung der antiviralen Funktion unter FCCP-Anwendung wurden 2×10^4 Zellen in 500 μ l DMEM +/- 4 μ g/ml Doxycyclin in 24-Well-Platten gesetzt. Vier Tage später erfolgte die Inkubation mit FCCP: Nach Abnahme des alten Mediums wurden pro Well 20 μ l 1,2 mM FCCP in OptiMEM zugegeben. Eine Stunde später fand die virale Infektion statt (vgl. 2.2.20). Im Anschluss wurden die Zellen wieder in DMEM kultiviert, allerdings unter erneuter Zugabe von 1,2 mM FCCP. Sechs Stunden nach Virusinfektion konnte das Medium für ELISA-Messungen asserviert und die Zellen zur RNA-Analyse lysiert werden.

2.2.12 siRNA knock-down

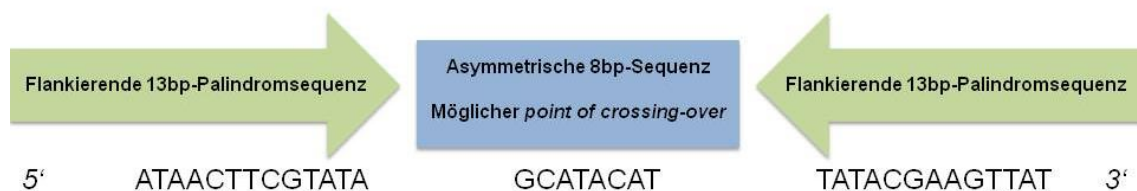
Für die siRNA-*knock-down*-Experimente wurden 2×10^4 MEFs in 500 μ l DMEM im 24-Well-Format ausplattiert. Einen Tag später wurden 1 μ l 20 μ M siRNA und 1 μ l Lipofectamine RNAiMax jeweils in OptiMEM ad 50 μ l gegeben und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin erfolgte die Zusammenführung beider Gemische und eine erneute Inkubation bei Raumtemperatur für nun 15 min. Die fertige Transfektionslösung konnte dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert werden. 24 Stunden später wurde diese siRNA-Transfektion zur Optimierung des *knock-down*-Ergebnisses nach identischer Prozedur wiederholt.

2.2.13 Das Cre-Lox-Rekombinationssystem

Zur Beantwortung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit war es erforderlich, Zelllinien zu verwenden, bei welchen durch äußere Manipulation eine Deletion des untersuchten Proteins CRIF1 erzielt werden kann. In der Abteilung sind diesbezüglich durch Stefanie Lietke bereits umfangreiche Vorarbeiten mit der Verwendung von *small interfering RNA* (siRNA) durchgeführt worden. Die Schwierigkeiten bei dieser Form von Zellmanipulation sind die häufig nur unvollständige Reduktion an mRNA- und Proteinlevel des Untersuchungsobjektes, sowie die Notwendigkeit der Durchführung einer Transfektion mit doppelsträngiger Fremd-RNA. Daher erschien es vorteilhaft, ein neues System zu etablieren, um die Fragestellung methodisch vorteilhafter untersuchen zu können.

Das Cre-Lox-Rekombinationssystem stammt ursprünglich aus dem Bakteriophagen P1. Dabei besteht an spezifischen DNA-Motiven die Möglichkeit zur sequenzspezifischen genomischen Rekombination durch die P1-codierte Cre-Rekombinase [117].

Die Cre-Rekombinase ist ein 38 Kilo-Dalton (kDa) großes Protein, welches mechanistisch der Topoisomerase I ähnelt. Die Erkennungssequenz der Cre-Rekombinase zur katalytischen Umsetzung der Rekombinationsreaktion ist das so genannte LoxP-Element (Abbildung 2.2). Hierbei handelt es sich um ein 34bp-DNA-Sequenzmotiv, bestehend aus einem zentralen asymmetrischen Element von 8bp sowie zwei flankierenden palindromischen Sequenzen [118].

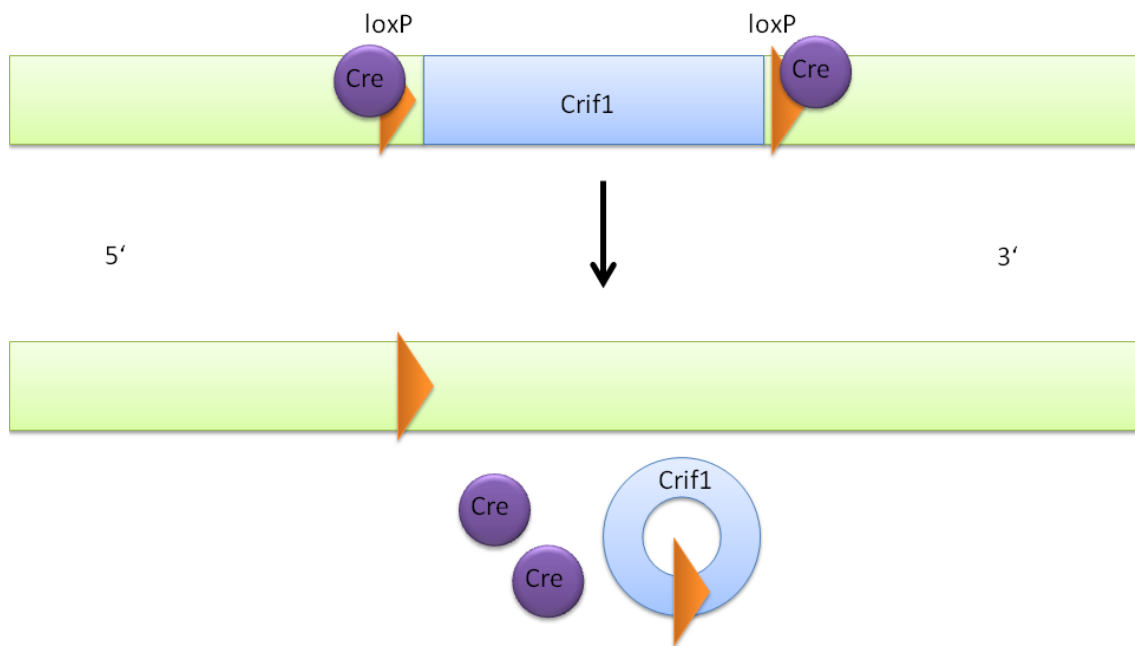


2.2 Das LoxP-Element. Die vom Bakteriophagen P1 stammende LoxP-Sequenz besteht aus einer zentralen, möglicherweise den *point of crossing-over* enthaltenden, 8bp-Sequenz, die von zwei palindromischen 13bp-Sequenzen flankiert wird. Schematische Darstellung nach [118].

Zur Umsetzung der Reaktion der Cre-Rekombinase ist das Vorhandensein von zwei LoxP-Motiven erforderlich. Je nach Ausrichtung der LoxP-Elemente unterscheiden sich die DNA-Modifikations-Mechanismen der Cre-Rekombinase. Bei gleichgerichteter Orientierung der Erkennungssequenz wird der DNA-Abschnitt zwischen beiden Motiven zusammen mit dem 3'-gelegenen LoxP-Element von der Cre-Rekombinase ausgeschnitten. Bei gegengesetzter Ausrichtung würde der dazwischenliegende DNA-Bereich hingegen invertiert werden [117].

Durch die Möglichkeit der Einbringung entsprechender LoxP-Sequenzen in das Genom beliebiger Zellen entsteht eine breit einsetzbare molekularbiologische Methode zur gezielten Entfernung eines DNA-Abschnittes. Dem Cre/LoxP-System werden dabei entscheidende Vorteile gegenüber alternativen Verfahren zu Gute gehalten: Es benötigt weder Ko-Faktoren noch externe Energie; die LoxP-Sequenzen sind darüber hinaus verhältnismäßig klein und die Cre Rekombinase zudem ein sehr stabiles Protein [119].

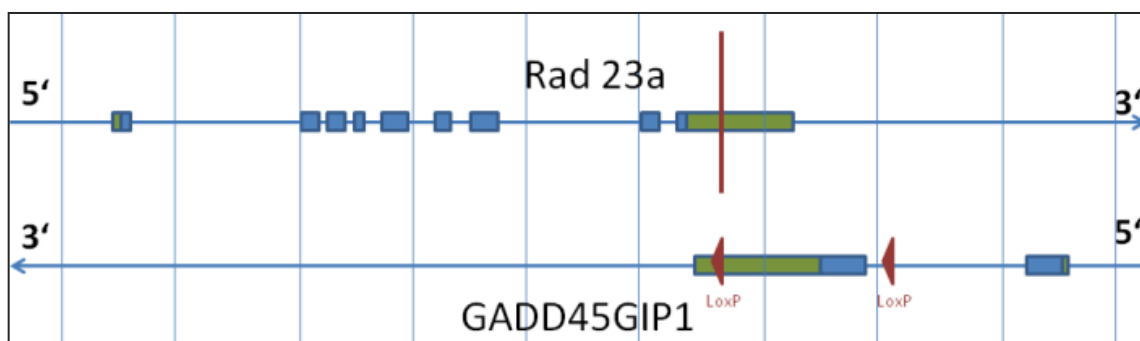
Für die vorliegende Arbeit wurde eine murine embryonale Fibroblastenzelllinie (MEF) verwendet, in welcher 5'- und 3'- des CRIF1 Gens je ein LoxP-Element in identischer Orientierung durch Kwon et al. eingebracht wurde [107]. Das zusätzliche Einbringen einer funktionellen Cre-Rekombinase katalysiert in diesen Zellen daher die Exzision des für CRIF1 codierenden DNA-Segments (Abbildung 2.3).



2.3 Das Cre-Lox-Rekombinations-System. Die Cre-Rekombinase (lila Kreise) exzidiert bei identischer Ausrichtung der LoxP-Sequenzen (orangene Dreiecke) den zwischen beiden Motiven liegenden DNA-Abschnitt (blau) mitsamt des 3' gelegenen LoxP-Motivs. Schematische Darstellung.

2.2.14 Die CRIF1 Genomregion

Die genetische Information für CRIF1 ist bei der Maus auf Chromosom 8 kodiert, noch in seiner ursprünglichen Nomenklatur als *growth arrest and DNA-damage-inducible gamma interacting protein 1* (GADD45GIP1) bezeichnet. Es hat eine Sequenzlänge von 3201 Basenpaaren (bp) und enthält zwei Exone (Exon 1: 360 bp, Exon 2: 1374 bp). Diese bestehen aus den 5' und 3' untranslatierten Regionen (UTR) sowie den kodierenden Gensequenzen (Abbildung 2.4). Die Transkription ergibt somit mRNA mit einer Länge von 1734 bp, die Protein-kodierende Sequenz beträgt dabei 745 bp. Auf dem Gegenstrang befindet sich teilweise überlappend mit CRIF1 die Geninformation von Rad23a (siehe Kapitel 3.8).³



2.4 Schematische Darstellung der CRIF1-Genomregion auf Chromosom 8 (Maus). Grün dargestellte Boxen symbolisieren die 5'- und 3' UTR. Die blauen Kästchen repräsentieren die kodierenden DNA-Segmente. Diese Boxen zusammen stellen somit die Exone dar. Der Abstand zwischen den vertikalen Orientierungslinien beträgt jeweils 1000 bp. Als rote Dreiecke eingezeichnet finden sich die LoxP-Sites im CRIF1-Gen. Der rote horizontale Balken im Bereich des Gegenstranges kennzeichnet den logischen Rekombinationspunkt im Rad23a-3'-UTR-Abschnitt. Schematische Darstellung gemäß *Gene ID: 102060* und mRNA-Referenz: NM_183358.4.

2.2.15 Das MSCV-Cre System

Um in den MEF mit LoxP-System einen CRIF1 - *knock-out* zu erzielen, ist es erforderlich, die Cre-Rekombinase in eben jenen Zellen zu exprimieren. Zu diesem Zweck wurde initial ein retrovirales Transduktionssystem verwendet. Das *Murin Stem Cell Virus - Cre* (MSCV-Cre) ist optimiert für die Übermittlung genetischer Informationen unter anderem in murine Zellen wie die verwendeten Maus-Embryofibroblasten.

Die Transfektion des MSCV-Cre-Plasmides zusammen mit den für Verpackungs- und Fusionsproteine kodierenden Plasmiden Delta 8.9 und VSV-G in *Human Embryonic Kidney - Zellen* (HEK 293T) führt in diesen zur Produktion der erforderlichen retroviralen Partikel.

³ Referenz: NM_183358.4 (mRNA) | *Gene ID: 102060* (DNA)

2.2.15.1 Herstellung des MSCV-Cre Plasmid-Gemisches

In ein 96-Well wurden jeweils 25 µl Plasmid-Mix transfiziert. Dieser beinhaltet 100 ng des lentiviralen MSCV-Cre Plasmides, 100 ng Delta 8.9, 10 ng VSV-G sowie 0,6 µl *GeneJuice* Transfektionsreagenz. Dabei wurden zuerst 9,4 µl OptiMEM und 0,6 µl *GeneJuice* gemischt und separat davon die drei verwendeten Plasmide in einem Gesamtvolumen von 15 µl OptiMEM kombiniert. Es folgte eine fünfminütige separate Inkubation der beiden Lösungen bei Raumtemperatur. Anschließend wurden beide Ansätze vermennt und für 25 min bei RT inkubiert.

2.2.15.2 MSCV-Cre Virus-Produktion

Initial wurden 2×10^4 HEK 293T-Zellen in 100 µl DMEM im 96-Well Format ausplattiert. Rund sechs Stunden später erfolgte die Transfektion mit dem vorbereiteten Plasmid-Mix (s.o.).⁴ Nach 24 Stunden wurde das ursprüngliche Medium abgenommen und durch hochkonzentriertes *Fetal Calf Serum* (FCS) Medium (30 % FCS-Gehalt) ersetzt. Weitere 24 bis 36 Stunden später konnte der die retroviralen Partikel enthaltene Überstand abgenommen werden. Dieser musste abschließend noch zur Entfernung von Zelltrümmern unter Verwendung eines 0,45 µm -Filters (steril) filtriert werden.

2.2.15.3 Retrovirale Transduktion mit MSCV-Cre

Für die retrovirale Transduktion wurden 5×10^4 MEF-Zellen im 6-Well-Format in 2 ml DMEM ausplattiert. Am nächsten Tag erfolgte die retrovirale Transduktion durch Zugabe von 333 µl MSCV-Cre-Virusüberstand, 8 µl Protaminsulfat und 10 µl 1 M HEPES-Puffer. Anschließend wurden die Zellen bei 800 g und 32° C für 90 min zentrifugiert und dann wieder in den Brutschrank gegeben.

2.2.16 Das Tat-NLS-Cre System

Die rekombinante Cre-Rekombinase „Tat-NLS-Cre“ (Fa. Excellgen, Rockville, MD, USA) wurde mittels Plasmid-Transfektion eines *E. coli* Bakterienstammes gentechnisch hergestellt und als aufgereinigtes Protein kommerziell erworben. Sie enthält ein N-terminales 6hHis-Tag, ein Tat-Peptid⁵ sowie eine nukleäre Lokalisationssequenz⁶ (NLS) [120]. Das Tat-Peptid ist ein so genanntes *Cell penetrating peptide*, mit dessen Hilfe zum Beispiel Proteine – wie in diesem Fall Tat-NLS-Cre – die Plasmamembran von Zellen durchdringen können [121]. Mit Hilfe der NLS schließlich gelangt die Cre-Rekombinase zu ihrem Wirkungsort im Zellkern [122]. Damit stellt das Tat-NLS-Cre System eine alternative CRIF1-*knock-out*-Methodik dar, bei der im Gegensatz

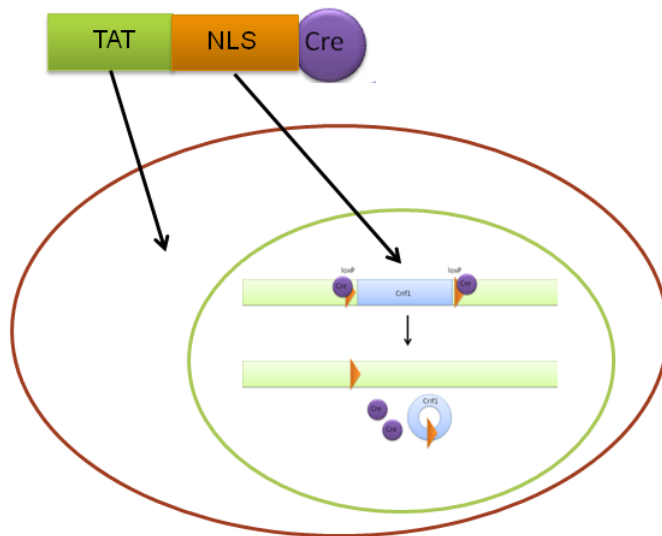
⁴ Ab hier erfolgten die Arbeiten in Einrichtungen der Biologischen Sicherheitsstufe 2.

⁵ Aminosäuresequenz: GRKKRRQRRRPPAGTSVSL

⁶ Aminosäuresequenz: PKKKRKY

zum MSCV-Cre System auf eine retrovirale Transduktion zu Gunsten der so genannten Proteintransduktion verzichtet werden kann (Abbildung 2.5).

Zur Tat-Cre-Proteintransduktion wurden 2×10^4 MEF in $500 \mu\text{l}$ DMEM im 24-Well-Format ausplattiert. Nach dem Anwachsen der Zellen (sechs bis acht Stunden) wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die behutsame Zugabe von $0,25 \mu\text{M}$ Tat-Cre in $250 \mu\text{l}$ OptiMEM für sechs Stunden. Die Kontrollbedingungen wurden lediglich in OptiMEM inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe regulären Zellmediums ($500 \mu\text{l}$ DMEM) und die Fortführung der Zellkultur.



2.5 Schematische Darstellung des Tat-Cre medierten Cre-Lox-Rekombinationssystems. Die rekombinante Cre Rekombinase enthält eine Tat-Sequenz zur Überwindung der zellulären Plasmamembran, sowie eine Nukleäre Lokalisationssequenz mit deren Hilfe sie ihren Wirkungsort im Zellkern erreicht. Dort katalysiert sie die Seit-zu-Seit-Rekombinationen der LoxP-Abschnitte der nukleären DNA. Dies resultiert in den verwendeten MEF LoxP CRIF1 in einer Deletion des CRIF1-Genabschnittes.

2.2.17 Das Tet-On Cre System

Das Tet-On Cre System dient der Durchführung konditioneller LoxP-bezogener DNA-Rekombinationen ohne die Notwendigkeit einer retroviralen oder Protein-Transduktion. Es ist von Gossen und Bujard ursprünglich als so genanntes Tet-Off-System entwickelt worden [123].

2.2.17.1 Grundlegendes Prinzip

Das System basiert auf dem Tn10-Tetracyclin-Resistenz Operon von *E. coli*. In der Abwesenheit von Antibiotika sorgt die Bindung des tet-Repressors (TetR) an den Operator (TetO) für die fast vollständige Unterdrückung der Expression von Resistenzgenen [124]. In der Anwesenheit bereits sehr geringer Konzentrationen an Tetracyclin-Antibiotika (Tet) wird jedoch die Bindung des TetR an den TetO verhindert und damit die Transkription resistenzspezifischer Gene induziert [125].

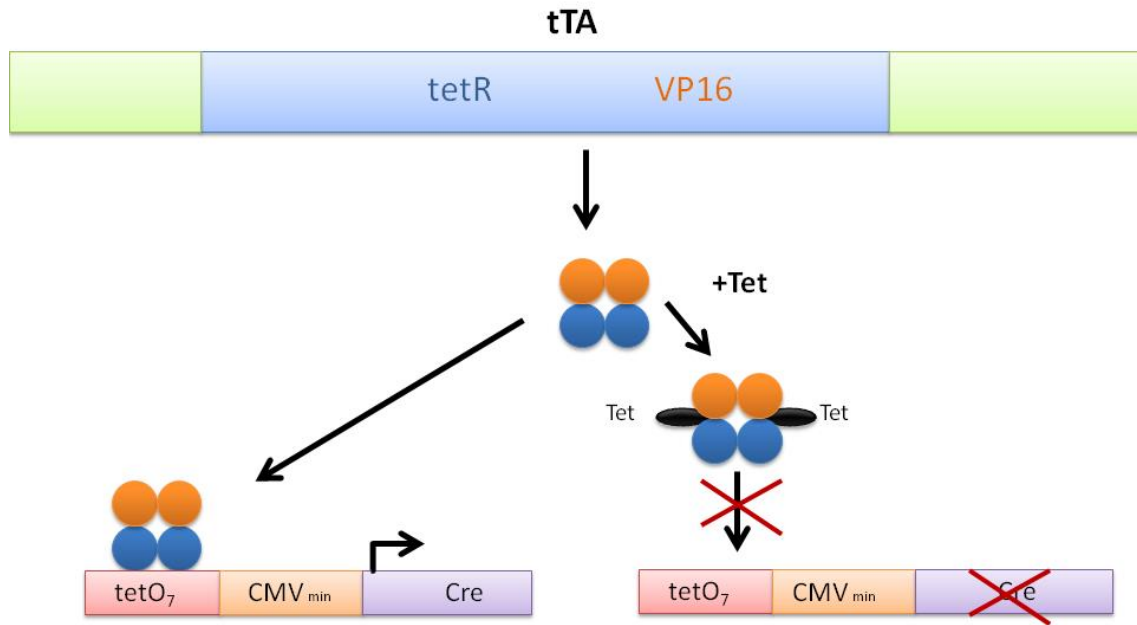
2.2.17.2 Erforderliche Systembestandteile

Die molekularbiologische Anwendung dieses Prinzips fußt auf zwei verschiedenen Expressionssystemen, die miteinander interagieren: Die erste Einheit ist der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator (tTA), ein Fusionsprotein aus TetR und der Transkriptions-Transaktivationsdomäne des Herpes Simplex Virus (HSV-) Proteins 16 (VP16) [126]. Den zweiten Teil bildet das *Tetracycline Response Element* (TRE). Es besteht aus sieben identischen Wiederholungen der TetO-Sequenz (TetO₇) und einem dem frühen Promotor des Cytomegalie-Virus (CMV) entstammenden minimalen Promoterfragment (CMV_{min}) [127].

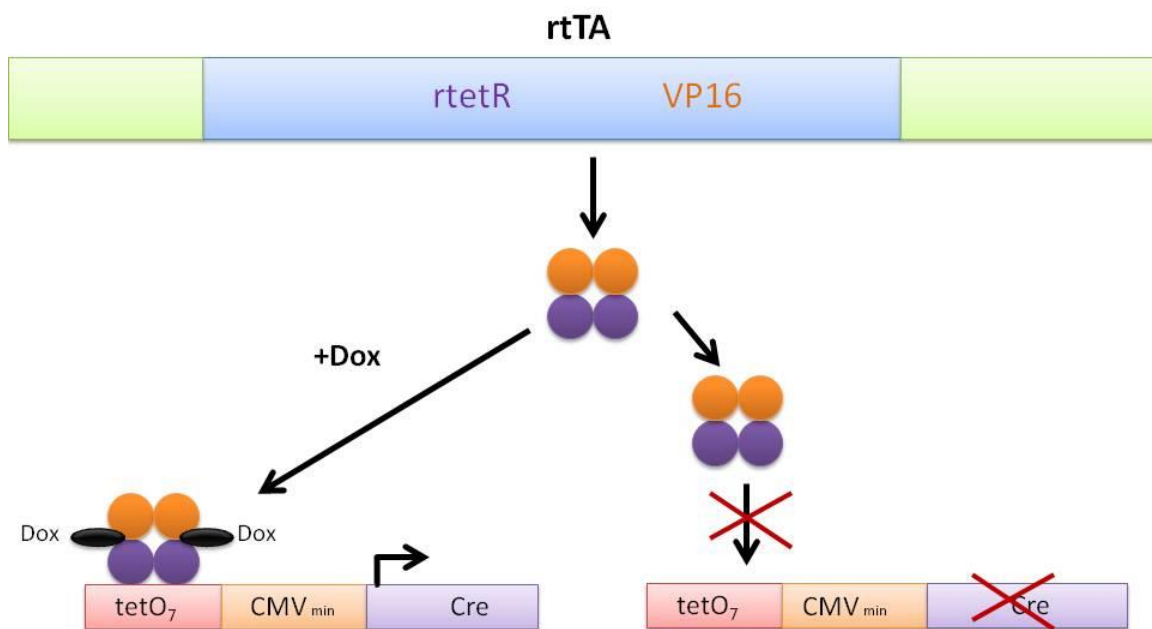
2.2.17.3 Funktionsweise des Tet-Off- und Tet-On-Systems

Der tTA ist nun in der Lage, an das TRE zu binden und dadurch die Expression des unter Kontrolle des TRE stehenden Gens zu induzieren. Die Anwesenheit von Tet hingegen verhindert diese Bindung, wodurch die konstitutionelle Expression des *Gene of Interest* (GOI) durch die Anwesenheit von Tetrazyklin supprimiert werden kann (Tet-Off-System, Abbildung 2.7) [128].

Als Nachteil des Tet-Off-Systems wird die dauerhaft notwendige Präsenz von Tetracyclin zur Unterdrückung der Genexpression angesehen: Falls gewünscht kann die Induktion der Genexpression somit nur langsam wieder gestartet werden, da erst sämtliche Restmengen an Antibiotikum entfernt oder abgebaut werden müssen. Diese Überlegungen mündeten in der Entwicklung des Tet-On-Systems. Durch Mutation vier verschiedener Aminosäuren [129] konnte der Effekt der Tetracyclin-Bindung umgekehrt werden: Im nativen Zustand ist der reverse Tet-Repressor (rTetR) nun nicht mehr in der Lage, DNA zu binden; dies wird erst durch die Konformationsänderung unter Anwesenheit von Tetracyclin möglich. Im Rahmen der Untersuchung des Systems konnte eine stark erhöhte Empfindlichkeit des rTetR auf Doxycyclin (Doxycyclin) festgestellt werden, so dass sich diese Substanz als Standard-Induktor des Tet-On-Systems etablierte: In Verbindung mit dem reverse Tet-Repressor (rTetR) führt die Zugabe von Doxycyclin also zur Initiierung der Genexpression (Tet-On-System, Abbildung 2.6) [130].



2.7 Tet-Off-System Der Tetracyclin-kontrollierte Transaktivator tTA (ein Fusionsprotein aus dem tet-Repressor tetR und der Transkriptions-Transaktivationsdomäne VP16) bindet an die TetO-Sequenz des Tetracyclin Response Elements (TRE), wodurch über den CMV-Promotor die Genexpression des Gene of Interest (in diesem Fall: Cre-Rekombinase) initiiert wird. Bei Anwesenheit von Tetracyclin (Tet) ist der tTA aufgrund konformationischer Änderungen – hervorgerufen durch die Tet-Bindung – nicht mehr in der Lage, am TRE zu binden, so dass die Genexpression sistiert. Schematische Darstellung.

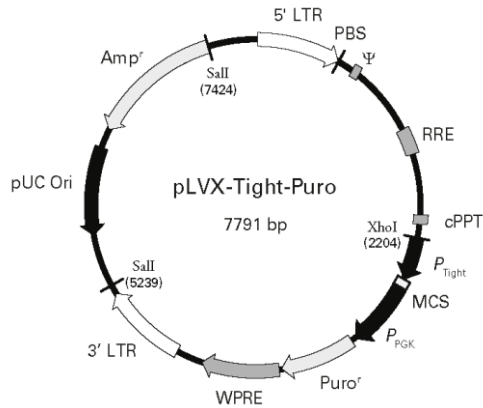


2.6 Tet-On-System Durch Mutation von vier Aminosäuren wird der Effekt der Tetracyclin-Bindung umgekehrt: reverses tTA (rtTA) ist im nativen Zustand nicht in der Lage, das TRE zu binden. Erst die durch die Zugabe von Doxycyclin hervorgerufene Konformationsänderung ermöglicht dem rtTA die Bindung der TetO-Sequenz und damit die Initiierung der Genexpression (hier: Cre-Rekombinase). Hierbei handelt es sich um das in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung kommende Prinzip. Schematische Darstellung.

2.2.18 Herstellung der stabilen MEF flx/flx CRIF1 Tet-on Cre Zelllinie

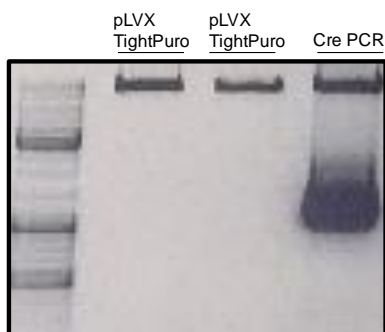
2.2.18.1 Klonierung des pLVX-Cre-Plasmides

Das Tet-On System besteht aus zwei Plasmiden: „pLVX Tet-On Advanced“ beinhaltet die rtTA-Informationen, wohingegen „pLVX Tight-Puro“ mit einer *Multiple Cloning Site* (MCS) zur Einbringung des *Gene of Interest* (GOI) ausgerüstet ist (Abbildung 2.8).



2.8 Vektorkarte des pLVX-Tight-Puro-Plasmides. Das zur Expression des GOI als Grundlage angewandte Plasmid „pLVX_TightPuro“, bestehend aus 7791 bp.

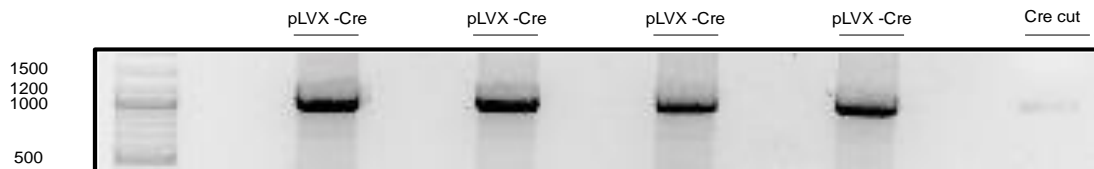
Zur Vorbereitung der Cre-Klonierung wurde eine PCR mit dem bereits vorhandenen *Murin Stem Cell Virus Cre* Plasmid als *template* durchgeführt. Die dabei verwendeten Cre-Primer enthalten in ihrer Sequenz zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und NotI, die durch die Methodik der PCR somit in das Cre-Amplifikat inseriert worden sind.⁷ Im Anschluss an die PCR erfolgte ein sequentieller Restriktionsenzym-Verdau von „pLVX-Tight-Puro“ sowie des Cre-PCR-Produktes, jeweils mit den Enzymen EcoRI und NotI (mit zwischenzeitlichem Phosphataseverdau und Aufreinigung des PCR-Produktes). Unmittelbar nach dem Verdau wurden die DNA-Fragmente auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Durch die positiven Banden für Cre und den Vektor konnte der erfolgreiche Restriktionsenzym-Verdau bestätigt werden (Abbildung 2.9).



2.9 Restriktionsenzym-Verdau „pLVX Tight-Puro“ Leervektor und Cre-PCR-Produkt. Das „pLVX-Tight-Puro“ Plasmid sowie das Cre-PCR Produkt wurden jeweils mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI geschnitten. Unmittelbar darauffolgend wurden die DNA-Fragmente auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um den korrekten RE-Verdau zu verifizieren und die geschnittenen Segmente zur weiteren Klonierung aufgereinigt aus dem Gel extrahieren zu können.

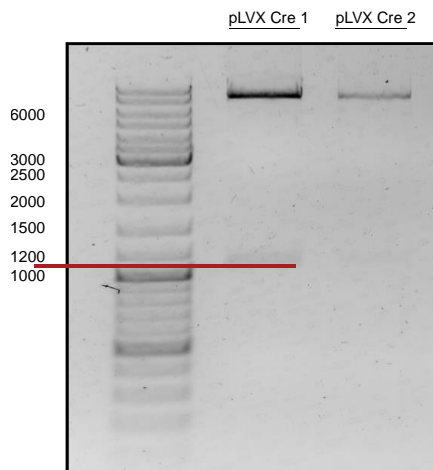
⁷ In der MCS des „pLVX Tight-Puro“ Vektors befinden sich ebenfalls entsprechende Schnittstellen für Restriktionsenzyme.

Die entsprechenden Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel isoliert. Dadurch konnten beide geschnittenen DNA-Fragmente durch Verwendung einer T4-DNA Ligase miteinander ligiert werden. Dieses DNA-Produkt wurde in DH5 α Bakterien transformiert (Verhältnis Vektor zu Insert 2:4). Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Ampicillin Platten ausgestrichen. Die so gewachsenen Kolonien wurden zur DNA-Extraktion lysiert. Gleichzeitig wurde aus denselben Kolonien noch eine Probe für eine Kolonie-PCR entnommen. In der Kolonie-PCR zeigt sich dabei, dass alle Kolonien Cre-positiv sind (Abbildung 2.10).



2.10 Kolonie-PCR „pLVX-Cre“. Die nach der Ligation und Transformation gewachsenen Kolonien wurden mittels Kolonie-PCR und anschließender Agarose-Gel-Elektrophorese auf das Vorhandensein von Cre untersucht. Dabei zeigt sich im Vergleich zur (schwachen) *Cre-cut*-Kontrolle ein positives Cre-Bandenmuster in allen überprüften Kolonien.

Ein weiterer Kontrollverdau mit den bereits zur Einbringung von Cre verwendeten Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* erbrachte für die Klone 1 und 2 erneut positive Banden in der Gel-Elektrophorese (Abbildung 2.11). Zur endgültigen Absicherung erfolgte die Sequenzierung des Plasmids mit Cre-Primern. Dabei konnten vier eindeutig positive Klone identifiziert werden.



2.11 Restriktionsenzym-Kontrollverdau der pLVX-Cre Klone.

Die durch die DNA-Isolation gewonnenen „pLVX-Cre“ Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *NotI* verdaut und anschließend auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Die Bande bei 1000-1200 bp entspricht dem Cre-Schnittprodukt.

2.2.18.2 *Lentivirale Transduktion zur stabilen Integration der Cre-Rekombinase in MEF*

Die stabile Integration der Cre-Rekombinase Plasmide in die DNA der MEF erfolgte per Lentiviraler Transduktion. Zu diesem Zweck wurde in HEK293T Zellen entsprechender Virus produziert. 15000 HEK-Zellen wurden dazu in 100 μ l DMEM im 96-Well Format ausplattiert. Jeweils circa 40 μ l DNA, 2,82 μ l VSV-G und 11,96 μ l delta8.9 wurden in 1600 μ l OptiMEM für 5 min inkubiert. Gleichzeitig erfolgte in getrennten Röhrchen bei Raumtemperatur die Inkubation von 66 μ l GeneJuice in 1034 μ l OptiMEM. Anschließend wurden der Plasmid-Mix und der GeneJuice-Mix vermischt und zusammen für 25 min bei RT inkubiert. Danach konnten die vorbereiteten HEK293T-Zellen mit 25 μ l Transfektions-Mix pro 96-Well transfiziert werden.

Einen Tag später wurde das Medium der HEK-Zellen auf *High*-FCS gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Überstände der Wells, in denen sich nun das Lentivirus befand, abgenommen und mittels 0,45 μ m-Filter steril filtriert.

Zur lentiviralen Transduktion wurden 2500 MEF flx/flx CRIF1 im 96-Well Format ausplattiert. Nach ihrem Anwachsen erfolgte die Transduktion mit 100 % und 20 % Virus. Dabei wurde eine Co-Transduktion von „pLVX-Cre“ und „pLVX Tet-On Advanced“ in verschiedenen Mengenverhältnissen (1:1, 3:7, 7:3) vorgenommen. Nach 60-minütiger Zentrifugation bei 1200 g und 32° C wurden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

Einen Tag später erfolgte der Mediumwechsel auf reguläres DMEM-Vollmedium. Nach weiteren 24 Stunden startete die Selektion der Zellen unter Einsatz von 4 μ g/ml Puromycin und 1 mg/ml Neomycin. Insgesamt 24 Klone der 20%-Bedingung, die die Virus-Transduktion zwar überlebt, aber kein schnelles Wachstum unter Selektion gezeigt haben (und damit als am Wahrscheinlichsten erfolgreich transduziert angesehen werden konnten), wurden im Verlauf in 24-Well-Platten überführt. Nach weiterer Expansion auf drei 24-Wells pro Klon konnte ein erster Test auf *Knock-out* gestartet werden. Zu diesem Zweck wurden die Klone mit 4 μ g/ml Doxycyclin inkubiert.

2.2.18.3 *Doxycyclin-induzierter Tet-On-Cre-knock-out*

Im Rahmen des konditionellen Doxycyclin-induzierten Tet-On-Cre-*knock-out* wurden 2×10^4 MEF in 500 μ l DMEM mit 4 μ g/ml Doxycyclin im 24-Well-Format ausplattiert. Bei eventuellem Mediumwechsel erfolgte eine erneute Zugabe von DMEM mit 4 μ g/ml Doxycyclin.

2.2.19 poly I:C Immunstimulation

Zur artifiziellen Simulation einer immunologischen Gefährdungslage der Zellen im Sinne einer viralen Infektion wurde das synthetische Immunstimulanz poly I:C (*Polyinosinic: polycytidylic acid*) eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine Doppelstrang-RNA (dsRNA), bestehend aus einem poly(I)- und einem poly(C)-Strang. Wie auch virale dsRNA initiiert poly I:C über Aktivierung von TLR3 und RLR eine antivirale Signalkaskade [131, 132].

Die Transfektion von poly I:C erfolgte in 24-Well-Platten. Nachfolgend ist der Ansatz pro einzelner 24-Well aufgeführt; dieser wurde bei Versuchen entsprechend hochskaliert.

2 µl poly I:C (100 ng/ µl) wurden in 100 µl OptiMEM gelöst und vorsichtig durchmischt. Daraufhin erfolgte die Zugabe von 1 µl RNAiMax. Das Gemisch wurde erneut vorsichtig invertiert und anschließend für 20 min bei RT inkubiert. Zur Transfektion wurde das fertige Gemisch dann tröpfchenweise in das Well gegeben. Dieses war mit 500 µl Medium gefüllt, so dass sich final eine Konzentration von 333 ng/ ml poly I:C pro 24-Well ergab.

2.2.20 VSV-Infektionsassays

Um die Zytokinantwort nach Infektion mit *Vesicular Stomatitis Virus* (VSV) bestimmen zu können, wurden zuerst $1,5 \times 10^4$ MEF LoxP CRIF1 Tet-On-Cre +/- 4 µg/ ml Doxycyclin in 500 µl DMEM in 24-Well Platten gesetzt. Nach drei Tagen erfolgte die Infektion mit VSVM51R in einer MOI von 1 oder 5. Dazu wurden die Zellen zuerst mit PBS gewaschen, dann die Viren in OptiMEM für eine Stunde bei 37° C zugegeben. Nach einer erneuten PBS-Waschung wurden die Zellen wieder in DMEM kultiviert. Sechs Stunden später konnte der Überstand abgenommen und mittels ELISA analysiert werden.

2.2.21 Viraler Entry

Zur Evaluierung des viralen *Entry* wurden $1,5 \times 10^5$ MEF LoxP CRIF1 Tet-On-Cre +/- 4 µg/ ml Doxycyclin in 3 ml DMEM in 6-Well-Platten gesetzt. Drei Tage später erfolgte die Infektion mit VSVM51R in einer MOI von 25. Dabei wurde zuerst das alte Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend das Virus in 1 ml OptiMEM pro Well zugegeben. Die Inkubation erfolgte anschließend für eine Stunde bei 37° C. Anschließend wurde das Infektionsmedium entfernt, die Zellen erneut mit PBS gewaschen, für eine weitere Stunde in 1 ml DMEM kultiviert, dann mittels Trypsin von den Wells getrennt und in Laemmli-Puffer lysiert.

2.2.22 VSV-GFP-Konfokalmikroskopie

Zur Analyse der Dynamik einer VSV-Infektion mittels Konfokalmikroskopie wurde ein konstitutiv GFP exprimierender VSVM51R Virusstamm verwendet. 2×10^4 MEF LoxP CRIF1 Tet-On Cre +/- 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin wurden in 250 μl DMEM in einer $\frac{1}{4}$ 35 mm Disk gesetzt. Vier Tage später erfolgte nach Abnahme des alten Mediums und Waschen mit PBS die Infektion mit einer MOI von 1 für eine Stunde bei 37° C. Anschließend wurde nach einem erneuten PBS-Waschvorgang wieder DMEM zugegeben und die Zellen bei 37° C und 5 % CO₂ im Konfokalmikroskop analysiert. Es wurden pro Well vier gleichartig konfluente Bildbereiche festgelegt, die automatisch alle 30 Minuten neu aufgenommen wurden.

2.2.23 VSV-GFP-FACS

Um exakte quantitative Aussagen über VSV-Infektionen aufstellen zu können wurden entsprechend mit GFP exprimierendem VSV infizierte Zellen auch in der Durchflusszytometrie untersucht. Dazu wurden $3,5 \times 10^4$ MEF LoxP CRIF1 Tet-On Cre +/- 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Doxycyclin in 500 μl DMEM in 12-Well Platten gesetzt. Drei Tage später erfolgte die Infektion mit VSVM51R in einer MOI von 1. Nach 20 Stunden wurden die Zellen zur Inaktivierung der Viren für 30 min unter UV-Licht gegeben, anschließend mit Trypsin von den Wells gelöst, mit PBS gewaschen (dabei Zentrifugation mit 400 g für 5 min), schließlich in 300 μl PBS gelöst und im Durchflusszytometer untersucht.

2.2.24 Enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Proteinmengen von IP-10 als Marker der antiviralen Immunantwort im Zellüberstand wurde ein „sandwich“ ELISA angewandt (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Dabei wird zuerst eine 96-Well-Platte mit Antikörpern gegen murines IP-10 (ein somit immobilisierter, so genannter *Capture*-Antikörper) beschichtet. Anschließend werden die Zellüberstände sowie eine Referenzlösung hinzugegeben und das enthaltene IP-10 konnte an den *Capture*-Antikörper binden. In einem zweiten Schritt wird daraufhin ein mit Biotin konjugierter anti-Maus-IP-10 Antikörper (der *Detection*-Antikörper) hinzugegeben, der ebenfalls das enthaltene murine IP-10 bindet. In einem dritten Schritt erfolgt die Zugabe von Streptavidin-*horseradish peroxidase conjugate* (SAv-HRP), welches an den Biotin-konjugierten *Detection*-Antikörper bindet. Diese SAv-HRP katalysiert abschließend nach Zugabe der entsprechenden Substrate (Tetramethylbenzidine und Wasserstoffperoxid) eine Farbreaktion, die photometrisch über Absorptionmessungen detektiert werden konnte. Die methodische Durchführung inklusive aller erforderlichen Waschschriffe erfolgte gemäß den Anweisungen im Protokoll des Herstellers.

2.2.25 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese und Western Blot

Mittels Gelelektrophorese können aus Zelllysaten gewonnene Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt [133] und anschließend im Western Blot mittels spezifischer Antikörper und Chemolumineszenz detektiert werden [134]. Diese Methoden zur Detektion spezifischer Proteine erfolgen nach standardisierten Protokollen der Arbeitsgruppe.

Zu Beginn wurden Proben mit 1x Laemmli-Puffer lysiert (95° C für 5 min im Tischrüttler bei maximaler Stärke). Zur Auftrennung der Lysate nach Proteingrößen kamen Gele mit 10 % Acrylamidanteil zur Anwendung. Die Gel-Kammern wurden mit je 20 µl der Proben beladen; diese wurden vorher im Verhältnis 1:1 mit *Loading* Puffer gemischt. Die Auftrennung erfolgte initial für 20 min bei 100 Volt (V), anschließend wurde sie bei 180 V fortgeführt. Daraufhin konnte der Transfer auf die Membran mittels Transferpuffer und 100 V Spannung (circa 90 min) im Western-Blot-Verfahren stattfinden. Direkt danach wurden die Membranen mit 5 % Milch in TBS-Tween für mindestens 60 min bei RT geblockt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte über Nacht bei 4° C, alternativ auch bei RT. Der Primärantikörper wurde 1:2000 in 10 ml BSA verdünnt (ergänzt um 100 µl 1 % Natriumacid-Lösung). Am folgenden Morgen wurde die Membran mindestens dreimal für fünf Minuten mit TBS-Tween gewaschen (im Schüttler bei 200-400 rpm). Daraufhin konnte die Zugabe des *Horseradish peroxidase*-gekoppelten Sekundärantikörpers erfolgen (Konzentration 1:2000 in 10 ml BSA). Nach gut einer Stunde Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran erneut dreimal gewaschen und anschließend mit 1,5 ml „*SuperSignal West Pico Chemiluminescent*“⁸ benetzt. Dadurch konnten die Proteinbanden mittels Chemolumineszenz im „LAS 4000 mini“ dargestellt werden.

2.2.26 Quantitative *Real-Time* RT-PCR

Zahlreiche Versuche in der vorliegenden Arbeit basieren auf der Ermittlung der Expression relevanter Gene der Immunabwehr unter verschiedenen Bedingungen sowie deren Vergleich miteinander. Die quantitative *Real Time* Reverse Transkription PCR (RT-PCR) ermöglicht dies durch die Detektion und gleichzeitige Quantifizierung der mRNA einer Probe. Hierzu wurde aus Zell-Lysat zunächst die Gesamt-RNA unter Verwendung des „*peqGOLD Total RNA Kit*“ (Fa. PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, D) gemäß Protokoll des Herstellers isoliert, gereinigt und in ddH₂O gelöst. Zur Spezifizierung auf die für die Translation relevante mRNA wurde anschließend mittels zum poly-A-Schwanz der mRNA kompatiblen oligo-dT-Primern die mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben.

⁸ Dafür müssen jeweils 750 µl der „*Stable Peroxide Solution*“ sowie der „*Luminol/Enhancer Solution*“ miteinander gemischt werden. Diese Arbeitslösung wird dann auf die Membran aufgetragen..

cDNA-Umschrieb:

1 µg	RNA
4 µl	5x Reverse Transkriptase Puffer
2 µl	dNTP Mix 10 mM
2 µl	Oligo dT18
0,5 µl	RiboLock RNase Inhibitor
0,2 µl	Reverse Transkriptase 10000U
ddH ₂ O ad 20 µl	

Der Umschrieb erfolgte bei 42° C für 60 min gefolgt von einer Enzymaktivierung bei 70° C für 10 min und abschließender Kühlung auf 4° C.

Diese cDNA konnte dann unter Verwendung der *Real-Time* PCR detektiert, amplifiziert und quantifiziert werden. Die Polymerase Kettenreaktion läuft dabei vollkommen regulär ab mit zwei Primern und einer Polymerase mit entsprechender Pufferlösung. Die Quantifizierung gelingt mit Hilfe von Hydrolysierungs-Sonden. Dabei bindet eine mit einem Fluorochrom-Donor markierte DNA-Sonde an eine spezifische Stelle der Ziel-cDNA. Die abgegebene Fluoreszenz wird allerdings von einem an derselben Sonde in unmittelbarer Nähe platzierten Fluorochrom-Akzeptor aufgenommen und dadurch maskiert. Im Zuge der Amplifizierung der cDNA wird die Sonde jedoch durch die 5'-Nuklease-Aktivität der Polymerase gespalten. Die dabei stattfindende Trennung von Donor und Akzeptor ermöglicht dem Fluorochrom-Donor schließlich die Fluoreszenzabgabe. Somit kann die Zunahme des PCR-Produktes durch Messung der Fluoreszenz detektiert werden.

qPCR-Analyse:

100 ng	cDNA
10 µl	KAPA PROBE <i>Fast Universal</i>
2x 0,4 µl	Primer
0,2 µl	Sonde
ddH ₂ O ad 20µl	

Die Auswahl der Primer und dazugehörigen Sonden erfolgte gemäß den Vorgaben der *Roche Universal Probe Library*, unter Zuhilfenahme der *Roche ProbeFinder Assay Design Software*. Die Ergebnisse wurden als relative Quantifizierung dargestellt. Dazu wurde das *Housekeeping-Gen* Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) mitbestimmt und die gewünschten Zielgene diesem gegenüber in Bezug gesetzt.

2.2.27 Messung der zellulären LDL-Aufnahme

Zur quantitativen Bestimmung der *Low Density Lipoprotein* (LDL) - Aufnahme in MEF wurde der „ab133127 – *LDL Uptake Assay*“ (Fa. Abcam, Cambridge, UK) verwendet. Der Versuchsaufbau orientierte sich dabei an den im Herstellerprotokoll gemachten Angaben. In einer 6-Well Platte wurden 5×10^4 MEF *LoxP CRIF1 Tet-On Cre* in 2 ml DMEM gesetzt. 24 Stunden später erfolgte die Inkubation der Zellen mit 4 μ g/ml Doxycyclin oder Kontrollmedium. Nach weiteren 72 Stunden wurde das Medium abgenommen, durch 1 ml/ Well „*LDL-DyLight 549 working solution*“ ersetzt und die Zellen anschließend für weitere vier Stunden inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte ein Mediumwechsel auf PBS und die Analyse der Zellen am Konfokalmikroskop. Dabei wurden zuerst - noch ohne Fluoreszenzdetektion - 10 *Regions of Interest* (ROI) pro Bedingung festgelegt (*CRIF1 +/+* beziehungsweise *CRIF1 -/-*). Ausschlaggebend dafür waren vergleichbare Zellzahl und -form in jeder ROI. Dadurch konnte im Anschluss weitgehend objektiv die durchschnittliche Anzahl der LDL-positiven Zellen pro ROI gezählt werden. Die Exzitation erfolgte bei 540 nm, die Messung der Emission bei 570 nm.

2.2.28 Quantifizierung des zellulären Proteingehaltes: *Bradford-Assay*

Um den Zellproteingehalt zwischen verschiedenen Versuchsbedingungen vergleichen zu können wurde ein so genannter *Bradford Protein Assay* durchgeführt, basierend auf den Eigenschaften des Farbstoffes „Coomassie Brilliant Blue G-250“. Dieser zeigt bei Bindung an Proteine einen Farbwechsel von rot nach blau. Die methodische Durchführung richtete sich dabei nach dem Protokoll des Herstellers Bio-Rad.

2.2.29 Darstellung der Zellviabilität mittels *CellTiter Blue Assay*

Um eine Untersuchung der Zellviabilität *in vitro* durchführen zu können, fand das *CellTiter Blue Assay* Anwendung. Dabei wird durch den Indikator-Farbstoff Resazurin eine Abschätzung des metabolischen Status der Zelle als Surrogat für deren Viabilität vorgenommen. Metabolisch kompetente Zellen sind in der Lage, Resazurin zu Resorufin zu reduzieren. Dies kann durch die spezifischen Spektraleigenschaften des Farbstoffes (Farbwechsel bei Reduktion von blau zu pink) quantifiziert werden. Zur Versuchsdurchführung wurden 20 μ l des Reagenzes in 500 μ l DMEM pro 24-Well gegeben. Nach circa 20-30 min erfolgte die Quantifizierung der Fluoreszenz bei 530 nm Exzitation und 590 nm Emission.

2.2.30 *Seahorse extracellular flux analyzer*: Messung des Sauerstoffverbrauchs in Zellkultur

2.2.30.1 Grundlegende Prinzipien

Um den Sauerstoffverbrauch eukaryotischer Zellen *in vitro* zu messen, wurde der XF96 *Analyzer* der Fa. „Seahorse Bioscience“ verwendet. Durch die Echtzeit-Bestimmung von gelöstem Sauerstoff und pH-Wert-Messung des Mediums der Zellen über eine Biosensoreinheit mittels optischer Fluoreszenz ermöglicht der XF96 *Analyzer* die unmittelbare Detektion von Veränderungen des extrazellulären Mediums, hervorgerufen durch intrazelluläre Stoffwechselprozesse. Dabei können theoretisch sowohl die in den Mitochondrien ablaufende oxidative Phosphorylierung als auch die zytoplasmatische Glykolyse evaluiert werden. Die erste Ableitung des extrazellulären Sauerstoffgehaltes über die Zeit wird als *Oxygen Consumption Rate* (OCR) dargestellt und dient mittelbar als Parameter zur Bestimmung der Aktivität der Atmungskette. Die *Extracellular Acidification Rate* (ECAR) als erste Ableitung des pH-Wertes über die Zeit soll dagegen als Surrogat für die glykolytische Aktivität der untersuchten Zellen dienen [131, 135].

2.2.30.2 Experimentelle Vorgehensweise

Zur Untersuchung der MEF mittels des XF96 *Analyzers* wurde zu Beginn die Sensorplatte (XF *Extracellular Flux Analyzer Kit*) mit 200 μl XF Calibrant pro Well rehydriert und anschließend in den CO_2 -freien Inkubator der Seahorse "Prep-Station" gegeben. In die Seahorse XF96 Zellkulturplatte wurden $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well in 80 μl Seahorse Präparationsmedium gesetzt. Die Außenwells an den vier Ecken der Platte dienen später als Blank-Werte und dürfen daher nur mit Medium gefüllt werden. Die Platte mit den Zellen wurde abschließend in einen regulären Brutschrank gegeben.

24 Stunden später erfolgte die Durchführung der Messung. Nach initialem Reinigen des Systems mit Ethanol, Wasser und Analysemedium wird die Zellkulturplatte in die Seahorse "Prep-Station" gegeben. Diese führte vollautomatisch einen Mediumwechsel zu 200 μl Analysemedium pro Well durch. Die Sensorplatte wurde während des Mediumwechsels der Zellplatte mit den erforderlichen Stressoren beladen. Dabei handelt es sich um 20 μM Oligomycin in 20 μl Volumen in Port A, 20 μM FCCP in 22 μl Volumen in Port B sowie jeweils 25 μM Rotenon und Antimycin A in zusammen 25 μl Volumen in Port C. Die Stressoren wurden entsprechend in Analysemedium verdünnt, die Zugabe zum Zellmedium während der Messung erfolgte dann per Druckluft. Aus den beschriebenen Volumen- und Molaritätsangaben ergibt sich während der Messung eine 1:10 Verdünnung der Stressoren, so dass die Arbeitskonzentrationen der Substanzen bei 2 μM für Oligomycin und FCCP sowie 2,5 μM für Rotenon und Antimycin A liegen.

Nach erfolgter Beladung mit den Stressoren wurde die Sensorplatte zur automatischen Kalibrierung der Sensoren in das Analysegerät gegeben. Anschließend konnte die Zellkulturplatte in den

XF 96 *Analyzer* eingesetzt werden. Nach einem Equilibrierungsschritt begann die Messung entsprechend der vorher festgelegten Parameter. Für den Basalwert - vor Zugabe der Stressoren - wurden im verwendeten CRIF1-Protokoll sieben Messpunkte aufgenommen, wobei jeder Messpunkt aus vier Minuten Mischen des Mediums und vier Minuten Messung mittels optischem Biosensor bestand. Nach Injektion von Port A folgte dreimaliges Mischen und Messen (wieder jeweils für vier Minuten), ebenso nach Injektion von Port B und C. Im Anschluss an die Messung konnten die verwendeten Zellen mittels BCA-Assay zueinander normiert werden.

2.2.30.3 Analyse der gewonnenen Daten

Das letzte OCR-Basalleve vor Zugabe etwaiger Stressoren ist mit der basalen Zellatmung gleichzusetzen. Durch Zugabe von Oligomycin wird die ATP-Synthase blockiert, dadurch verringert sich die Aktivität der vorgeschalteten Atmungskettenkomplexe, da der elektrochemische Protonengradient unverändert bleibt. Die Differenz zum Basalwert ist somit ein Parameter für die ATP-Produktion der Zelle. Mit der im Folgenden stattfindenden Zugabe von FCCP wird eine Porenbildung der inneren mitochondrialen Membran ausgelöst. In der Folge kann der elektrochemische Wasserstoffprotonengradient auch abseits der blockierten ATP-Synthase in die Matrix der Mitochondrien strömen. Dadurch werden die verbliebenden Komplexe der Atmungskette zu größtmöglicher Aktivität gezwungen, um den Gradienten aufrecht zu erhalten. Somit steigt auch der an Komplex IV verursachte Sauerstoffverbrauch maximal an. Die Messwerte nach FCCP-Zugabe sind somit ein Surrogat für die maximal mögliche Zellatmung. Antimycin A und Rotenon schließlich sorgen über die Inhibition der Komplexe III beziehungsweise I für einen kompletten Abbruch der Aktivitäten der Atmungskette. Der Sauerstoffverbrauch fällt daher auf einen Minimalwert, der mit dem nicht-mitochondrialen Sauerstoffverbrauch gleichzusetzen ist.

2.2.31 Statistik

Die gezeigten Daten sind - falls nicht abweichend angegeben - dargestellt als Mittelwerte +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Die Normalverteilung der Datensätze wurde *mittels Kolmogorov Smirnov* und *D'Agostino & Pearson* Test überprüft. Zur Bestimmung des Signifikanzniveaus dienten der *one-sample Student's t test* und der *two-tailed Student's t test* bzw. *Mann-Whitney U test*. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen (ns für $p > 0,05$; * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$ und *** für $p < 0,001$). Die Ermittlung der Signifikanz erfolgte mittels *GraphPad Prism 5*.

3 Ergebnisse

3.1 Der *knock-out* von CRIF1 durch retrovirale Cre Überexpression führt zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials

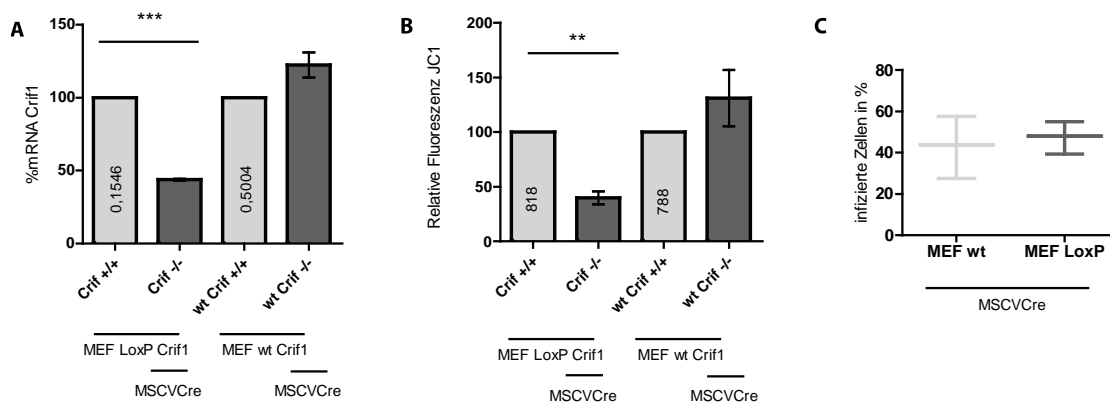
Daten aus unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die im Rahmen einer Virusinfektion über RLRs induzierte Produktion antiviraler Zytokine wie Interferon- β , IP-10 oder TNF- α durch den *knock-out* des mitochondrialen Proteins CRIF1 erheblich beeinträchtigt wird (Lietke, 2015). Es blieb jedoch unklar, ob dies einer direkten antiviralen Funktion von CRIF1 geschuldet ist, oder ob der *knock-out* indirekt einen negativen Effekt auf die antivirale Kapazität der Zelle hat. Koshiba et al. hatten gezeigt, dass das mitochondriale Membranpotential unentbehrlich für die RLR-abhängige Zytokinproduktion mittels des Proteins MAVS ist [24]. Um zu evaluieren, ob dieser Mechanismus in der Funktion von CRIF1 eine entscheidende Rolle spielt, sollten die Auswirkungen des CRIF1 *knock-outs* auf das mitochondriale Membranpotential untersucht werden.

Mithilfe retroviraler Transduktion eines Cre-Rekombinase kodierenden *Murin Stem Cell Virus* wurde die Cre Rekombinase in MEF flx/flx CRIF1 exprimiert (vgl. 2.2.15). Da dieser retrovirale Vektor auch konstitutionell *Green-Fluorescent-Protein*- (GFP) exprimiert, konnte das Maß der Infektion der Zielzellen durch die Determinierung der GFP-positiven Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt werden. Es zeigte sich, dass durch Einsatz dieser Methode sowohl in flx/flx CRIF1 MEF als auch in den Wildtyp (wt) -Kontrollen rund die Hälfte der Zellen erfolgreich transduziert werden konnte (Abbildung 3.1C).

Der dadurcherreichte CRIF1 *knock-out* wurde mittels qPCR auf mRNA-Ebene analysiert. Erwartungsgemäß war in den MEF flx/flx CRIF1 eine deutliche Reduktion der CRIF1-mRNA darzustellen. Die wt-Kontrolle dagegen exprimierte unveränderte oder sogar leicht erhöhte Mengen CRIF1-mRNA (Abbildung 3.1A).

Als Maß zur Beurteilung des Membranpotentials der Mitochondrien sowie mittelbar deren struktureller Integrität wurde eine Färbung mit JC-1 durchgeführt (vgl. 2.2.11). Es konnte hierbei in den MEF flx/flx CRIF1 ein signifikanter Abfall der relativen Fluoreszenz des Farbstoffes nachgewiesen werden. In der wt-Kontrolle hingegen war auch nach Cre-Expression durch retrovirale

Transduktion keine ausgeprägte Veränderung der Messwerte in der FACS-Analyse detektierbar (Abbildung 3.1B).



3.1 CRIF1 - knock-out führt zur Reduktion des Membranpotentials von Mitochondrien in murinen embryonalen Fibroblasten (MEF). MEFs aus Mauslinien mit einem LoxP CRIF1-Genotyp und einem entsprechenden Wildtyp-Stamm wurden mit einem Cre-kodierenden *Murin Stem Cell Virus* transduziert. Vier Tage später wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert und RNA aus ihnen isoliert. **(A)** Quantifizierung der CRIF1-Expression bezogen auf das *house-keeping*-Gen HPRT nach RNA-Isolation und anschließender qPCR. **(B)** JC-1-Färbung und Fluoreszenzbestimmung im FACS zur Beurteilung der Integrität der mitochondrialen Membran. **(C)** Die Transduktionseffizienz wurde durch FACS-Analyse der GFP-positiven Zellen bestimmt. In A und B wurden die Daten jeweils auf die Werte der nicht-transduzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ angegeben. Der Mittelwert der nicht-transduzierten Kontrollen ist in den Balken angegeben. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ für den Vergleich der indizierten Bedingungen.

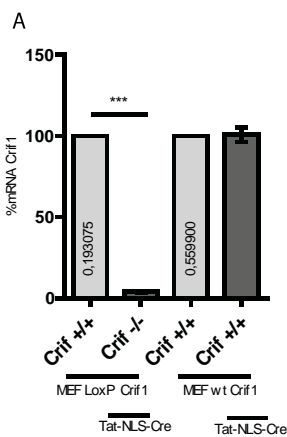
Durch dieses Experiment wurde gezeigt, dass das System der Cre-Expression durch retrovirale Transduktion in MEF flx/flx CRIF1 zu einem CRIF1 *knock-out* in den infizierten Zellen führt. Zudem zeigte sich, dass der Verlust von CRIF1 zu einer Reduktion des Membranpotentials der Mitochondrien führt.

Gleichwohl hat das hier angewandte System einen Nachteil: die logische Konsequenz aus den Ergebnissen dieses Versuches wäre, zu untersuchen, ob die Verminderung des Membranpotentials in diesen Zellen auch die in der Literatur beschriebenen Folgen für die MAVS-abhängigen Signalwege aufweist. Da allerdings bereits für die im Rahmen des *knock-outs* angewandte retrovirale Transduktion mutmaßlich erhebliche immunstimulatorische Wirkungen auf die Zellen angenommen werden müssen, schien es unsicher, ob mit diesem System valide Aussagen über die Konsequenzen eines CRIF1 *knock-outs* auf die antiviralen Fähigkeiten der untersuchten Zellen getroffen werden können.

3.2 CRIF1 *knock-out* durch Tat-NLS-Cre Transduktion

3.2.1 Tat-NLS-Cre Transduktion führt zur vollständigen Deletion von CRIF1

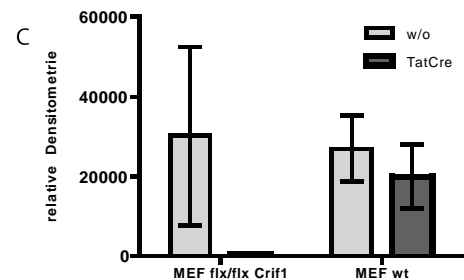
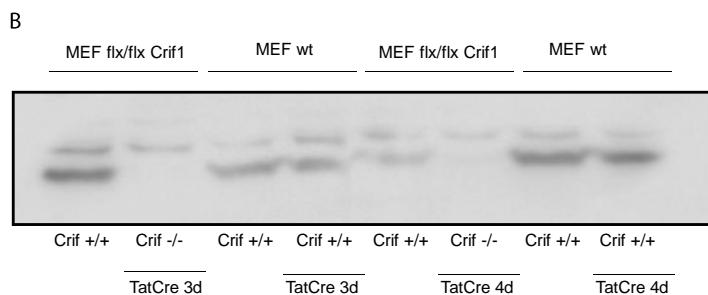
Um die vorangehend erläuterte Problematik eines retroviralen Systems zur Untersuchung antiviraler Effekte zu umgehen, etablierten wir ein weiteres System des konditionellen CRIF1 *knock-outs*, in dem die Cre-Rekombinase durch direkte Tat-NLS-vermittelte Proteintransduktion in MEF mit einem LoxP CRIF1-Genotyp eingeschleust wurde (vgl. 2.2.16). Um dessen Funktionalität zu überprüfen, erfolgte initial die Testung der CRIF1-mRNA-Level 72 Stunden nach erfolgreicher Proteintransduktion. In der qPCR-Analyse war dabei ein vollständiger *knock-out* nachweisbar (Abbildung 3.2A). Dieser *knock-out* war auch im Western Blot, drei und vier Tage nach Transduktion von TAT-NLS-Cre, qualitativ und quantitativ darstellbar (Abbildung 3.2B/C). Dadurch bestätigte sich die Funktionalität des Systems mit einer gegenüber der retroviralen Cre-Expression erheblich höheren Transduktionseffizienz.



3.2 Nachweis des CRIF1-Knockouts nach Tat-NLS-Cre Transduktion auf mRNA-Level und Proteinebene. (A)

MEF flx/flx CRIF1 und wt-Zellen wurden mit 0,25 μ M TAT-NLS-Cre transduziert. Drei Tage später erfolgten RNA-Isolation, cDNA-Umschrieb und Bestimmung der CRIF1 Expression im Vergleich zum *house-keeping*-Gen HPRT per *Real-Time* PCR-Analyse. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-transduzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=12 angegeben. Der Mittelwert der nicht-transduzierten Kontrollen ist in den Balken angegeben. *** p < 0.001 für den Vergleich der indizierten Bedingungen.

(B) 72 Stunden und 96 Stunden nach Transduktion von 0,25 μ M TAT-NLS-Cre in MEF flx/flx CRIF1 wurden die Zellen lysiert und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Daraufhin erfolgte ein Western Blot mit α CRIF1-Antikörper. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. (C) Densitometrische Quantifizierung der Banden aus Abbildung 3.3B. Darstellung der zusammengefassten densitometrischen Ergebnisse von d3 und d4.

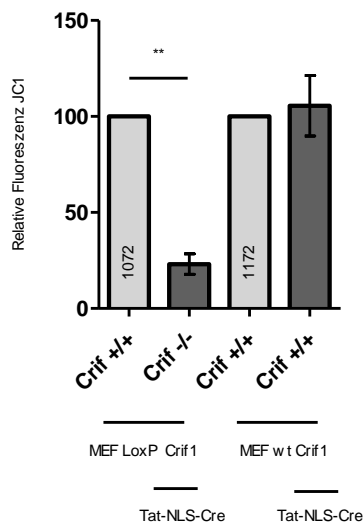


3.2.2 Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials nach CRIF1 *knock-out*

Wie in 3.1 gezeigt, führte der durch Cre-Expression mittels retroviraler Transduktion vermittelte *knock-out* von CRIF1 bereits zu einem deutlichen Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials.

Da die durch rekombinantes Tat-NLS-Cre vermittelte Deletion von CRIF1 eine höhere Effizienz als das retrovirale Modell zeigte, war die Erwartung, dass die Verringerung des mitochondrialen Membranpotentials qualitativ zumindest vergleichbare Ergebnisse zeigen würde.

Um dies zu untersuchen, wurde die relative Fluoreszenz von MEF *LoxP* CRIF1 und wt MEF nach Tat-NLS-Cre-Transduktion durch Färbung mit dem membranpermeablen Carbocyanin-Farbstoff JC-1 bestimmt. Dabei zeigte sich in der Tat eine - noch stärker als im MSCV-Cre vermittelten *knock-out* - ausgeprägte und signifikante Abnahme des Fluoreszenz-Signals in den CRIF1 *-/-* Zellen. Die wt-Kontrolle hingegen wies keine relevant veränderten Fluoreszenzlevel auf (Abbildung 3.3). Damit führt der Tat-NLS-Cre vermittelte *knock-out* von CRIF1 zu einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials.



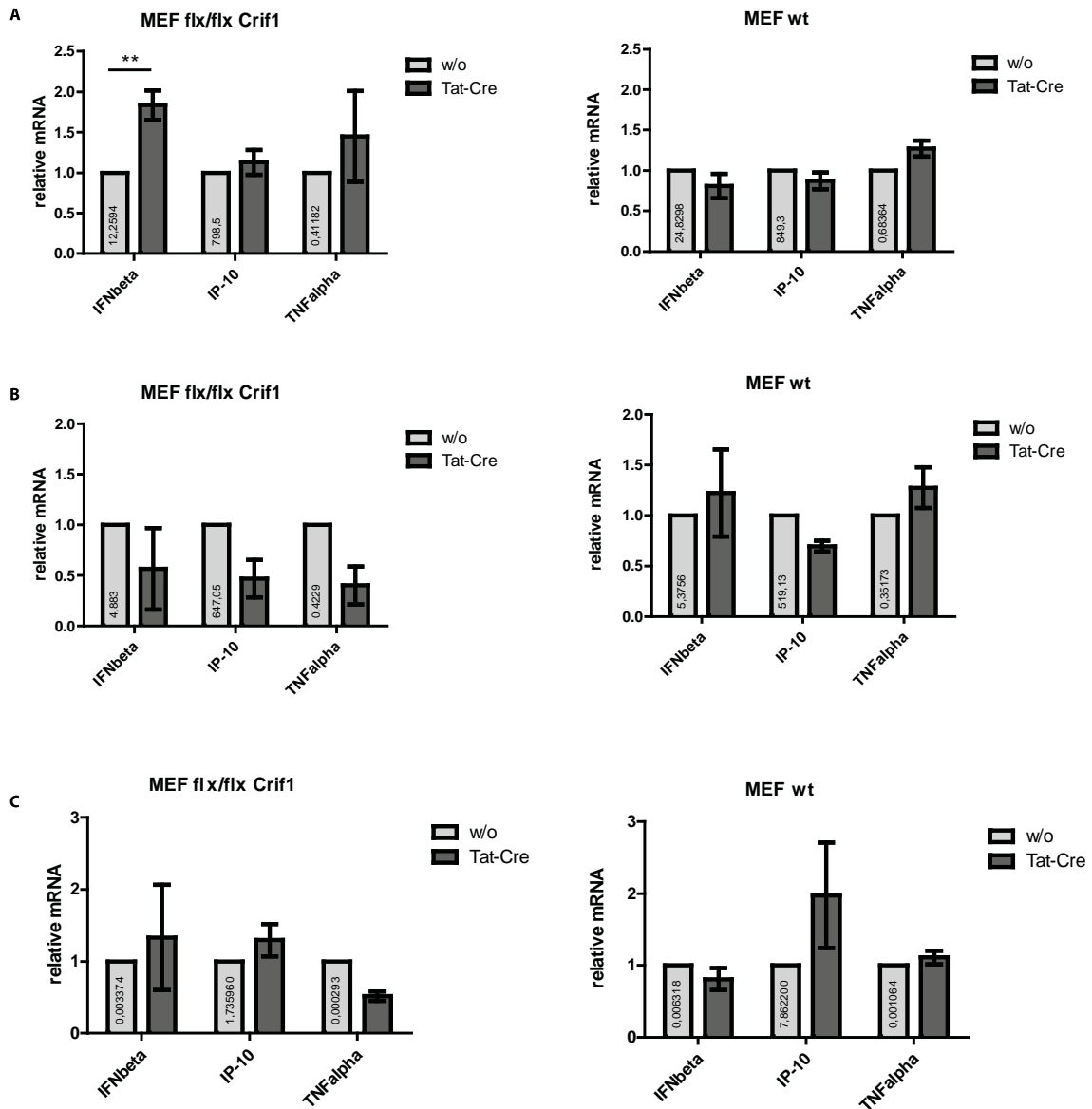
3.3 Relative JC-1 Fluoreszenz nach Tat-NLS-Cre Transduktion. MEF *flx/flx* CRIF1 und MEF wt wurden mit 0,25 μ M TAT-NLS-Cre transduziert. Vier Tage später erfolgten zuerst die Färbung mit JC-1 und dann eine FACS-Analyse zur Bestimmung des Fluoreszenzniveaus als Indikator für das Membranpotential der Mitochondrien. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-transduzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ angegeben. Die Mittelwerte der nicht-transduzierten Kontrollen sind in den Balken angegeben. ** $p < 0.01$ für den Vergleich der indizierten Bedingungen.

3.2.3 Verstärkte Interferon- β Expression nach 12-stündiger poly I:C Stimulation unter CRIF1 *knock-out*

Es konnte bereits durch andere Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass die RLR-basierte angeborene Immunantwort auf RNA-Viren abhängig ist vom mitochondrialen Membranpotential [24]. Um die Auswirkungen des bei CRIF1 *knock-out* verringerten Membranpotentials auf diesen antiviralen Signalweg zu untersuchen, wurden MEF flx/flx CRIF1 und wt-Kontrollen mit dem synthetischen Liganden für MDA-5 poly I:C, komplexiert mit Lipofectamin, behandelt.

Dabei zeigte sich nach 12-stündiger Stimulation ein signifikanter Anstieg der Interferon- β mRNA in Abwesenheit von CRIF1. Die mRNA-Level von IP-10 und TNF- α zeigten in diesen Experimenten nur einen geringfügigen nicht-signifikanten Anstieg. In Wildtyp-MEFs hatte die Zugabe des Tat-NLS-Cre-Proteins keine Auswirkung auf die Zytokinproduktion (Abbildung 3.4A). Nach 24-stündiger Inkubation mit poly I:C wiederum (Abbildung 3.4B) war bei den CRIF1 $-/-$ Zellen eine Tendenz zum Rückgang der Expression von IFN- β , IP10 und TNF- α darstellbar, wenngleich ohne statistische Signifikanz. Die wt-Kontrollen zeigten nach Tat-NLS-Cre-Vorbehandlung keine konsistenten Veränderungen im Expressionsprofil der überprüften antiviralen Zytokine.

Ohne Immunstimulation zeigten die MEF nur eine geringe Basal-Expression der untersuchten Zytokine ohne konsistente Differenz zwischen Zellen mit und ohne CRIF1 beziehungsweise mit und ohne Tat-NLS-Cre (Abbildung 3.4C).



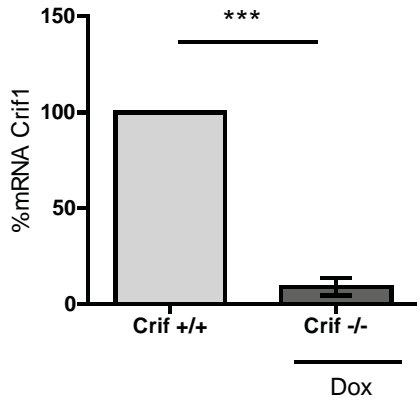
3.4 Verstärkte Interferon- β Expression nach 12-stündiger poly I:C Stimulation unter CRIF1 *knock-out*. MEF flx/flx CRIF1 und MEF wt wurden zwei Tage nach Transduktion von 0,25 μ M Tat-NLS-Cre für 12 (A) oder 24 (B) Stunden mit 333 ng/ml poly I:C transfiziert oder für 12 Stunden mit einem Kontrollgemisch aus OptiMEM und Lipofectamin ohne poly I:C behandelt (C). Daraufhin folgten RNA-Isolation, cDNA-Umschrieb und qPCR-Analyse zur Darstellung der relativen Expressionslevel von Interferon- β , IP-10 sowie TNF- α im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-transduzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=5 (A), n=3 (B) und n=4 (C) angegeben. Die Mittelwerte der nicht-transduzierten Kontrollen sind in den Balken angegeben. ** $p < 0.01$ für den Vergleich der induzierten Bedingungen.

3.3 Erfolgreicher Tet-on Cre vermittelter CRIF1 *knock-out*

Da auch in dem Modell des CRIF1 *knock-outs* mittels Tat-NLS-Cre die Möglichkeit besteht, dass durch die Proteintransduktion die Ergebnisse verfälscht werden könnten, wurde versucht, dieses Problem durch ein stabil-induzierbares System ohne die Notwendigkeit einer Cre-Transfektion/-Transduktion zu umgehen. Unsere Wahl fiel auf ein Cre Expressionssystem unter dem Tet-on Promoter, mit dessen Hilfe durch die Zugabe von Doxycyclin in flx/flx CRIF1 Zellen die CRIF1-DNA aus dem Genom der MEF entfernt und somit ein induzierbares CRIF1-*knock-out*-Modell geschaffen werden kann (Näheres zur Funktionsweise siehe 2.2.17). Der Verzicht auf einen Transfektions- oder Transduktionsvorgang zum Erreichen der CRIF1-Deletion könnte die immunologischen Interaktions- und Störvariablen minimieren.

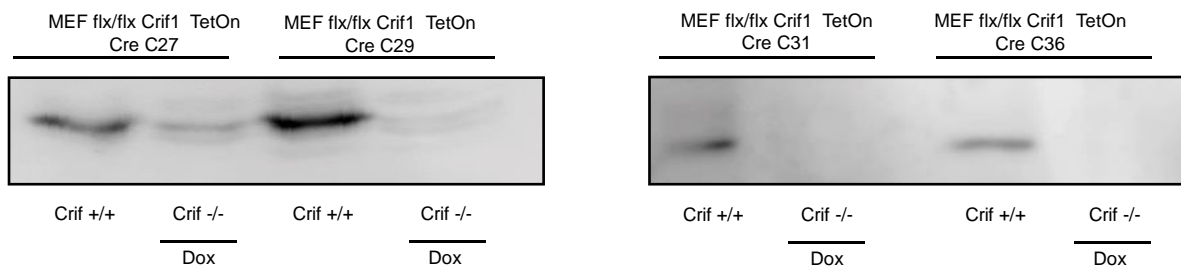
Nach Generierung der entsprechenden Plasmide und deren stabiler Transduktion in flx/flx CRIF1 MEFs, wie im Methodenteil unter 2.2.17 beschrieben, wurde die Funktionsfähigkeit des geschaffenen Doxycyclin-induzierbaren Tet-On Cre Systems zunächst nach Inkubation mit Doxycyclin auf RNA-Ebene mittels qPCR-Analyse auf CRIF1 und HPRT überprüft (Abbildung 3.5A). In den positiven Klonen zeigte sich dabei drei Tage nach Expression der Cre-Rekombinase ein annähernd vollständiger Verlust der CRIF-1 mRNA. In den so positiv gescreenten Klonen bestätigte sich auch auf Protein-Ebene (Abbildung 3.5B/C) ein weitgehend kompletter CRIF1 *knock-out* drei Tage nach der Doxycyclin-Induktion. Vier Klone, die sich auf Protein- und RNA-Ebene als positiv und funktional gezeigt hatten wurden expandiert und für die in der Arbeit angegebenen Versuche verwendet.

A

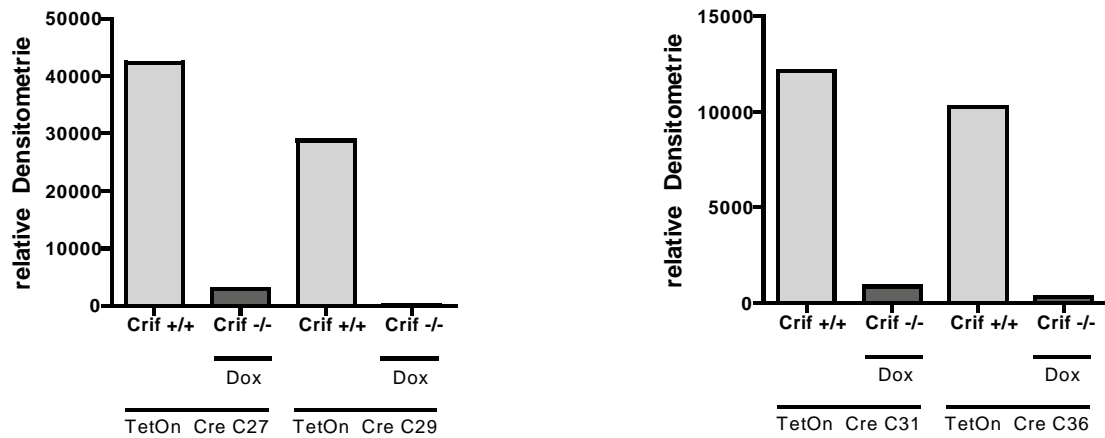


3.5 CRIF1-Knockout durch Doxycyclin-Inkubation des Tet-On Cre Systems auf mRNA- und Proteinebene. (A) Tet-On Cre flx/flx CRIF1 MEF wurden für drei Tage mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Anschließend erfolgte RNA-Lyse, cDNA-Umschrieb und qPCR-Analyse zur Darstellung des relativen Expressionslevels von CRIF1 im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte + SEM von n=15 dargestellt. *** p < 0,001 für den Vergleich der induzierten Bedingungen. **(B)** Vier anhand der qPCR-Daten identifizierte positive Klone (C27, C29, C31 und C36) wurden expandiert und hinsichtlich ihrer Funktionalität auf Proteinebene analysiert. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden vier Tage mit 4µg/ml Doxycyclin inkubiert. Daraufhin folgten laemmli-Lyse und Western Blot mit αCRIF1. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für drei unabhängige Versuche. **(C)** Densitometrische Quantifizierung der Bandenplots.

B



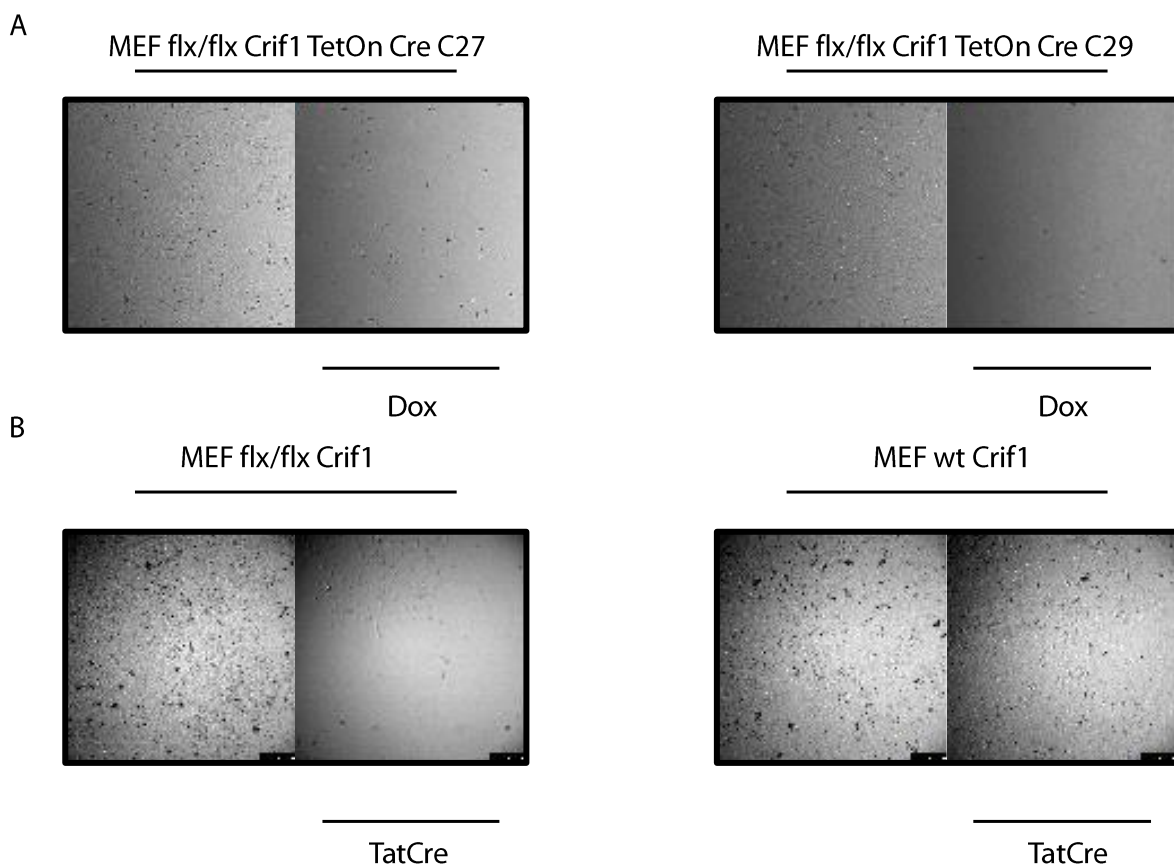
C



3.4 CRIF1 ist unabdingbar für das Überleben von murinen embryonalen Fibroblasten

Kim et al. konnten zeigen, dass die Expression von CRIF1 essentiell für das Überleben von Mäusen ist [111]. Um die vitale Bedeutung dieses Proteins auch in unserem experimentellen Zellkultur-System zu belegen, wurde die Lebensfähigkeit der Maus-Embryofibroblasten in der Zellkultur untersucht.

Zu diesem Zweck wurden zwei Klone des MEF flx/flx Crif1 Tet-On Cre Systems mit Doxycyclin inkubiert. Nach vierzehn Tagen wurden die Zellkulturplatten im Fluoreszenzmikroskop begutachtet und repräsentative Aufnahmen angefertigt. Es zeigten sich in den Doxycyclin-behandelten CRIF1-defizienten Wells lediglich Zelltrümmer und Verschmutzungen, wohingegen sich die Zellen in den Kontrollbedingungen in einem vitalen, konfluenten Zustand befanden (Abbildung 3.6A). Zur weiteren Verifizierung wurde auch das Tat-NLS-Cre Transduktionssystem hinsichtlich der Überlebensfähigkeit der Zellen nach CRIF1 *knock-out* untersucht. Zwölf Tage nach Transduktion zeigte sich in den MEF flx/flx Crif1 Zellen nur mehr eine geringe Restpopulation, die Kontrollbedingungen dagegen waren weiterhin vital und konfluent (Abbildung 3.6B).

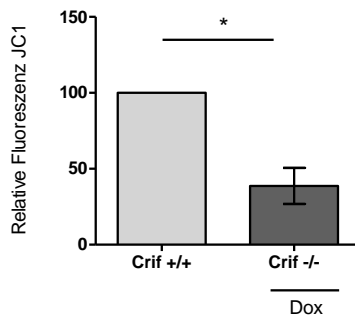


3.6 CRIF1-Knockout führt langfristig zum Untergang der Zellpopulation. (A) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre Zellen wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Alle drei bis vier Tage erfolgten PBS-Waschungen, Medienwechsel und Splittungen der Wells. Vierzehn Tage nach Versuchsbeginn wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop repräsentative Aufnahmen der Wells angefertigt. (B) MEF flx/flx CRIF1 Zellen wurden mit 0,25 µM Tat-NLS-Cre transduziert. Alle drei bis vier Tage erfolgten PBS-Waschungen, Medienwechsel und Splittungen der Wells. Am Tag zwölf post-Transduktion wurden repräsentative fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

3.5 Verlust von CRIF1 führt zu einer Verminderung der Expression der Atmungskettenkomplexe und einer Erniedrigung des mitochondrialen Membranpotentials

3.5.1 Deutlicher Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials nach Tet-On Cre induziertem CRIF1 *knock-out*

Um die Auswirkungen des Fehlens von CRIF1 auf das mitochondriale Membranpotential auch in dem induzierbaren System zu untersuchen, erfolgten nach Doxycyclin-Inkubation eine Färbung mit JC-1 und anschließend eine durchflusszytometrische Analyse. Hierbei konnte in den CRIF1 depletierten Zellen ein signifikant herabgesetztes JC-1 Fluoreszenzniveau ermittelt werden (Abbildung 3.7).



3.7 Tet-On Cre bedingte CRIF1-Deletion führt zu massiver Abnahme des Membranpotentials der Mitochondrien. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Vier Tage später erfolgten zuerst die Färbung mit JC-1 und dann die FACS-Analyse zur Bestimmung des Fluoreszenzniveaus als Indikator für das Membranpotential der Mitochondrien. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=4 dargestellt. * $p < 0.05$ für den Vergleich der induzierten Bedingungen.

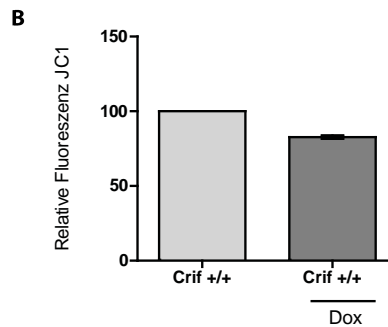
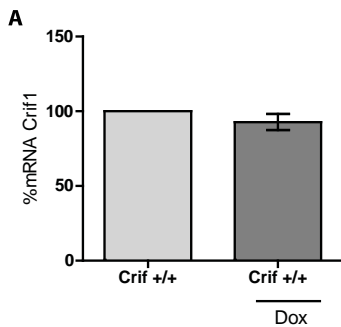
Entsprechend seiner Funktion als Surrogatparameter für die Integrität des mitochondrialen Membranpotentials, kann aus der massiven Reduktion der JC-1 Fluoreszenz eine entsprechende Abnahme des Membranpotentials der Mitochondrien bei Depletion von CRIF1 abgeleitet werden.

3.5.2 Keine Veränderung der CRIF1-Expression und des mitochondrialen Membranpotentials durch das Antibiotikum Doxycyclin

Doxycyclin ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline. Es wirkt bakteriostatisch durch Inhibition der Proteinbiosynthese durch Blockade der Bindungsstelle der Aminoacyl-tRNA an den bakteriellen Ribosomen [136]. Aufgrund der phylogenetischen Ähnlichkeit von Bakterien und Mitochondrien wurde schon früh eine vergleichbare toxische Wirkung von Doxycyclin auf die mitochondriale Proteinbiosynthese vermutet und konnte durch entsprechende Experimente auch nachgewiesen werden [137].

Somit war es für die Evaluierung unseres Doxycyclin-induzierten *knock-out*-Systems erforderlich, einen Einfluss von Doxycyclin auf die Expression von CRIF1 und vor allem auf den Zustand des mitochondrialen Membranpotentials zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden MEF flx/flx CRIF1 ohne vorherige Insertion des Tet-On-Cre Systems mit Doxycyclin inkubiert und

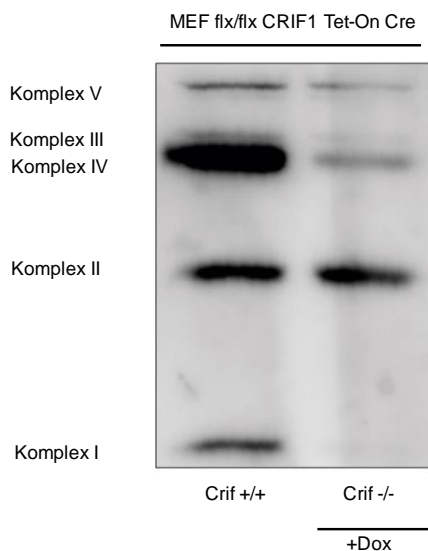
anschließend auf mRNA-Ebene hinsichtlich des CRIF1 *knock-outs* und durch JC-1-Färbung hinsichtlich ihres mitochondrialen Membranpotentials untersucht. In den Analysen zeigten sich unveränderte CRIF1-mRNA-Level sowie ein nur minimal vermindertes JC1-Fluoreszenzniveau (Abbildung 3.8). Damit konnten relevante Beeinflussungen der Mitochondrien durch toxische Effekte des Doxycyclins in den im Rahmen der Experimente verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen werden.



3.8 MEF flx/flx CRIF1 zeigen keine Veränderung der CRIF1-Expression und des mitochondrialen Membranpotentials unter Doxycyclin. MEF flx/flx CRIF1 ohne Tet-On-Cre System wurden für vier Tage mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-inkubierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=2 dargestellt. **(A)** Relatives CRIF1 mRNA Expressionslevel im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT. **(B)** Färbung mit JC-1 und FACS-Analyse zur Beurteilung des Fluoreszenzniveaus.

3.5.3 Verlust der Atmungskettenproteine durch CRIF1-Depletion

Das Membranpotential der Mitochondrien wird durch die Aktivität der Atmungskette erzeugt und aufrechterhalten. In 3.5.1 konnten wir zeigen, dass die Deletion von CRIF1 diesen elektrochemischen Gradienten nachhaltig vermindert. Um die Ursache dieser Veränderung zu ermitteln, überprüften wir die Proteine der Atmungskette auf etwaige quantitative Veränderungen, bedingt durch den CRIF1 *knock-out*. Hierfür wurde ein Western Blot durchgeführt mit einem Antikörpergemisch, das die Atmungskettenkomplexe darstellt (Abbildung 3.9). Dabei zeigte sich ein vollständiger Verlust von Komplex I sowie eine massive Reduktion der Komplexe III, IV und V. Hingegen ist Komplex II keinen Veränderungen unterworfen. Bedeutend ist hierbei die Tatsache, dass bis auf den ausschließlich nukleär DNA-kodierten Komplex II alle weiteren Atmungskettenkomplexe auch mtDNA-kodierte Untereinheiten aufweisen [6]. Es kann somit postuliert werden, dass der *knock-out* von CRIF1 zu einer verminderten Expression aller mtDNA-kodierten Atmungskettenkomplexe führt.



3.9 Depletion von CRIF1 führt zu massiver Reduktion der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V, nicht aber von Komplex II. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden für drei Tage mit 4µg/ml Doxycyclin inkubiert. Daraufhin folgten Lyse der Zellen, Aufnahme in Laemmli-Puffer und Western Blot mit Antikörpergemisch gegen die Atmungskettenkomplexe. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

3.6 Verringerter mitochondrialer Sauerstoffverbrauch nach CRIF1 *knock-out*

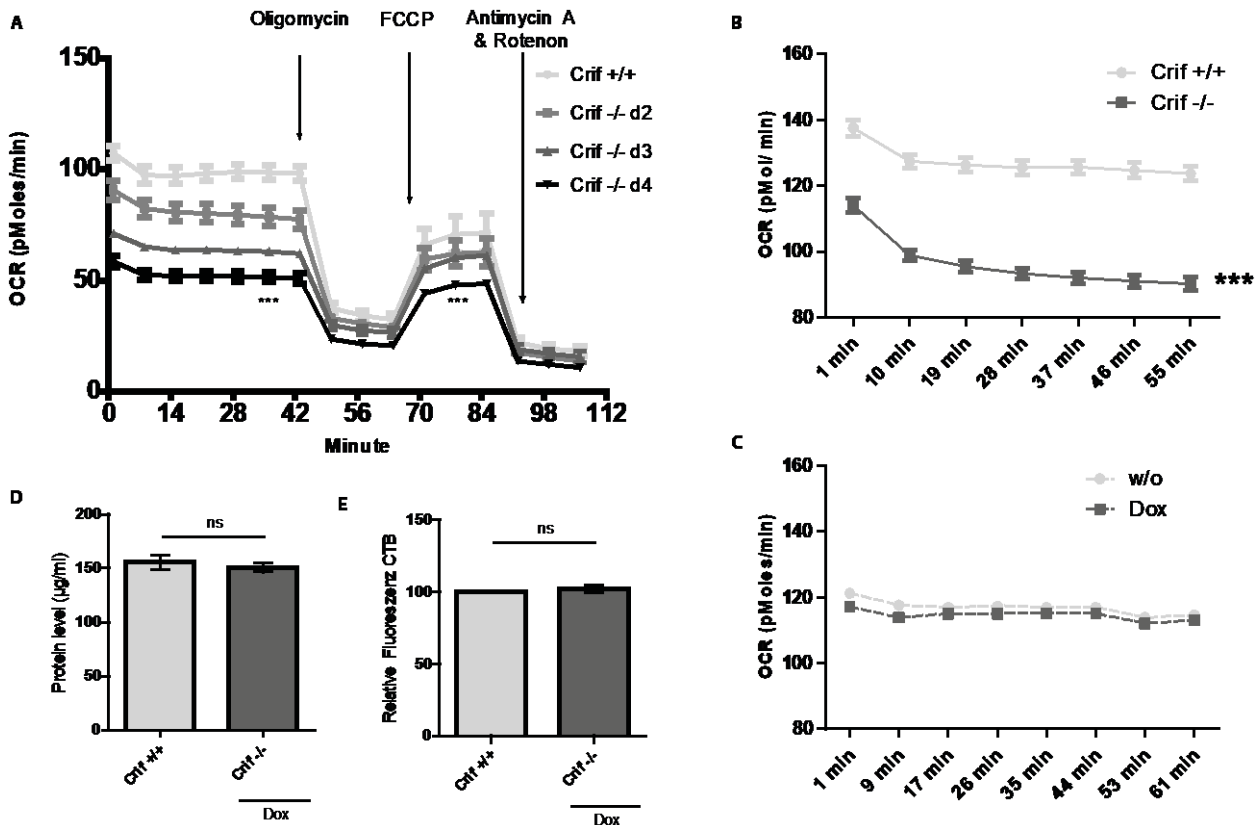
Da die bisherigen Ergebnisse eine verringerte Expression von Atmungskettenkomplexen nach CRIF1 Depletion zeigten, wurde in einem nächsten Schritt die Atmungskettenaktivität unter CRIF1 *knock-out* funktionell untersucht. Dafür wurden MEF LoxP Tet-On Cre mit unterschiedlich lang andauerndem CRIF1 *knock-out* (und Doxycyclin-negative Kontrollen) mit dem *Seahorse XF96 Analyzer* (vgl. 2.2.16) auf die Aktivität ihrer mitochondrialen Atmungskette untersucht.

Abhängig von der Dauer des CRIF1 *knock-outs* wurde ein stetig abnehmender basaler Sauerstoffverbrauch (OCR) nachgewiesen. Die Zugabe von Oligomycin – das durch seine Unterbrechung der ATP-Produktion als Maß des intrinsischen Protonen-Lecks dient – führt zu einer Annäherung der OCR zwischen den einzelnen Bedingungen (allerdings ergibt sich daraus automatisch eine deutliche Reduktion der ATP-Produktion nach CRIF1 *knock-out*.) Auf die Entkoppelung der Atmungskette durch FCCP reagieren die Zellen mit einem Anstieg der OCR, diese zeigt jedoch wieder die bereits im Basallevel darstellbare Abhängigkeit vom CRIF1-Status der Zellen. Durch Antimycin A und Rotenon erfolgt eine vollständige Inhibition der Atmungskette, so dass der minimale Restverbrauch an Sauerstoff der nicht-mitochondrialen Atmung gleichgesetzt werden kann; hierbei wiederum zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Bedingungen mit und ohne CRIF1 (Abbildung 3.10).

Da auch die mitochondriale Proteinbiosynthese durch Doxycyclin gehemmt wird, bedingt durch die Expression von 70S-Ribosomen auch in eukaryotischen Mitochondrien [136], war es erforderlich, die Auswirkungen von Doxycyclin per se auf den Zellstoffwechsel der MEF zu kontrollieren. Zu diesem Zweck wurde der basale Sauerstoffverbrauch von MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre und nativen MEF flx/flx CRIF1 nach Zugabe von Doxycyclin analysiert. Hierbei bestätigte sich zum einen der bereits dargestellte Abfall der OCR im Falle des CRIF1 *knock-outs*. Zum anderen zeigte sich, dass in unserem experimentellen System der grundlegende Sauerstoffverbrauch der MEF LoxP CRIF1 auch unter dem Einfluss von *Doxycyclin* nicht von der Kontrollbedingung differiert (Abbildung 3.10B/C).

Zur weiteren Validierung dieser Ergebnisse erfolgten noch Untersuchungen mittels *Bradfordprotein Assay* und *CellTiter-Blue*, zur Ermittlung des zellulären Proteingehaltes respektive der Zellviabilität. Diese Versuche dienten darüber hinaus auch zur Sicherstellung der quantitativen Vergleichbarkeit der beiden Versuchsgruppen (MEF +/- Doxycyclin) in den *Seahorse*-Messungen. Zu diesem Zweck wurden MEF Tet-On Cre flx/flx CRIF1 nach Beendigung der OCR-Analysen mittels der beiden oben angegebenen Methoden untersucht. Weder die im Bradford Assay erfasste Proteinmenge (Abbildung 3.10D), noch das mit Hilfe des *CellTiter Blue* darstellbare

Fluoreszenzsignal (Abbildung 3.10E) als Maß der Viabilität der MEF unterschied sich zwischen den beiden Versuchsgruppen. Somit war die Vergleichbarkeit der in den *Seahorse*-Messungen eingesetzten Zellzahlen gegeben und die reduzierte OCR Rate ist primär durch das Fehlen von CRIF1 bedingt und nicht indirekt durch eine verringerte Anzahl oder Viabilität der Zellen im Laufe des Experiments verursacht.



3.10 Abnahme des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs nach CRIF1 knock-out (A) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden nach Doxycyclin-induziertem CRIF1 knock-out (4 µg/ml Doxycyclin für die jeweils angegebene Dauer) mittels *Seahorse Extracellular Flux Analyzer* auf ihren Sauerstoffverbrauch (OCR) hin untersucht. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Versuche. *** p < 0.001 für den Vergleich der induzierten Bedingungen zwischen Crif +/+ und Crif -/- d4.

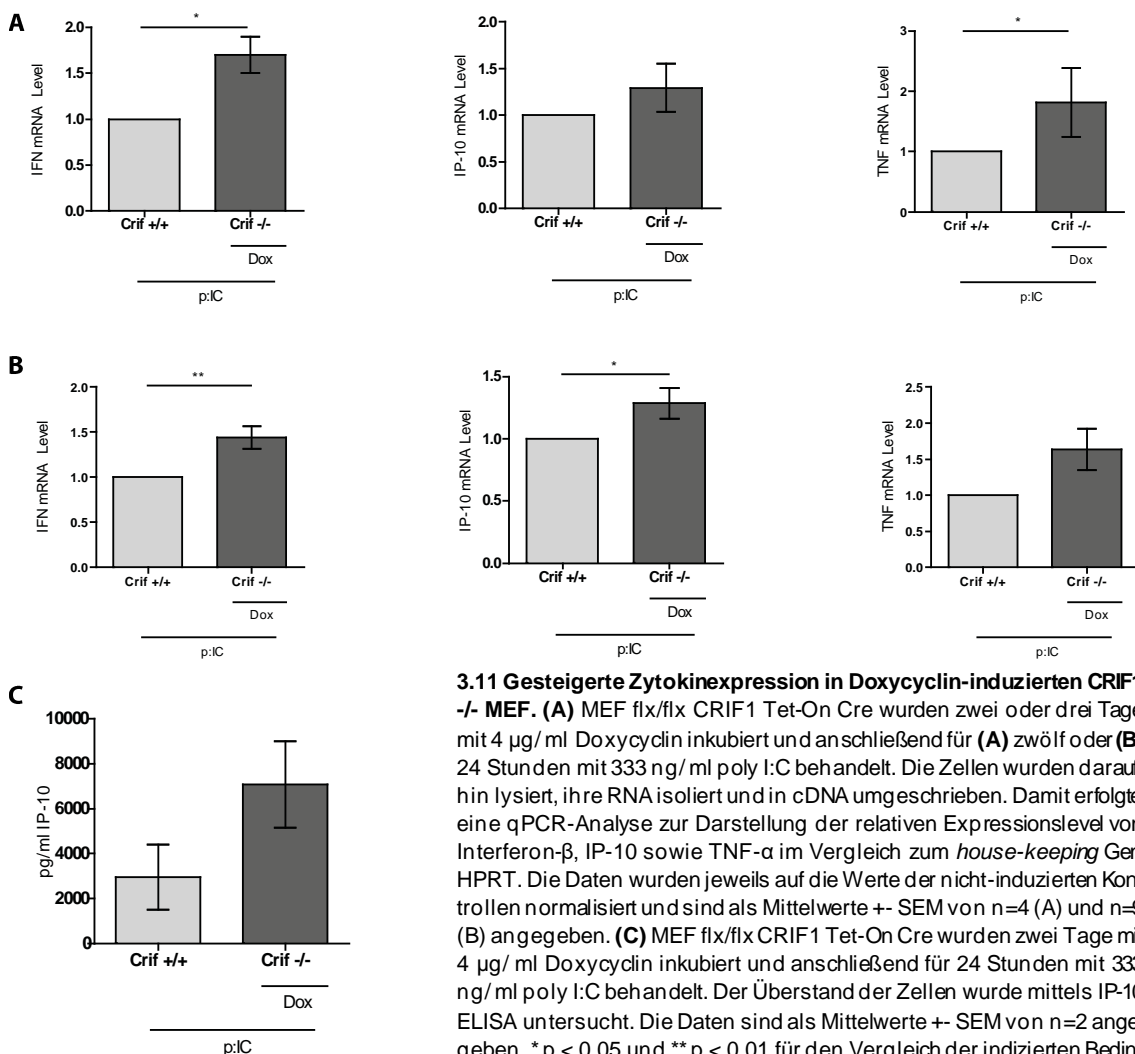
Doxycyclin ist ohne Einfluss auf den mitochondrialen Sauerstoffverbrauch. Zur Kontrolle des metabolischen Einflusses von Doxycyclin wurden neben (B) MEF Tet-On Cre flx/flx CRIF1 auch (C) native MEF flx/flx CRIF1 mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert und nach vier Tagen im *Seahorse Analyzer* hinsichtlich ihres mitochondrialen Sauerstoffverbrauches (OCR) untersucht. Die gezeigten Ergebnisse sind repräsentativ für vier unabhängige Versuche. *** p < 0.001 für den Vergleich der induzierten Bedingungen.

Unveränderte Proteinlevel und Zellviabilität nach OCR-Analyse. Im Anschluss an die Analyse des Sauerstoffverbrauches im *Seahorse XF96* wurden mit denselben Zellen (D) ein *Bradford Assay* zur Quantifizierung der zellulären Proteine sowie (E) eine *CellTiter-Blue*-Analyse zur Darstellung der Zellviabilität durchgeführt.

3.7 Verstärkte Immunantwort in CRIF1 -/- MEF

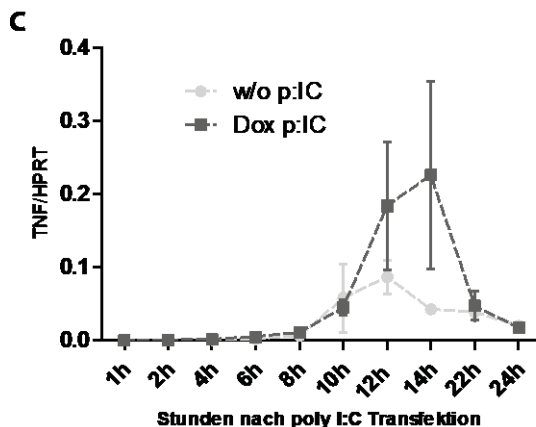
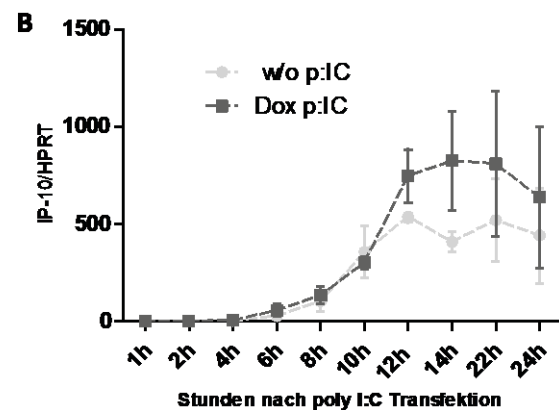
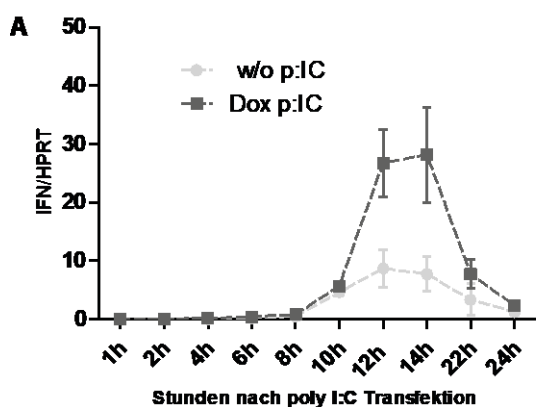
3.7.1 Gesteigerte antivirale Zytokinexpression in Doxycyclin-induzierten CRIF1 -/- MEF

Vorangegangene *loss of function* Versuche hatten ein uneinheitliches Bild für die Rolle von CRIF1 im Rahmen der angeborenen antiviralen Immunität erbracht (vgl. 3.2.3). Die dabei verwendeten Systeme zeigten einen inkompletten Verlust von CRIF1 und eine Vorstimulation der Zellen im Rahmen der Depletion von CRIF1. Mit dem verbesserten und besser kontrollierbaren Doxycyclin-induzierbaren MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre System konnten die Auswirkungen des CRIF1 *knock-outs* unter Immunstimulation mit dem MDA5-Liganden poly I:C erneut untersucht werden. Dabei war nun sowohl zwölf als auch 24 Stunden nach Stimulation für alle untersuchten Zytokine eine zum Teil deutlich signifikante Verstärkung der Immunantwort erkennbar (Abbildung 3.11 A/B). Durch Analyse der Überstände der Zellen nach 24-stündiger poly I:C Inkubation mittels IP-10 ELISA konnte die gesteigerte Immunantwort nach CRIF1-Depletion dabei auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abbildung 3.11 C).



3.7.2 Verstärkte Zytokinantwort in MEF CRIF1^{-/-} nach poly I:C Stimulation beruht nicht auf einer schnelleren Induktion der Immunantwort

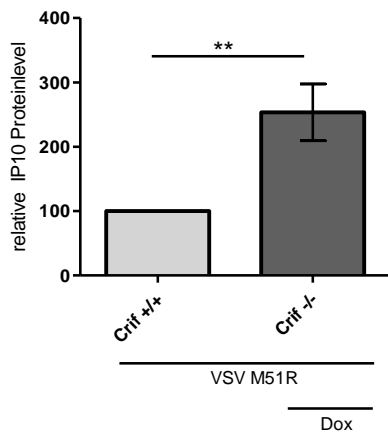
Die bisherigen Versuche zeigten eine gesteigerte antivirale Zytokinproduktion nach poly I:C-Stimulation unter CRIF1 *knock-out*. Dabei erlaubte der IP10-ELISA eine Aussage über die kumulative Zytokinexpression über 24 Stunden und die qPCR-Analysen bestätigen diese Annahme zu zwei festgelegten Zeitpunkten. Um die Veränderung in der Kinetik der Zytokinproduktion zu untersuchen, wurde ein engmaschiger Zeitverlauf im Antwortprofil der antiviralen Zytokine INF- β , IP-10 und TNF- α nach Stimulation mit poly I:C erstellt (Abbildung 3.12). Dabei wird deutlich, dass in allen Bedingungen acht bis zehn Stunden nach Immunstimulation ein massiver Anstieg der Zytokinlevel beginnt, mit einem Höhepunkt nach 14 Stunden und nachfolgendem Abfall. Während in den ersten Stunden keine relevanten Auswirkungen der CRIF1-Deletion darstellbar sind, steigen die Zytokine in den *knock-out*-Bedingungen nach zehn Stunden deutlich stärker an als in den Kontrollen. Somit sind die erhöhten Gesamtmengen an mRNA – in diesem Fall auch darstellbar als *Area under the curve* – nicht Folge einer früheren Induktion der Zytokinproduktion, sondern vielmehr eines stärkeren Anstiegs der maximalen Syntheseleistung.



3.12 Verstärkte Zytokinantwort in MEF CRIF1^{-/-} nach poly I:C-Stimulation beruht nicht auf einer schnelleren Induktion der Immunantwort. MEF *flx/flx* CRIF1 Tet-On Cre wurden für 48 Stunden mit 4 μ g/ml Doxycyclin inkubiert und anschließend mit 333 ng/ml poly I:C stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die RNA der Zellen aufgereinigt, zu cDNA umgeschrieben und mittels quantitativer *real-time* PCR hinsichtlich der Expression von (A) IFN- β , (B) IP-10 und (C) TNF- α im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM von n=2 angegeben.

3.7.3 Zunahme der Immunantwort bei VSV-Infektion

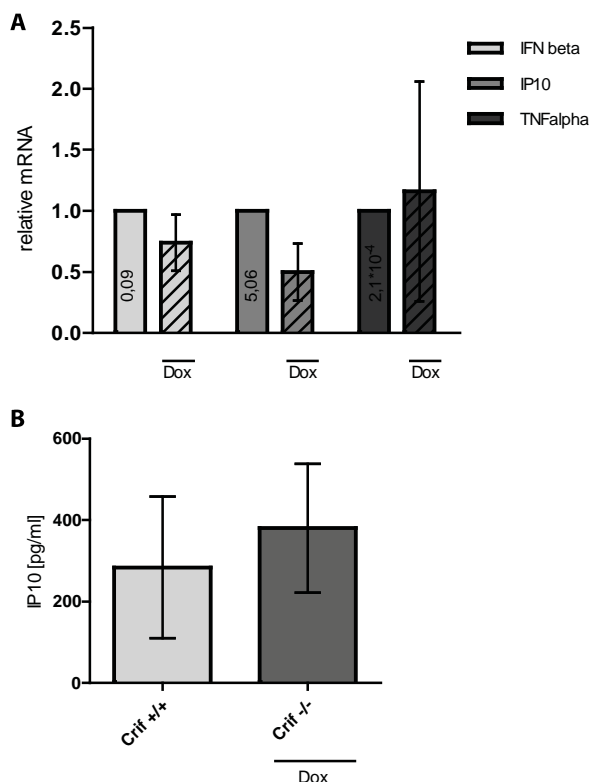
Um die mit dem synthetischen Analogon viraler RNA poly I:C gewonnenen Daten in einem Modell einer Virusinfektion zu bestätigen, wurde die Rolle von CRIF1 bei einer Infektion mit dem negativ-Strang RNA-Virus VSV untersucht (Abbildung 3.13). Dabei konnten erheblich gesteigerte IP-10-Proteinlevel in den CRIF1-negativen Zellen im Vergleich zur Kontrolle 6 h nach der Infektion nachgewiesen werden.



3.13 IP-10 ELISA nach sechsstündiger VSV-Infektion. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden nach Doxycyclin-Inkubation (4 µg/ml für drei Tage) mit VSV M51R MOI eins oder MOI fünf infiziert. Nach sechs Stunden wurde der Zellüberstand entnommen und ein IP-10 ELISA zur Quantifizierung der Immunantwort auf Proteinebene durchgeführt. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwert ±SEM von n=12 angegeben. ** p < 0.01 für den Vergleich der induzierten Bedingungen.

3.7.4 Keine Veränderung der basalen Zytokinlevel nach CRIF1 knock-out

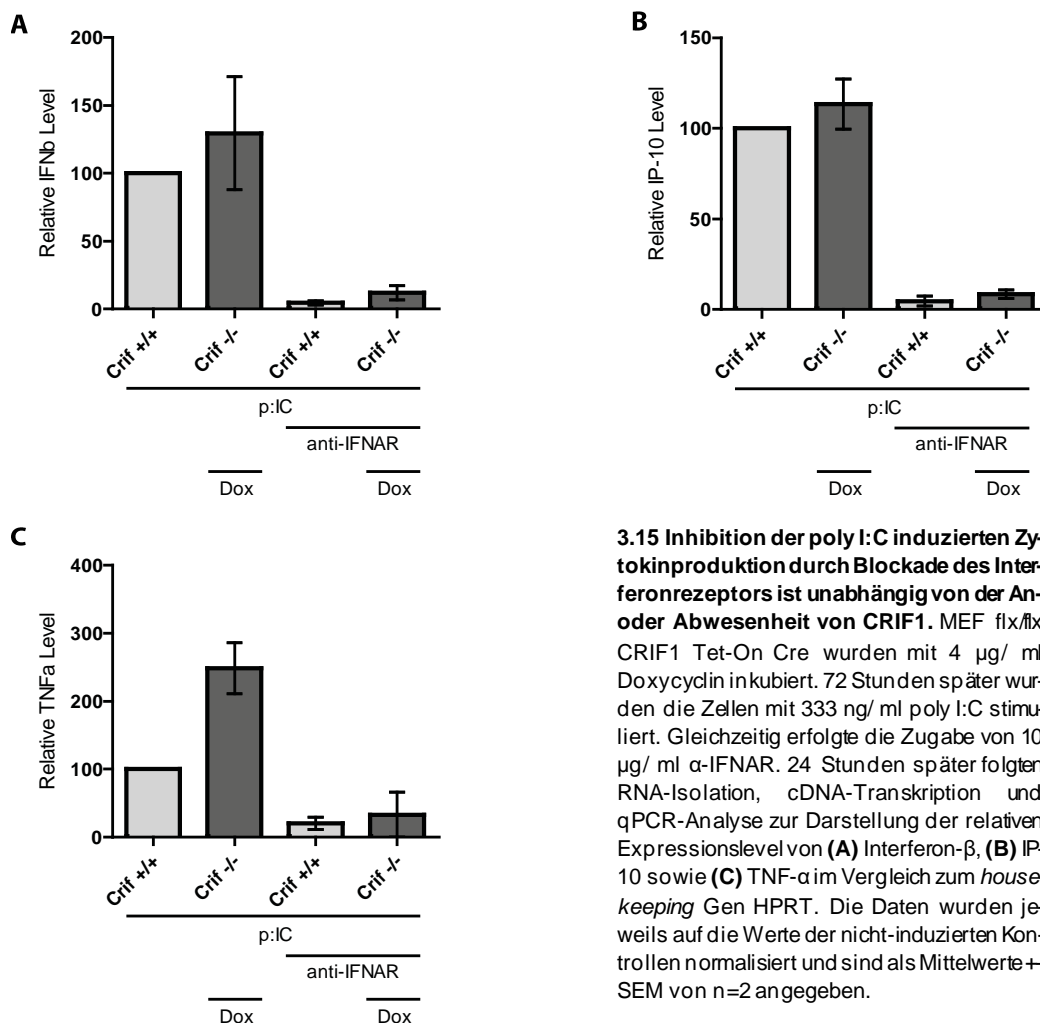
Sowohl die Bestimmung der mRNA-Level der antiviralen Zytokine TNFα, IFNβ und IP10, wie auch die IP10 Proteinquantifizierung mittels ELISA zeigten keine signifikanten Auswirkungen des CRIF1 knock-outs auf die - in beiden Bedingungen sehr niedrigen - basalen Zytokinlevel ohne vorangehende Immunstimulation (Abbildung 3.14). Ein intrinsischer immunstimulatorischer Effekt durch Doxycyclin oder die CRIF1-Deletion erscheint somit unwahrscheinlich.



3.14 Keine Änderung der basalen Zytokinlevel nach Doxycyclin-Inkubation ohne poly I:C-Stimulation oder VSV-Stimulation. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Zwei Tage später erfolgte die 12-stündige Zugabe eines Kontrollgemisches aus OptiMEM und Lipofectamin, ohne poly I:C. Anschließend wurden (A) die Zellen lysiert, ihre RNA isoliert, zu cDNA transkribiert und mittels quantitativer real-time PCR zur Darstellung der relativen Expressionslevel von Interferon-β, IP-10 sowie TNF-α im Vergleich zur house-keeping Gen HPRT untersucht. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte ± SEM von n=4 angegeben. Der Mittelwert der nicht-induzierten Kontrollen ist in den Balken angegeben. Zudem erfolgte (B) aus dem Zellüberstand eine Quantifizierung der Immunantwort auf Proteinebene mittels IP-10 ELISA. (n=7)

3.7.5 Die Inhibition der poly I:C induzierten Zytokinproduktion durch Blockade des Interferonrezeptors ist unabhängig von der An- oder Abwesenheit von CRIF1

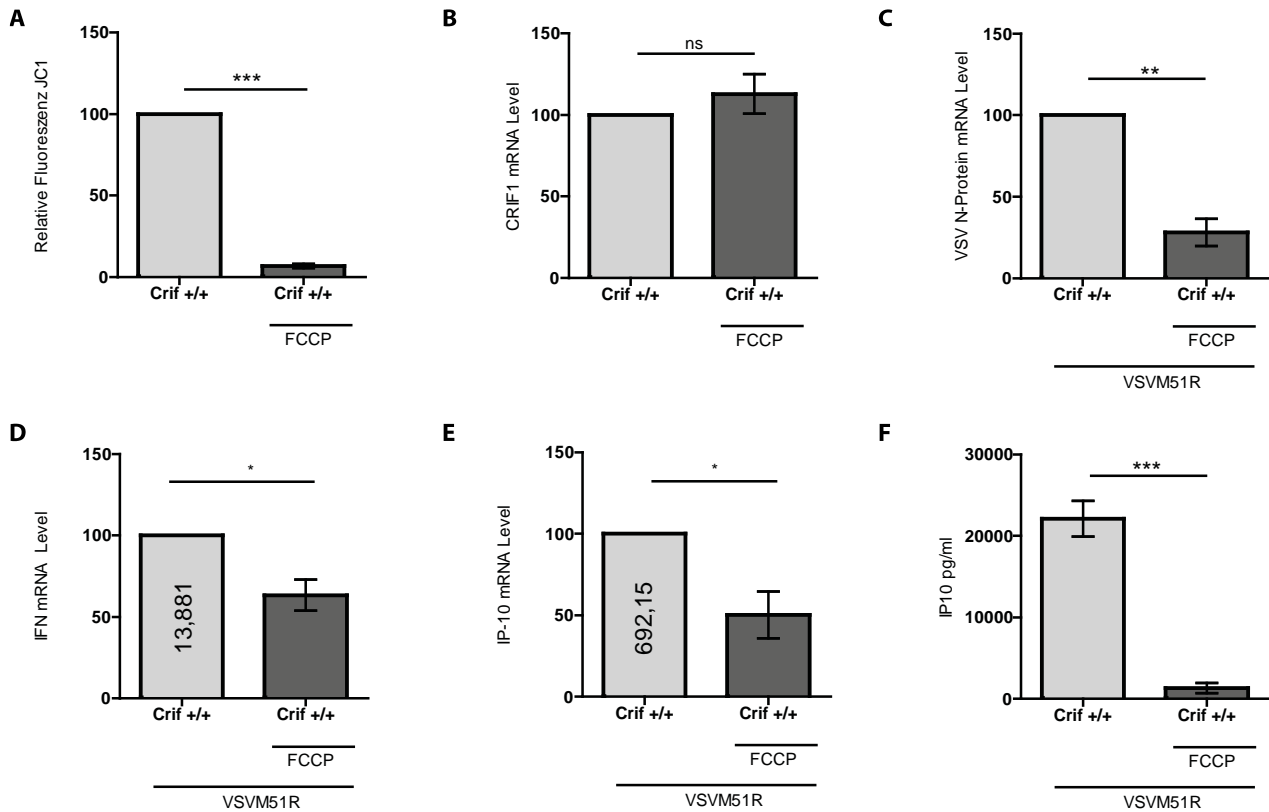
Die durch poly I:C induzierte Aktivierung der RLR-abhängigen antiviralen Signalkaskade wird durch autokrine Sekretion von Interferon Typ I und Stimulierung des IFN-Typ I Rezeptors in einem positiven Regelkreis verstärkt (vgl. 1.2.3). Um den Angriffspunkt der verstärkten Zytokinproduktion nach CRIF1 *knock-out* der primären Signalkette unterhalb von MDA5 oder der Signalkette unterhalb des Interferonrezeptors zuordnen zu können, wurde eine Antikörper-vermittelte Blockade des Interferon-Rezeptors (IFNAR) durchgeführt. Parallel zu den Versuchen in 3.7.1 wurden MEF mit poly I:C stimuliert, diesmal jedoch nach vorhergehender Behandlung mit IFNAR-Antikörpern (Abbildung 3.15). Dabei zeigt sich nach Blockade des Interferon-Rezeptors ein weitgehender Abbruch der Synthese antiviraler Zytokine. Wenn auch auf niedrigerem Niveau bleiben jedoch auch unter der Blockade des Interferon-Rezeptor-Signals die erhöhten mRNA-Level der antiviralen Zytokine in den MEF CRIF1 *-/-* im Vergleich zu den naiven Kontrollbedingungen darstellbar. Somit erscheint es unwahrscheinlich, dass die Wirkung von CRIF1 auf die antivirale Zytokinproduktion über einen unterhalb des Interferonrezeptors liegenden Effekt vermittelt wird.



3.15 Inhibition der poly I:C induzierten Zytokinproduktion durch Blockade des Interferonrezeptors ist unabhängig von der An- oder Abwesenheit von CRIF1. MEF *flx/flx* CRIF1 Tet-On Cre wurden mit 4 μ g/ml Doxycyclin inkubiert. 72 Stunden später wurden die Zellen mit 333 ng/ml poly I:C stimuliert. Gleichzeitig erfolgte die Zugabe von 10 μ g/ml α -IFNAR. 24 Stunden später folgten RNA-Isolation, cDNA-Transkription und qPCR-Analyse zur Darstellung der relativen Expressionslevel von (A) Interferon- β , (B) IP-10 sowie (C) TNF- α im Vergleich zum *housekeeping* Gen HPRT. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte + SEM von n=2 angegeben.

3.7.6 FCCP führt zu einer Abnahme der Immunantwort in MEF

Eine entscheidende Folge des CRIF1 *knock-outs* ist der in 3.5.1 beschriebene erhebliche Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials. Um zu überprüfen, ob die veränderten immunologischen Eigenschaften der CRIF1-depletierten Zellen kausal auf dieses Ereignis zurückzuführen sind, wurde durch Verwendung des protonophorischen Moleküls FCCP ein alternativer chemischer Ansatz zur Aufhebung des Membranpotentials der Mitochondrien verwendet. Nachdem diese Zellen dann ebenfalls mit VSV M51R infiziert worden sind, konnten dieselben quantitativen Analysen auf mRNA- oder Protein-Ebene zur Anwendung kommen (Abbildung 3.16). Durch diese Versuche konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von FCCP planmäßig zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials im verwendeten Modell führt, allerdings die CRIF1-Expression unbeeinflusst lässt. In Bezug auf die Virusinfektion und die antivirale Immunantwort hingegen zeigt sich eine dem CRIF1 *knock-out* gegensätzliche Entwicklung: sowohl die virale Replikation als auch die Zytokinantwort fallen signifikant ab.



3.16 FCCP führt zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und bleibt ohne Einfluss auf das CRIF1-Level.

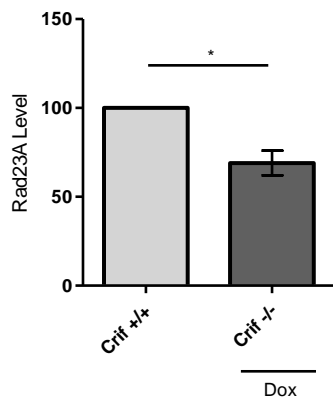
(A) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden ohne Inkubation mit Doxycyclin ausplattiert. Vier Tage später folgte die Zugabe von 20 μ l 1,2 mM FCCP-Lösung pro Well. Nach weiteren sechs Stunden wurden die Färbung mit JC1 und anschließende FACS-Analyse zur Bestimmung des Fluoreszenzniveaus als Indikator für das Membranpotential der Mitochondrien vorgenommen. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-FCCP-behandelten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=4 angegeben. *** p < 0.001 für den Vergleich der indizierten Bedingungen. (B) MEF flx/flx CRIF1 wurden ohne Zugabe von Doxycyclin ausplattiert, an Tag vier mit 20 μ l 1,2 mM FCCP-Lösung pro Well inkubiert und sechs Stunden später lysiert. Die RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und in der qPCR auf die relative Expression von CRIF1 im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT untersucht. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-FCCP-behandelten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=4 angegeben.

Zugabe von FCCP verringert die VSV-Infektionsrate sowie die antivirale Zytokinantwort. MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden ohne Inkubation mit Doxycyclin ausplattiert. Vier Tage später folgte die Zugabe von 20 μ l 1,2 mM FCCP-Lösung pro Well, sowie eine Stunde später die Infektion mit VSV M51R in einer MOI von fünf. Nach weiteren sechs Stunden folgten RNA-Isolation, cDNA-Transkription und qPCR-Analyse zur Darstellung der relativen Expressionslevel von (C) VSV N-Protein, (D) Interferon- β sowie (E) IP-10 im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT. Die Daten wurden jeweils auf die Werte der nicht-FCCP-behandelten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von n=4 angegeben. Der Mittelwert der nicht-transduzierten Kontrollen (IFN- β , IP-10) ist in den Balken angegeben. * p < 0.05 und ** p < 0.01 für den Vergleich der indizierten Bedingungen. Zudem erfolgte (F) aus dem Zellüberstand eine Quantifizierung der Immunantwort auf Proteinebene mittels IP-10 ELISA. N=4, *** p < 0.001 für den Vergleich der indizierten Bedingungen.

3.8 Die antivirale Bedeutung von Rad23A im Rahmen des CRIF1 *knock-outs*

3.8.1 Rad23A *knock-down* durch CRIF1-Depletion

Die Methodik des Cre-Rekombinase Systems bedingt, dass ein Stück doppelsträngige DNA aus dem Genom der MEF entfernt wird (vgl. 2.2.14). Aufgrund der überlappenden Genstruktur von CRIF1 und Rad23A und der Platzierung der *LoxP-Sites* durch die Gruppe von Kwon et al. [107], erscheint es für eine umfassende Betrachtung unabdingbar, die Auswirkungen der – intendierten – Deletion von CRIF1 auf eine nicht intendierte, durch Exzision des CRIF1-Gegenstranges eventuell verminderte Expression des Proteins Rad23A zu untersuchen. Dabei zeigte sich nach standardisiert durchgeführtem, durch Induktion der Cre-Rekombinase ausgelösten CRIF1 *knock-out*, tatsächlich auch ein signifikanter Rückgang der Rad23A mRNA auf gut zwei Drittel ihres Ursprungswertes (Abbildung 3.17).

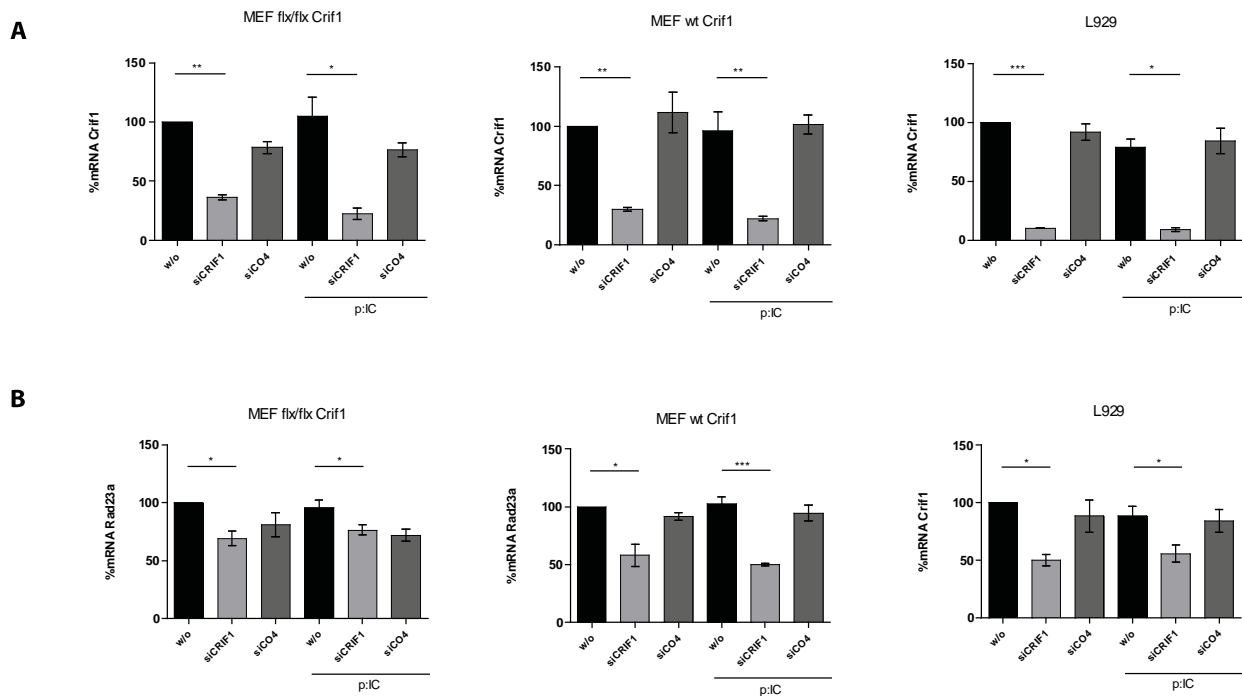


3.17 Abnahme der Rad23A-Level durch Doxycyclin-induzierten CRIF1-Knockout. MEF flx/flx CRIF1 Tet On Cre wurden für 72 Stunden mit 4 µg/ml Doxycyclin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, RNA aufgereinigt und nach cDNA-Umschrieb mittels qPCR-Analyse die relative Expression von Rad23A im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT bestimmt. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=4$ angegeben. * $p < 0.05$ für den Vergleich der induzierten Bedingungen.

3.8.2 siRNA vermittelter CRIF1 *knock-down* verursacht quantitativ unveränderten Rad23A-*knock-down*

Im Jahr 2013 haben Fang et al. postuliert, dass die RIG-I- und MDA5-basierten antiviralen Signalwege durch Rad23A supprimiert werden [138]. Basierend auf dieser Annahme und dem in 3.8.1 dargestellten „Begleit-*knock-down*“ von Rad23A könnte die Hypothese entwickelt werden, dass die immunstimulatorischen Effekte des CRIF1 *knock-outs* möglicherweise tatsächlich auf den gleichzeitig auftretenden partiellen *knock-down* von Rad23A zurückzuführen wären. Um dies untersuchen zu können, wurde eine CRIF1 *knock-down*-Methode gewählt werden, die die genomische Überlappung von CRIF1 und Rad23A respektiert. Wir entwickelten daher einen siRNA-Assay mit einer spezifisch die murine CRIF1-mRNA bindenden siRNA ohne Sequenzübereinstimmung zur Rad23A-mRNA. Zusätzlich verwendeten wir noch eine weitere Zelllinie (L929), um einen theoretischen MEF-exklusiven Ko-*knock-down* ausschließen zu können.

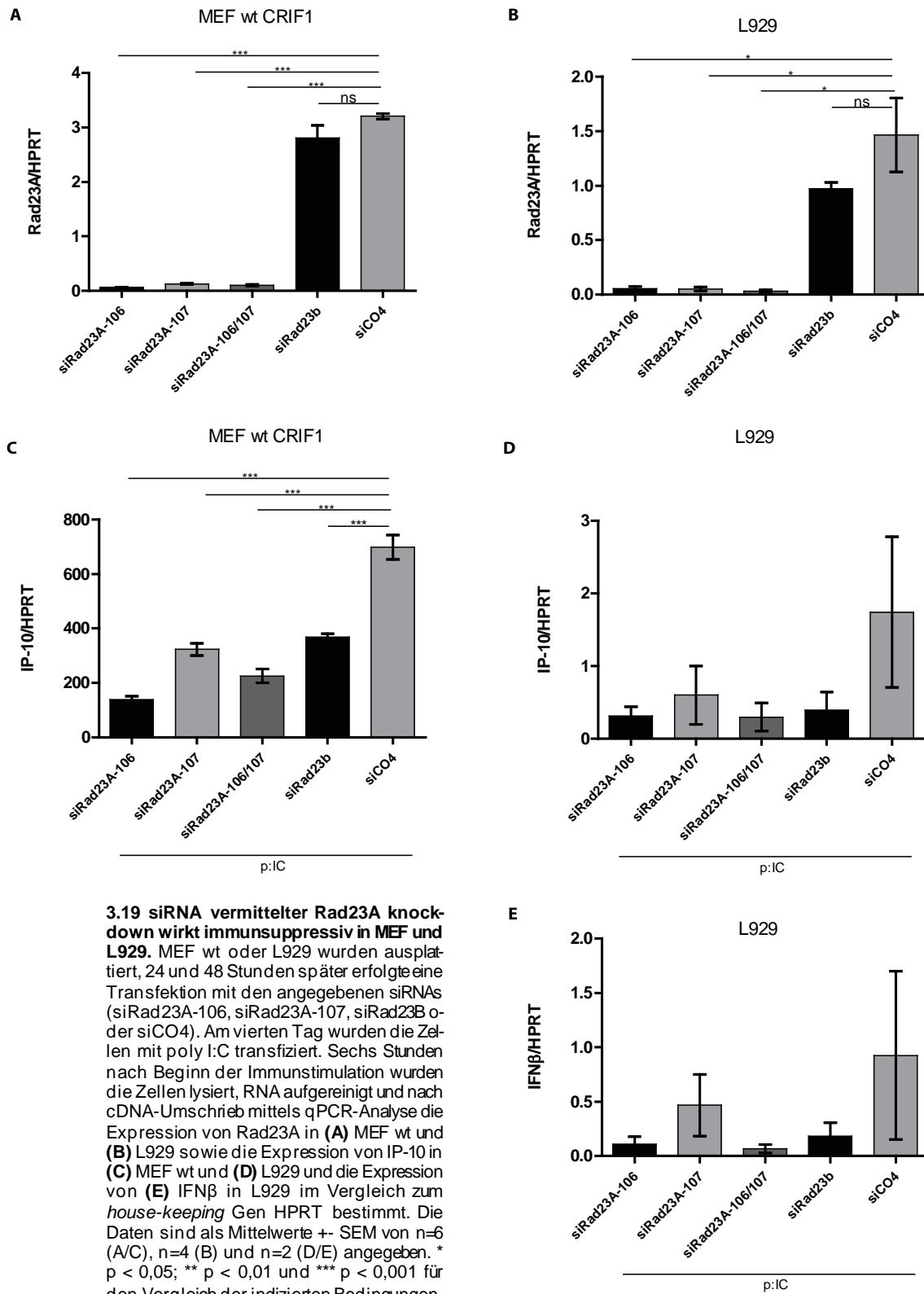
Durch den Einsatz der siRNA konnte ein für diese Methode erfreulich weitgehender CRIF1 *knock-down* erzielt werden (Abbildung 3.18A). Gleichwohl zeigte sich erneut ein signifikanter Abfall an Rad23A-mRNA (Abbildung 3.18B).



3.18 Rad23A knock-down auch unter Verwendung von siCRIF1. MEF flx/flx CRIF1, MEF wt oder L929 wurden ausplattiert, 24 und 48 Stunden später erfolgte eine Transfektion mit siRNA (siCRIF1 oder siCO4). Am vierten Tag wurden die Zellen mit poly I:C transfiziert. Sechs Stunden nach Beginn der Immunstimulation wurden die Zellen lysiert, RNA aufgereinigt und nach cDNA-Umschrieb mittels qPCR-Analyse die relative Expression von **(A)** CRIF1 und **(B)** Rad23A im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT bestimmt. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-transfizierten und nicht-stimulierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ angegeben. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ für den Vergleich der indizierten Bedingungen.

3.8.3 siRNA vermittelter Rad23A knock-down wirkt immunsuppressiv in MEF

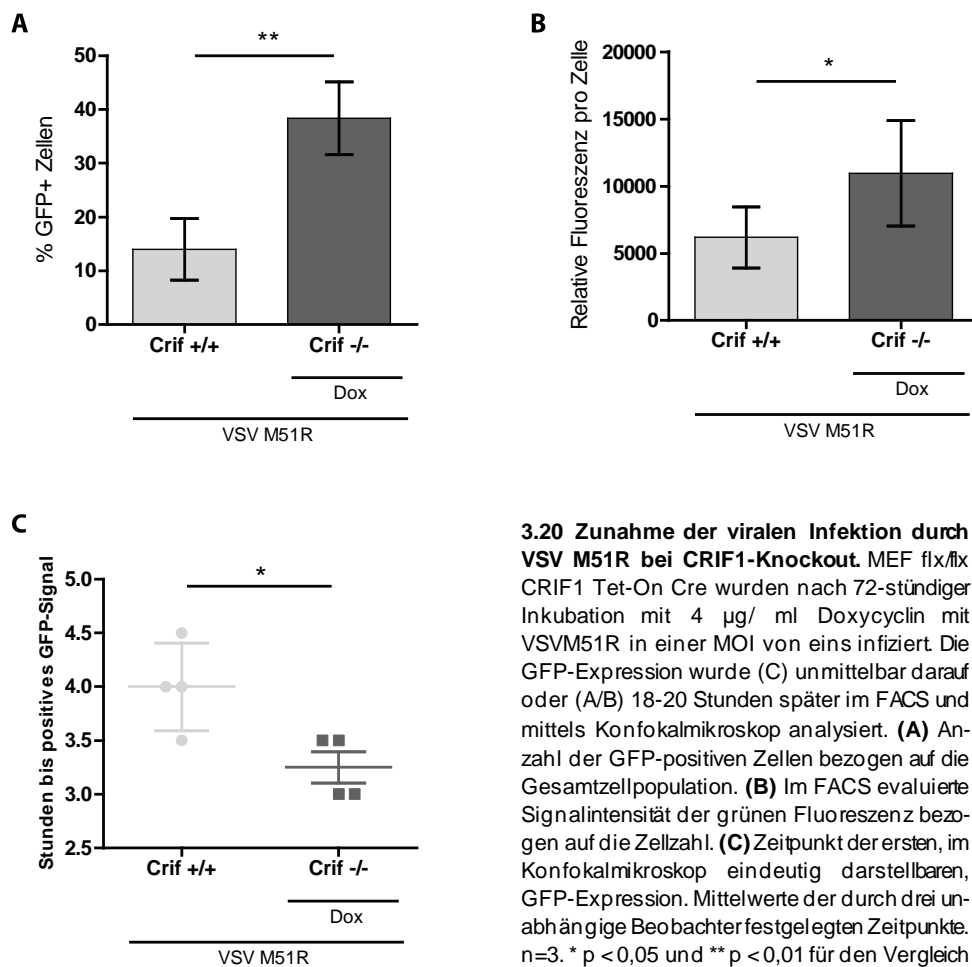
Da eine Untersuchung der immunologischen Auswirkungen von siCRIF1 durch den begleitenden Rad23A *knock-down* behindert wurde, verwendeten wir alternativ Rad23A-siRNAs zur Evaluierung der Auswirkungen einer Rad23A Depletion auf die antivirale Immunkapazität von MEF und L929 Zellen. In beiden Zelllinien erzielte der Einsatz von zwei verschiedenen Rad23A-siRNAs - nicht jedoch von siRad23B - einen nahezu vollständigen *knock-down* von Rad23A auf mRNA-Ebene (3.19A/B). Hinsichtlich der antiviralen Immunantwort zeigte sich unter Rad23A *knock-down* nach Stimulation mit poly I:C ein signifikanter Abfall der IP-10 Level in MEF (3.19C). Ein ähnlicher Trend war auch in L929 Zellen für IP-10 und IFN- β darstellbar (3.19D/E).



3.9 Erhöhte virale Suszeptibilität nach CRIF1 *knock-out*

3.9.1 Verstärkte Virusinfektion in CRIF1-defizienten Zellen

Um die Auswirkung der Deletion von CRIF1 in einer Zelle auf die virale Replikationsfähigkeit zu untersuchen, wurden MEF mit und ohne CRIF1 mit einer GFP exprimierenden VSV M51R Mutante infiziert und an Hand der GFP-Expression mittels FACS-Analyse und Konfokalmikroskopie das Ausmaß der Infektion untersucht. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Kontrolle erheblich mehr CRIF1-negative Zellen durch VSV M51R infiziert wurden (Abbildung 3.20A). Auch die Intensität der grünen Fluoreszenz pro Zelle war deutlich gesteigert, als Hinweis auf eine erhöhte Viruslast pro Zelle (Abbildung 3.20B). Zudem starteten die CRIF1-deletierten Zellen bereits circa eine Stunde früher mit der GFP-Expression, so dass mutmaßlich der Prozess aus Aufnahme des Virus, Transkription und Translation viraler Proteine in diesen Zellen rascher beginnt oder schneller abläuft (Abbildung 3.20C).



3.20 Zunahme der viralen Infektion durch VSV M51R bei CRIF1-Knockout. MEF *flx/flx* CRIF1 Tet-On Cre wurden nach 72-stündiger Inkubation mit 4 μ g/ml Doxycyclin mit VSV M51R in einer MOI von eins infiziert. Die GFP-Expression wurde (C) unmittelbar darauf oder (A/B) 18-20 Stunden später im FACS und mittels Konfokalmikroskop analysiert. (A) Anzahl der GFP-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtzellpopulation. (B) Im FACS evaluierte Signalintensität der grünen Fluoreszenz bezogen auf die Zellzahl. (C) Zeitpunkt der ersten, im Konfokalmikroskop eindeutig darstellbaren, GFP-Expression. Mittelwerte der durch drei unabhängige Beobachter festgelegten Zeitpunkte. $n=3$. * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ für den Vergleich der infizierten Bedingungen.

3.9.2 Verstärkter Virus-Entry nach CRIF1 knock-out

3.9.2.1 Zunahme der VSV N-Protein mRNA-Level in CRIF1-defizienten MEF

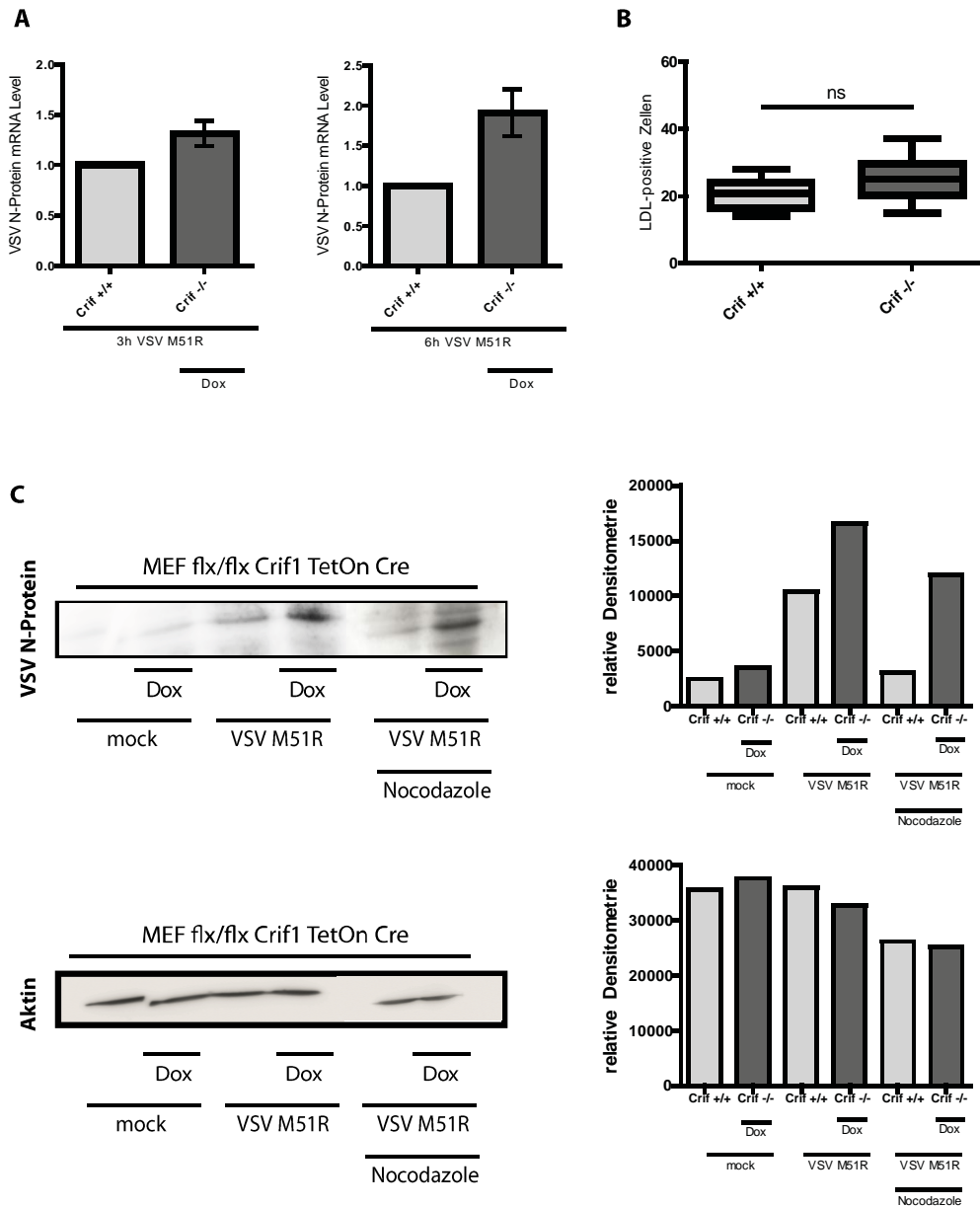
Um die vorangegangenen Ergebnisse mit einer alternativen Methode zu validieren, wurden in folgenden Versuchen nach Infektion mit VSV M51R die mRNA-Level des VSV-N-Proteins durch quantitative *Real-Time*-PCR bestimmt. Dabei konnte in den Zellen mit depletiertem CRIF1 eine Zunahme der viralen N-Protein-mRNA bereits drei und sechs Stunden nach VSV-Infektion bestätigt werden (Abbildung 3.21A).

3.9.2.2 Zunahme der VSV Virusinfektion in MEF CRIF1 -/- ist zum Teil durch einen verstärkten viralen Entry bedingt

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Depletion von CRIF1 zu einer vermehrten Transkription viraler mRNAs in MEF führt. Dies könnte theoretisch durch zwei unterschiedliche Mechanismen bedingt sein: Entweder gelingt es den Viren leichter - und damit in größerer Zahl - die Zellen zu infizieren, oder die Replikation der Viren nach Einschleusung in das Zytoplasma findet in erhöhter Geschwindigkeit statt. Um diese Frage weiter zu evaluieren wurde im Folgenden der virale *Entry* des VSV M51R in MEF untersucht. Durch Verwendung von VSV-N-Antikörpern konnte im Western Blot eine Stunde nach Infektion eine deutliche Signalanhebung in den CRIF1-defizienten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.21C). In Anbetracht des Versuchsdesigns ist dies als verstärkter viraler Zellentry zu werten.

Der Einsatz von Nocodazole, ein chemischer Inhibitor des Mikrotubulusapparates, bei VSV-Infektions-Assays verursacht eine Inhibition des viralen Glykoprotein- und Nukleokapsid-Transports [139-141]. Dementsprechend führte die vorherige Inkubation mit Nocodazole in MEF zu einer Reduktion des viralen Entry (Abbildung 3.21C). Auch unter Nocodazole war allerdings nach CRIF1 *knock-out* eine Zunahme der VSV N-Protein-Level darstellbar, so dass die gezeigte Zunahme des viralen *Entry* mutmaßlich nicht die alleinige Kausalität für die verstärkte VSV-Virusinfektion in CRIF1-depletierten MEF darstellt.

Um eine grundsätzliche Veränderung der Substanzaufnahme über die Plasmamembran unter CRIF1 *knock-out* auszuschließen, wurde die quantitative Aufnahme von fluoreszenzmarkierten LDL-Partikeln in MEF bestimmt (Abbildung 3.21B). Es konnte dabei keine signifikante Änderung des Aufnahmeverhaltens der CRIF1 *knock-out*-Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden.



3.21 Zunahme der VSV N-Protein mRNA-Level nach CRIF1-Knockout. (A) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden nach dreitägiger Inkubation mit 4 µg/ml Doxycyclin mit VSV M51R in einer MOI von 50 infiziert. Nach drei und sechs Stunden wurden die Zellen lysiert, RNA aufgereinigt und nach cDNA-Transkription mittels qPCR-Analyse die Expression von VSV N-Protein im Vergleich zum *house-keeping* Gen HPRT bestimmt. Die Daten wurden auf die Werte der nicht-induzierten Kontrollen normalisiert und sind als Mittelwerte \pm SEM von $n=3$ (3h) und $n=2$ (6h) angegeben.

LDL-Aufnahme in MEF-Zellen ist unabhängig vom CRIF1-Status der Zellen. (B) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden nach 72-stündiger Doxycyclin-Inkubation (4 µg/ml) für vier Stunden mit der „LDL-DyLight 549 working solution“ versetzt und anschließend mittels Konfokalmikroskop hinsichtlich ihrer LDL-Aufnahme untersucht. Abgebildet ist die durchschnittliche Anzahl der fluoreszenzdetektierten LDL-aufnehmenden Zellen als Mittelwert \pm SEM pro *Region of Interest* von $n=2$. **Verstärkter viraler Entry nach CRIF1-Knockout.** (C) MEF flx/flx CRIF1 Tet-On Cre wurden für drei Tage mit 4 µg/ml Doxycyclin sowie teilweise zusätzlich für fünf Stunden mit 10 pg/ml Nocodazole inkubiert und anschließend für eine Stunde mit VSV M51R in einer MOI von 50 infiziert. Anschließend erfolgten ein Trypsin-Verdau und die Lyse der Zellen in Laemmli-Puffer. Im Western Blot wurde die Expression des viralen N-Proteins und der Aktin-Ladungskontrolle bestimmt, sowie entsprechend densitometrisch quantifiziert. Die Abbildungen sind repräsentativ für vier unabhängige Versuche.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Systeme angewendet, um in einer murinen embryonalen Fibroblastenzelllinie (MEF), in deren Genom zwei LoxP-Elemente flankierend des Exons 2 von CRIF1 eingefügt sind, durch Überexpression der Cre-Rekombinase einen CRIF1 *knock-out* zu induzieren: die retrovirale Transduktion eines Cre kodierenden *Murine Stem Cell Virus*, die Protein-Transduktion von rekombinantem Tat-NLS-Cre sowie die Doxycyclin-abhängige Induktion eines Cre-Expressionssystems unter dem Tet-On Promoter in einer stabilen MEF LoxP CRIF1 Tet-On Cre Zelllinie. Durch Analyse der mRNA konnte dabei ein *knock-out* von CRIF1 durch retrovirale Cre-Expression in über der Hälfte der Zellen dargestellt werden. Bei Einsatz der Tat-NLS-Cre-Transduktion und der Doxycyclin-induzierten Cre-Expression konnte die Effizienz des CRIF1 *knock-outs* auf nahezu 100% gesteigert werden. In den beiden letztgenannten Systemen wurden durch Western-Blot-Untersuchungen diese Ergebnisse auch auf Proteinebene qualitativ und quantitativ bestätigt. Somit konnte in Bezug auf die Deletion von CRIF1 die funktionelle Gleichwertigkeit der Protein-Transduktion von Tat-NLS-Cre und der Doxycyclin-Induktion des Cre-Expressionssystems unter dem Tet-On Promoter, sowie die Überlegenheit dieser beiden Methoden gegenüber der retroviralen Cre-Expression nachgewiesen werden.

Durch langfristige Kultivierungsversuche konnte gezeigt werden, dass CRIF1 ein für MEF essentielles Protein darstellt, und ein Überleben der CRIF1 *-/-* Zellen nicht länger als 12 Tage möglich ist. Unter Verwendung des Farbstoffes JC-1 wurde gezeigt, dass die Depletion von CRIF1 zu einem massiven Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials führt. Weitere Untersuchungen mittels Western Blot stellten einen weitgehenden Verlust aller Atmungskettenkomplexe - mit Ausnahme von Komplex II - nach CRIF1 *knock-out* dar. Als funktionelles Korrelat dieser Tatsache ergaben die Messungen der zellulären Sauerstoffverbrauchsdaten einen deutlichen Abfall der *Oxygen Consumption Rate* in CRIF1-defizienten MEF. Dieser Befund ist bereits wenige Tage nach CRIF1 *knock-out* darstellbar, wohingegen die Viabilität der MEF zu diesem Zeitpunkt noch nicht maßgeblich eingeschränkt ist. Das im Rahmen der Cre-Expression unter dem Tet-On-Promoter verwendete Doxycyclin ist nicht für diese metabolischen Effekte verantwortlich zu machen. Es ergaben sich unter alleiniger Doxycyclin-Exposition der MEF flx/flx CRIF1 keine

relevanten Alterationen der CRIF1-Level, des mitochondrialen Membranpotentials oder des intrazellulären Sauerstoffverbrauchs.

Bei Immunstimulationsversuchen mittels poly I:C konnte eine Zunahme der antiviralen Zytokinantwort in Zellen mit deletiertem CRIF1 gezeigt werden; im Zeitverlauf ist diese 10-22 Stunden nach Gabe des Stimulus am ausgeprägtesten. Die Blockade des IFNAR durch entsprechende Antikörper verhindert hierbei sowohl in Wildtyp als auch in CRIF1 $-/-$ Zellen eine maximale Expression antiviraler Zytokine im Rahmen der Immunstimulation. Da dabei jedoch ein substantieller Unterschied zwischen Knock-out und Wildtyp bestehen bleibt, ist der Punkt, an dem die Defizienz von CRIF1 den RLR-Signalweg beeinflusst, eher oberhalb des Interferon-vermittelten Feedbackloops zu suchen.

CRIF1 $-/-$ MEF zeigen eine deutlich erhöhte virale Suszeptibilität, darstellbar durch die frühzeitig stattfindende Infektion einer größeren Anzahl Zellen mit jeweils erhöhter Viruslast. Auf der Suche nach einem diesen Umstand erklärenden Mechanismus konnte gezeigt werden, dass bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt (1 h) nach Infektion Unterschiede in der Menge der nachweisbaren viralen Proteine in den Zellen bestehen, so dass die Hypothese besteht, bereits die Virusaufnahme in die CRIF1-deletierten Zellen sei deutlich gesteigert; im Gegensatz hierzu war die LDL-Aufnahme der Zellen unabhängig vom CRIF1-Status.

Durch den *knock-out* von CRIF1 resultiert aufgrund ihrer genomischen Überlappung auch eine Reduktion des Rad23A mRNA-Level. Der isolierte *knock-down* von Rad23A durch entsprechende siRNA verursachte allerdings, im Gegensatz zur gesteigerten Produktion in CRIF1 *knock-outs*, eine verminderte Produktion von Zytokinen nach RLR-Stimulation im Vergleich zum Wildtyp.

Nach Behandlung mit dem Protonophor FCCP zeigen MEF einen nahezu vollständigen Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, allerdings war konträr zu den CRIF1 $-/-$ MEF eine Abnahme der Zytokinantwort und Virusreplikation zu beobachten, vermutlich bedingt durch den induzierten Zelltod und metabolischen *Shutdown*.

4.2 CRIF1 ist essentiell für die Expression und Funktionalität der mitochondrialen Atmungskette

In früheren Untersuchungen wurde CRIF1 – damals noch CR6-interacting factor 1 oder GADD45GIP1 (*growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma interacting protein 1*) genannt – als im Zellkern exprimierter transkriptionaler Co-Aktivat, Regulator des Zellzyklus oder als im Rahmen der Degradation von Proteasomen relevantes Protein angesehen [105-107, 142]. In späteren Publikationen hingegen wurde eine mitochondriale Lokalisation von CRIF1 postuliert, mit daraus folgend vielfältigen metabolischen Funktionen [143, 144]. Diese Ergebnisse wurden durch Stefanie Lietke, ein Mitglied dieser Arbeitsgruppe, in eigenen Experimenten bestätigt: So konnte die Kernlokalisation als Artefakt einer methodisch bedingten Überexpression des Proteins demaskiert werden. Bei Verwendung einer n-terminalen Lokalisierungssequenz hingegen wird CRIF1 ausschließlich in Mitochondrien exprimiert. Kim et. al. schließlich konnten zeigen, dass CRIF1 als Bestandteil des mitochondrialen Ribosoms bedeutend ist für die translationelle Integration der in der mitochondrialen DNA codierten Atmungskettenkomplexe in die innere mitochondriale Membran [111].

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen die Daten von Kim et al.: Der *knock-out* von CRIF1 resultiert in einem Expressionsabbruch der Atmungskettenkomplexe I, III, IV und V – lediglich der (nicht mitoribosomal translatierte) Komplex II bleibt davon ausgenommen. Als Folge dieser Situation konnte funktionell ein starker Rückgang des mitochondrialen Sauerstoffverbrauchs in Folge der fehlenden oxidativen Phosphorylierung gezeigt werden. Gestützt werden diese Resultate durch den weitgehenden Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials nach CRIF1 *knock-out*: Die nicht mehr vorhandenen Atmungskettenkomplexe können auch keinen elektrochemischen Gradienten mehr aufbauen.

Dabei ergab sich bisher kein Hinweis darauf, dass CRIF1 die Funktionalität der Atmungskette selbst negativ beeinflusst, sondern die Ergebnisse lassen mutmaßen, dass der Funktionsverlust derselben Folge des durch CRIF1 hervorgerufenen Expressionsabbruches⁹ der entsprechenden mitochondrialen Proteine ist.

⁹ Im Rahmen der in dieser Arbeit gezeigten Versuche kann nicht zwischen einer transkriptionellen, translationellen oder im Rahmen der Insertion in die Membran stattfindenden negativen Beeinflussung von Komplexen der Atmungskette durch den CRIF1-Knockout differenziert werden.

4.3 CRIF1 als negativer Regulator der angeborenen antiviralen Immunität

4.3.1 Gesteigerte antivirale Zytokinproduktion unter CRIF1 *knock-out*

In Zusammenschau der Ergebnisse führt der *knock-out* von CRIF1 in MEF bei poly I:C- oder VSV-Stimulation zu einer Zunahme der antiviralen Zytokinantwort. Sowohl bei Cre-Protein-Transduktion als auch bei Doxycyclin-induzierter Cre-Expression sind 12 Stunden nach Immunstimulation durch poly I:C signifikante Anstiege der mRNA-Level von Interferon- β , IP-10 und TNF- α zu verzeichnen. Darüber hinaus konnten auch gesteigerte IP-10 Proteinlevel und eine verstärkte Immunantwort auf Infektion mittels Vesicular Stomatitis Virus nachgewiesen werden. Die verstärkte Immunkapazität in CRIF1 $-/-$ MEF beruht nicht auf einer schnelleren Induktion der Zytokine, sondern auf einer gesteigerten (Gesamt-)Produktion 10-22 Stunden nach Immunstimulation.

Bedingt durch fehlende Transduktions- oder Transfektionsprozesse ist das Doxycyclin-induzierbare Cre-Expressionssystem in den stabilen Tet-On-Cre MEF Zelllinien das immunologisch „elegante“ und am besten kontrollierte System zur Untersuchung der Auswirkungen der Deletion von CRIF1 auf die Immunkompetenz der Zellen. Durch den induzierten und unausweichlichen Zelltod in CRIF1 $-/-$ MEF besteht allerdings nur ein begrenztes experimentelles Zeitfenster zur Untersuchung des immunmodulatorischen Effekts von CRIF1; durch die Auslösung des Zelltodes nach 5-6 Tagen ohne CRIF1 wird eine Interpretation unmöglich.

In der Literatur fehlen bisher Erkenntnisse über eine antivirale Funktion von CRIF1. Lediglich Lim et al. konnten vor Kurzem darstellen, dass das CRIF1-Homolog der Drosophila-Fliege (dCRIF1) immunologische Relevanz aufweist [145]. Die antivirale Immunität der Drosophila ist abhängig von systemischer RNA-Interferenz [146]. Durch den *knock-out* von dCRIF1 zeigten sich eine Störung der Biosynthese von siRNA und erhöhte virale mRNA-Level nach Infektion mit Drosophila C Viren [145]. Ob die erhöhten Titer des Virus auf die eingeschränkte RNA-Interferenz zurückzuführen sind und insbesondere, ob CRIF1 in Säugetieren einen vergleichbaren Einfluss auf die antivirale Immunität hat, bleibt zum gegenwärtigen Zeitpunkt jedoch unklar.

4.3.2 CRIF1 *knock-out* beeinflusst die antivirale Immunität vor Aktivierung des IFNAR

Die Detektion viraler Partikel durch RLR führt zu einer Aktivierung von MAVS und darauffolgend zur Phosphorylierung antiviraler Transkriptionsfaktoren (z.B. IRF-3 und IRF-7) unter anderem durch die Proteinkinasen IKK und TBK1 [147]. Diese Phosphorylierung ermöglicht die (Hetero)Dimerisierung von IRF-3 und IRF-7 und deren Bindung an die Promotorregionen der Typ-I

Interferone [148]. Initial führt dieser Mechanismus zur Synthese von Interferon α und β . Diese binden an den als Heterodimer vorliegenden Interferon-Rezeptor (IFNAR, bestehend aus den Untereinheiten IFNAR1 und IFNAR2).

Die Aktivierung dieses Typ-I-Interferon-Systems führt – über IFN-Rezeptor abhängige Signalwege – zur Transkription zahlreicher so genannter *interferon-stimulated genes* (ISG). Diese üben vielfältige antivirale Effekte aus. Unter anderem zählen aber auch RIG-I, MDA5 und IRF-7 zu den ISG. Somit erzeugt die (RLR-abhängige) Aktivierung des Typ-I-Interferon-System einen positiven Verstärkermechanismus, der die Expression von Typ-I-Interferonen und deren Wirkung potenziert [149-151].

Durch Blockade des IFNAR mit IFNAR1-Antikörper konnte in der vorliegenden Arbeit – unabhängig vom CRIF1 Status der Zellen – durch Unterbrechung dieses Verstärkermechanismus eine deutliche Reduktion der IFN- β Expression auf mRNA-Ebene nach Immunstimulation gezeigt werden. Allerdings bleiben, obgleich auf niedrigerem Niveau, die erhöhten mRNA-Level der antiviralen Zytokine in den MEF CRIF1 $-/-$ im Vergleich zu den naiven Kontrollbedingungen auch unter der Blockade des Interferon-Rezeptor-Signals darstellbar. Somit ist der Effekt von CRIF1 wahrscheinlich oberhalb des IFNAR-Verstärkungsloops lokalisiert.

4.3.3 Kein spezifischer Einfluss von Rad23A auf die angeborene Immunität

Durch den Umstand, dass das genomisch auf dem Gegenstrang von CRIF1 lokalisierte Rad23A teilweise Überlappungen zu den geflochten CRIF1-Abschnitten aufweist, ergibt sich – wie in 3.8.1 dargestellt – die Problematik eines begleitenden *knock-downs* von Rad23A im Zuge der Depletion von CRIF1.

Auch wenn die Bedeutung des Rad23A *knock-downs* auf die im Rahmen der Arbeit gezeigte gesteigerte Immunkompetenz nach CRIF1 *knock-out* schwierig zu interpretieren ist, kann er den CRIF1 Effekt nicht erklären. Nach siRNA-bedingtem *knock-down* von Rad23A zeigte sich in dieser Arbeit eine verminderte antivirale Zytokinexpression (IFN- β -/IP10-mRNA) unter Immunstimulation mit poly I:C in MEF und L929. Somit erzeugt der Verlust von Rad23A ein den hier gezeigten Daten in CRIF1 $-/-$ MEF eher entgegengerichtetes Bild, und kann diese daher nicht mechanistisch erklären.

Grundlegend muss in Zusammenschau mit der vorhandenen Literatur ein spezifischer Effekt von Rad23A hinsichtlich immunologischer Prozesse angezweifelt werden. Rad23A wurde erstmals als DNA-Reparaturenzym beschrieben. Es existieren auch Beschreibungen im Sinne eines UV-Exzisions-Reparaturproteins. Neuere Studien betrachten die Proteine der *Radiation Sensitive 23*-Familie (Rad23) als (Proteasom-bindende) Transportproteine, welche Aufgaben im Transport von

Substanzen zu den zellulären Proteasomen übernehmen [152-155]. So könnten durch partiellen *knock-down* von Rad23A veränderte zelluläre Abbauprozesse die Expression von Signalstoffen beeinflussen. Auch eine bei Fang et al. beschriebene Interaktion mit Proteinen der angeborenen Immunität kann sich durch diese Funktion als Proteasom-*Shuttle* erklären [138].

4.4 Der Einfluss des mitochondrialen Membranpotentials auf die RIG-I Signalkaskade

Mit der Beschreibung von MAVS als unabdingbarem Protein im Signalweg der RLR-induzierten antiviralen Immunität wurden Mitochondrien erstmals auch als bedeutende Zellorganellen im Rahmen der angeborenen antiviralen Immunität anerkannt [89, 156, 157].

Koshiha et al. konnten darstellen, dass ein Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, zum Beispiel durch den chemischen Entkoppler CCCP (ein Protonophor), zu einem massiven Rückgang der antiviralen Immunität führt. Dies zeigte sich in einer stark verminderten Synthese antiviraler Zytokine und einer erhöhten viralen Infektionsrate der entsprechenden Zellen. Die Autoren schlussfolgerten, dass das mitochondriale Membranpotential notwendig sei, um die antivirale Signaltransduktion auf der Ebene von MAVS suffizient ablaufen zu lassen [24].

Im Rahmen der hier durchgeführten Experimente konnte nachgewiesen werden, dass auch die Depletion von CRIF1 zu einem deutlichen Rückgang des mitochondrialen Membranpotentials führt (vgl. 3.2.2 und 3.5.1). Gleichwohl ist damit keine Verminderung, sondern vielmehr eine Steigerung der antiviralen Zytokinproduktion – auf mRNA- und Proteinebene, nach poly I:C-Transfektion wie auch nach VSV-Infektion – verbunden. In einer Wiederholung der Experimente von Koshiha et al. hingegen konnte deren grundlegende Behauptung bestätigt werden: Auch die in dieser Arbeit untersuchten MEF reagieren auf die Anwendung von FCCP mit einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (quantitativ der Reduktion von $\Delta\psi_m$ in CRIF1^{-/-} MEF überlegen) sowie einer massiven Abnahme der Immunantwort.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diese divergierenden Resultate zeigt sich mit Blick auf die verwendete Methodik. FCCP oder CCCP sorgen als Protonophore für eine Depolarisation von $\Delta\psi_m$ durch Porenbildung in der inneren mitochondrialen Membran, wodurch der elektrochemische Gradient an der ATP-Synthase vorbei ausgeglichen (entkoppelt) werden kann. Der *knock-out* von CRIF1 hingegen lässt die innere mitochondriale Membran primär intakt, die Reduktion von $\Delta\psi_m$ basiert vielmehr auf dem Fehlen der die Protonen translokalisierenden Atmungskettenkomplexe; die Bildung des Membranpotentials ist also gestört. Somit könnte geschlussfolgert

werden, dass nicht $\Delta\psi_m$ selbst, sondern die Integrität der inneren mitochondrialen Membran wichtig für MAVS-basierte antivirale Signalwege ist.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass das mitochondriale Membranpotential in einer basalen Grundausprägung Voraussetzung für die RLR-Kaskade ist: Demnach würde nicht die deutliche Abnahme von $\Delta\psi_m$ unter CRIF1 *knock-out*, aber sehr wohl der vollständige Zusammenbruch des Membranpotentials unter Einsatz chemischer Entkoppler zu einem Abbruch der Zytokinproduktion führen. So wurde der vollständige Zusammenbruch von $\Delta\psi_m$ durch FCCP in der Literatur bereits mehrfach mit einer Fragmentierung und Degradation des mitochondrialen Netzwerkes in Verbindung gebracht [158-160].

4.5 Ursachen der gesteigerten viralen Suszeptibilität in CRIF1 -/- MEF

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich eine Zunahme der Zytokinproduktion bei VSV-Infektion nach CRIF1 *knock-out*. Durch diese Ergebnisse wird die Immunantwort der Zellen nach Aktivierung von RIG-I abgebildet; Kato et al. konnten zeigen, dass negative RNA-Einzelstrang-Viren wie VSV primär über RIG-I und nicht mittels MDA5 detektiert werden [161].

Neben dieser gesteigerten Immunantwort konnte in denselben Zellen allerdings auch eine verstärkte Viruslast detektiert werden (vgl. 3.7.3 und 3.9.1). Erstaunlicherweise zeigen die CRIF1 -/- MEF eine ähnlich erhöhte virale Suszeptibilität wie es Koshiba et al. nach Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials beschrieben haben [24]. Allerdings scheint es im Rahmen dieser Arbeit unwahrscheinlich, dass die Ursache hierfür, wie bei Koshiba et al. diskutiert, in einer verminderten antiviralen Aktivität zu suchen ist (vgl. 4.4).

4.5.1 Gesteigerte virale Suszeptibilität kann nicht durch veränderte Rezeptor-Expression oder gesteigerte Zellpermeabilität erklärt werden

Alternativ könnte es sein, dass durch den CRIF1 *knock-out* im Grunde keine Zunahme der Aktivität von MAVS oder der RLR-Signalkaskade im Allgemeinen, sondern vielmehr eine Alteration des Aufnahmeverhaltens gegenüber Viren hervorgerufen wird. Die quantitative Zunahme der Virusinfektion würde dann sequentiell zu einer entsprechend gesteigerten antiviralen Aktivität der Zellen führen.

Die Rezeptor-gestützte Internalisierung von VSV wird durch Clathrin-vermittelte Mechanismen umgesetzt [162]. Frühere Darstellungen betrachteten Phosphatidylserin als für den viralen *Entry*

von VSV entscheidenden Rezeptor der Plasmamembran [163]. Phosphatidylserin wiederum wird im Rahmen (prä-)apoptotischer Prozesse vermehrt auf der Außenseite der Plasmamembran exprimiert [164]. Da der CRIF1 *knock-out* langfristig zum Tod der Zelle führt (vgl. 3.4), könnte somit eine vermehrte Aufnahme der Viren ihre eigentliche Grundlage in der gesteigerten Verfügbarkeit entsprechender Rezeptoren in Folge der protrahierten Apoptose der CRIF1 *-/-* MEF haben. Einschränkend muss hier allerdings angemerkt werden, dass zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung (bis zu vier Tage nach CRIF1 *knock-out*) die Zellviabilität im Normbereich gelegen hat, wie durch mehrere Assays nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.6). Ein manifester apoptotischer Zustand scheint daher als alleinige Erklärung wenig plausibel.

Zudem lehnen neuere Untersuchungen die Fokussierung auf Phosphatidylserin als Oberflächenrezeptor für VSV ab. Ein singulärer Rezeptor ist vielmehr bislang nicht bekannt, postuliert werden zur Zeit noch nicht näher bekannte Interaktionen des VSV mit der Plasmamembran, möglicherweise beeinflusst durch elektrostatische Gegebenheiten [165, 166].

Des Weiteren ist dieser Hypothese entgegen zu halten, dass auch die Stimulationsversuche mit poly I:C zu einer vergleichbaren Zunahme der Zytokinproduktion geführt haben (vgl. 3.7.2). Hierbei wird das Immunstimulanz per Transfektionsreagenz in die Zellen eingeschleust. Da die Aufnahme von poly I:C somit auf grundlegend anderen Mechanismen als die Infektion mit VSV basiert, erscheint ein alteriertes Aufnahmeverhalten der Zellen spezifisch gegenüber VSV als Ursache der gesteigerten Immunkompetenz in CRIF1 *-/-* MEF unwahrscheinlich.

Als Alternative zu Rezeptor-spezifischen Alterationen könnten generelle Veränderungen der zellulären Membranen als ursächlich für ein verstärktes *Entry* angesehen werden. Allerdings war die Aufnahme von LDL-Partikeln in CRIF1 *-/-* MEF nicht substantiell verändert (vgl. 3.9.2.2). Wenn man nun deren Aufnahme als Surrogat für das Internalisierungsverhalten der Zellen per se ansieht, besteht keine unselektiv gesteigerte Substanzaufnahme. Dies kann als Indiz für eine Aufrechterhaltung der zellulären Integrität der Plasmamembran trotz induzierter mitochondrialer Dysfunktion gewertet werden, womit weitreichende Veränderungen, die diesbezüglich den viralen *Entry* erleichtern, weniger leicht vorstellbar scheinen.

4.5.2 Auswirkungen des CRIF1 *knock-outs* auf die Post-Internalisierungs-Phase von VSV

Der vorangehende Abschnitt diskutiert die Möglichkeit, dass der vermehrte Nachweis des VSV N Proteins eine Stunde nach Inkubation durch einen gesteigerten viralen *Entry* in CRIF1-depletierte Zellen erklärt werden könnte. Johannsdottir et al. konnten allerdings zeigen, dass die Internalisierung von VSV innerhalb äußerst kurzer Zeiträume abläuft – die Mehrzahl der Viren erreichte die Endozytose in weniger als 10 Minuten [167]. Ein möglicher Hinweis darauf ergibt sich

aus der massiven Abnahme der VSV N-Protein Level unter Vorbehandlung mit Nocodazole, welches als Inhibitor des viralen Nukleokapsid- und Glykoproteintransportes nicht in den *Entry* von VSV, sehr wohl aber in die Transportvorgänge der post-Internalisierungsphase eingreifen kann. Somit ist es möglich, dass trotz der methodischen Anstrengung, den tatsächlichen *Entry* des VSV abzubilden, die verwendete Methodik - bedingt durch das einstündige Warteintervall bis zur Lamelli-Lyse der Zellen - letztlich zu ungenau war. Unter dieser Annahme wären im Versuchsaufbau nach einer Stunde auch die Prozesse des *Uncoatings* sowie erste Transkriptions- und Translationsvorgänge im Replikationszyklus miterfasst.

Ein durch eine vermehrte ROS-Produktion (vgl. 4.6) verursachter Abfall des intrazellulären pH-Wertes könnte in diesem Zusammenhang einen Effekt ausüben: Das *Uncoating* des VSV ist pH-abhängig und findet unter anderem in späten Endosomen bei pH-Werten um 6,2 statt [162]. Somit wäre – bei tatsächlich eigentlich unverändertem viralen *Entry* über die Plasmamembran – eine Akzeleration des *Uncoatings* durch Optimierung des pH-Wertes vorstellbar. Dadurch ergäbe sich eine früher beginnende virale Replikation, die wiederum ursächlich für die gesteigerten VSV-Protein- und -RNA-Level und mittelbar auch für die zunehmende Zytokinantwort nach Infektion unter CRIF1 *knock-out* sein kann.

4.5.3 Gesteigerte Virusreplikation durch optimierte Energiebereitstellung in CRIF1 -/- MEF

Darüber hinaus könnte der immunologische Warburg-Effekt (vgl. 4.7) mitverantwortlich für die gezeigte Zunahme der VSV-Infektion unter CRIF1 *knock-out* sein. Viren sind unabdingbar auf den Stoffwechselapparat ihrer Wirtszelle angewiesen. Zelluläre aerobe Glykolyse ist dabei für zahlreiche Viren der bevorzugte Weg der Energiebereitstellung, die zu diesem Zwecke häufig auch die Transkription glykolytischer Proteine induzieren [168-171]. Auch für *vesicular stomatitis virus* konnte eine Abhängigkeit von zellulärer Glykolyse nachgewiesen werden [172, 173]. Somit könnte die für Viren optimierte zelluläre Energiebereitstellung in CRIF1 -/- MEF ein weiterer Grund für die beobachtete gesteigerte Virusreplikation in diesen Zellen sein.

4.6 ROS als möglicher CRIF1-abhängiger Modulator der antiviralen Immunität

4.6.1 Der Einfluss von CRIF1 und des mitochondrialen Membranpotentials auf ROS

Unter physiologischen Bedingungen wird die mitochondriale Atmungskette als primärer Produktionsort für ROS angesehen [174]. Trotz des Verlustes zahlreicher Atmungskettenkomplexe unter CRIF1 *knock-out* konnte dennoch gezeigt werden, dass die ROS-Produktion in CRIF1 *-/-* MEF gegenüber den Kontrollzellen deutlich ansteigt [111]. Dies könnte auf eine durch die Deletion von CRIF1 bedingte mitochondriale Dysfunktion oder auch auf eine gesteigerte Glykolyse zurückzuführen sein [175]. Zudem konnte im Rahmen dieser Arbeit dargestellt werden, dass die Expression der Atmungskettenkomplexe durch *knock-out* von CRIF1 ungleichmäßig reduziert wird, womit eine Deregulierung der (verbliebenen) oxidativen Phosphorylierung zum Anstieg der ROS führen könnte.

4.6.2 Der Einfluss von ROS auf die RLR-Signalkaskade

In dysfunktionellen Mitochondrien haben *Tal et al.* erhöhte Level an ROS detektiert. Diese waren verantwortlich für eine gesteigerte RLR-bedingte Interferon-Produktion. Als artifizielle Bestätigung wurde durch den Einsatz von Rotenon ein entsprechender Effekt repliziert [176].

Bereits frühere Arbeiten konnten belegen, dass ROS für eine RIG-I-gesteuerte antivirale Zytokinexpression erforderlich sind [45, 177]. Diese Resultate stützen die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Befunde. So konnten nach CRIF1 *knock-out* ähnliche funktionelle Ergebnisse des mitochondrialen Stoffwechsels wie unter Einsatz von Rotenon erbracht werden (vgl. 3.6). Dies kann als Indiz für eine gesteigerte ROS-Produktion interpretiert werden, die wiederum ursächlich für die Zunahme der antiviralen Zytokinproduktion in MEF CRIF1 *-/-* nach RLR-Stimulation sein könnte.

4.6.3 CRIF1-abhängige Modulation der antiviralen Zytokinproduktion durch ROS

Der ROS-Metabolismus zeichnet sich durch vielfältige Aktivierungs- oder Synthesemöglichkeiten und andererseits umfangreiche antioxidative Schutzmechanismen aus. Dieses komplex in Balance gehaltene System scheint notwendig, um die physiologischen und nützlichen Eigenschaften dieser Radikale zu verwerten und dabei nur das Mindestmaß an zellulären Schäden zu erlauben.

Wie in den in 4.6.1 skizzierten Überlegungen dargelegt, ist es möglich, dass das labile Gefüge „ROS-Homöostase“ durch den CRIF1 *knock-out* in eine kritische Situation gebracht wurde.

Dadurch würde man ROS als die Verbindung zwischen CRIF1 und der antiviralen Immunität postulieren. Einerseits zeigt die RLR-Signalkaskade, wohl durch MAVS-Expression und -Aktivität, eine positive Korrelation zum ROS-Level. Durch den CRIF1 *knock-out* scheint andererseits, möglicherweise durch die Dysfunktion der Mitochondrien und den Translationsabbruch der Atmungskettenkomplexe, eine Erhöhung der ROS-Produktion erklärbar.

Somit könnte die Zunahme der ROS-Level in CRIF1^{-/-} MEF zur Steigerung der antiviralen Aktivität beitragen; CRIF1 wäre damit physiologisch durch Regulation und Suppression der Produktion von O₂⁻ an der Modulation des RLR-MAVS-Signalweges beteiligt.

4.7 Der antivirale Warburg-Effekt: „*trained immunity*“

Durch Messung des intrazellulären Sauerstoffverbrauchs an vitalen MEF zeigte sich, dass die Deletion von CRIF1 zu einer Verminderung des Sauerstoffverbrauches, wie sie im Rahmen anaerober Stoffwechselfvorgänge auftreten, führt. Diese Hypothese bestätigend ist bereits gezeigt worden, dass CRIF1-defiziente Zellen grundlegend ähnlich potent ATP synthetisieren können wie Kontroll-MEF, dies jedoch primär im Rahmen der Glykolyse und entsprechend unter der Voraussetzung eines ausreichend hohen Glukose-Angebotes [111]. Somit kann bestätigt werden, dass der CRIF1 *knock-out* – bedingt durch die verminderte Synthese der Atmungskettenkomplexe – einen Wechsel des Zellmetabolismus von oxidativer Phosphorylierung hin zu aerober Glykolyse hervorruft. Dieser Mechanismus ist in einem anderen Zusammenhang sehr populär - bei maligne transformierten Zellen: So besagt die auf Otto Warburg zurückgehende Hypothese, dass Krebszellen ihren Metabolismus zugunsten der (an)aeroben Glykolyse umstellen [178].

Im Laufe der letzten Jahre wurde erstmals dargestellt, dass auch Immunzellen und Mechanismen der angeborenen Immunität bei Aktivierung ähnliche metabolische Anpassungen vornehmen oder zur Folge haben. Aktivierte Immunzellen verwenden primär Glykolyse als ATP-Produktionsweg [179]. Typ I Interferone modifizieren nach poly I:C Stimulation die Transkriptionsvorgänge der Zielzellen zugunsten der für die Glykolyse relevanten Gene [180]. In Monozyten fördert ein durch Aktivierung von mTOR ausgelöster Signalweg über den Transkriptionsfaktor HIF1 α die Verstoffwechslung von Glucose zu Lactat [181]. *Van der Meer* et al. berichteten vor Kurzem, dass auch das „primitive“ angeborene Immunsystem zu gewissen Adaptionsvorgängen fähig ist. Diese werden als „Training“ bezeichnet. Auf molekularer Ebene geschehen diese Vorgänge durch epigenetische Modifikationen, wodurch eine stärkere Aktivierung, erhöhte Zytokinexpression sowie eine vermehrte (an)aerobe Glykolyse anstelle der klassischen oxidativen Phosphorylierung erreicht werden. Möglicherweise scheint hierbei sogar der metabolische Wechsel hin zur Glykolyse mit damit einhergehendem erhöhten Zucker- und verringertem Sauerstoffbedarf Voraussetzung für das immunologische Training zu sein [182].

Somit erscheint vorstellbar, dass der *knock-out* von CRIF1 ein konserviertes zellmetabolisches Adaptionsprogramm auf immunologische Herausforderungen verstärkt: Ein im Sinne des Warburg-Effektes verstandener Wechsel hin zu glykolytischen Stoffwechselfvorgängen. Gleichwohl verbleibt unklar, ob dieser Anpassungsprozess Ursache¹⁰ oder Voraussetzung¹¹ [183] für eine gesteigerte antivirale Potenz ist.

¹⁰ Beispielsweise durch Bereitstellung höherer Level an ROS (vgl. 4.6.1).

¹¹ Im Sinne einer erheblich rascheren Verfügbarkeit von ATP, dessen Synthese im Rahmen der (an)aeroben Glykolyse zwar ineffizienter, aber deutlich schneller stattfindet.

4.8 Wechselwirkungen zwischen Metabolismus, Struktur und angeborener Immunität: Ein mögliches Modell für die Folgen des CRIF1 *knock-outs*

4.8.1 Dynamik der mitochondrialen Morphologie

Zahlreiche Arbeiten konnten zeigen, dass metabolischer Stress – beispielsweise bedingt durch einen Abfall von $\Delta\psi_m$, eine Einschränkung der OXPHOS-Aktivität oder einen Anstieg der ROS-Level – zu einer stärkeren Fusion der Mitochondrien führt („Stress-induzierte mitochondriale Hyperfusion“) [184-186]. Diese strukturellen Alterationen werden als Kompensationsmechanismus aufgefasst, durch den Funktionseinschränkungen oder Schäden einzelner Mitochondrien durch Zusammenschlüsse zu einem größeren Netzwerk ausgeglichen werden sollen. Ein zu weitreichender Schaden oder Funktionsverlust hingegen resultiert in einer vollständigen Fragmentierung der Mitochondrien im Sinne eines immanenten apoptotischen Prozesses [187].

Castanier et al. beobachteten nach Aktivierung der RLR-Signalkaskade fusionsabhängige morphologische Änderungen der Mitochondrien im Sinne einer verstärkten Netzwerkbildung, wodurch der MAVS-basierte antivirale Signalweg verstärkt wird [100].¹² Durch metabolischen Stress induzierte reaktive Fusionsvorgänge könnten somit die antiviralen Effektoren positiv beeinflussen.¹³

4.8.2 Die Bedeutung des mitochondrialen Netzwerkes für die Bildung von MAVS-Prionen

Hou et al. haben erstmals postuliert, dass MAVS nach Virusinfektion zu Prion-ähnlichen Aggregaten zusammengefügt wird (vgl. 1.2.5); *Jin* et al. konnten zeigen, dass MAVS-Aggregate eine verstärkte antivirale Zytokinantwort aufweisen [96, 188]. Vor kurzem berichteten *Cai* et al., dass die Prionbildung von MAVS RIG-I-abhängig ist und dass es sich bei diesem Prionen-Konzept möglicherweise um ein evolutionär konserviertes Struktur- und Aktivierungsmerkmal zumindest bei Immunrezeptoren handelt [189]. *Shi* et al. schließlich haben einen Regulationsmechanismus vorgeschlagen, nachdem MAVS in nicht-stimulierten Zellen in einem Zustand der Selbstinhibition vorliegt [190]. Durch die Prionen-Formung würden sich bis dahin gegenseitig blockierende Signalelemente frei gelegt und damit die nachgeordnete antivirale Signalkaskade aktiviert.

¹² Dies konnte sowohl für Virusinfektionen als auch für artifizielle Stimulation mittels poly I:C nachgewiesen werden.

¹³ FCCP hingegen verursacht keinen „metabolischen Stress“, sondern führt über chemische Entkoppelung zur vollständigen mitochondrialen Fragmentierung und Funktionsverlust, vgl. 4.4.

Es erscheint vorstellbar, dass die MAVS-Aktivierung im Sinne einer Prion-Bildung und insbesondere der nachfolgend ablaufende Prozess der MAVS-Selbstaktivierung durch Umwandlung nativen MAVS mittels Prion-MAVS in entsprechende neue Aggregate, durch Fusionsprozesse, ein vergrößertes und dichteres mitochondriales Netzwerk und damit einhergehend räumliche Annäherung leichter und insbesondere schneller ablaufen kann.

4.8.3 Zusammenfassende Hypothese über die metabolisch-strukturell-immunologischen Folgen des CRIF1 *knock-outs*

Die in 4.8.1 und 4.8.2 beschriebenen Überlegungen könnten eine Erklärung für die in der Literatur bereits mehrfach gezeigten Verstärkungseffekte mitochondrialer Fusion auf die antivirale Immunität liefern. Ebenso könnten die durch CRIF1 *knock-out* erzeugten metabolischen Effekte über derartige strukturelle Konsequenzen die ermittelten Auswirkungen auf die angeborene antivirale intrazelluläre Immunität erklären: Durch den mittels Deletion von CRIF1 hervorgerufenen Translationsabbruch der Atmungskettenproteine kommt es zu einem deutlichen Rückgang des zellulären Sauerstoffverbrauches und des mitochondrialen Membranpotentials, wahrscheinlich bei gleichzeitigem Anstieg der ROS-Level. Dieser metabolische Stress führt im Sinne eines Kompensationsmechanismus zu Fusion und Netzwerk-Vergrößerung/-Verdichtung der Mitochondrien. In diesem Zustand einlaufende RLR-vermittelte antivirale Signale führen zu einer verstärkten und beschleunigten MAVS-Prionbildung und in Folge dessen zu steigenden antiviralen Zytokinleveln (Abbildung 4.1).

Dies würde in Einklang stehen mit anderen im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen: Ohne Stimulation sind keine signifikanten Alterationen der Zytokinproduktion darstellbar, was bei fehlenden MAVS-Prionen und daher autoinhibitorischem Zustand auch nicht zu erwarten wäre. Zudem ist der positive Effekt des CRIF1 *knock-outs* durch Blockade des IFNAR zu durchbrechen, da selbst bei erleichterter Prionen-Bildung eine suffiziente antivirale Immunantwort auf die Selbstverstärkungspotenz der Typ I Interferone angewiesen ist. Auch das gegenläufige Bild bei FCCP-bedingtem Zusammenbruch des Membranpotentials scheint schlüssig, da, wie oben dargestellt, chemische Entkoppler einen dramatisch stärkeren Effekt auf das Membranpotential haben als der vergleichsweise „langsame“ Verlust von Proteinexpression durch CRIF1 *knock-out*. Infolge dessen sind FCCP-behandelte Mitochondrien nicht mehr in der Lage, ihre Funktionseinschränkung durch Fusionsprozesse zu kompensieren und zeigen stattdessen fragmentierte Strukturen.

Gemäß dem vorgeschlagenen Modell, hätte also der *knock-out* von CRIF1 unmittelbare metabolische Folgen, die sich im Weiteren auf die Struktur der Mitochondrien auswirken und dadurch wiederum, möglicherweise in Verbindung mit dem veränderten Metabolismus, die Voraussetzungen für eine gesteigerte antivirale Aktivität bilden. Somit wäre CRIF1 in seiner physiologischen

Funktion ein Faktor, der das mitochondriale Netzwerk in metabolisch-struktureller Homöostase hält und damit einer überschießenden Antwort der angeborenen intrazellulären antiviralen Immunität entgegenwirkt.

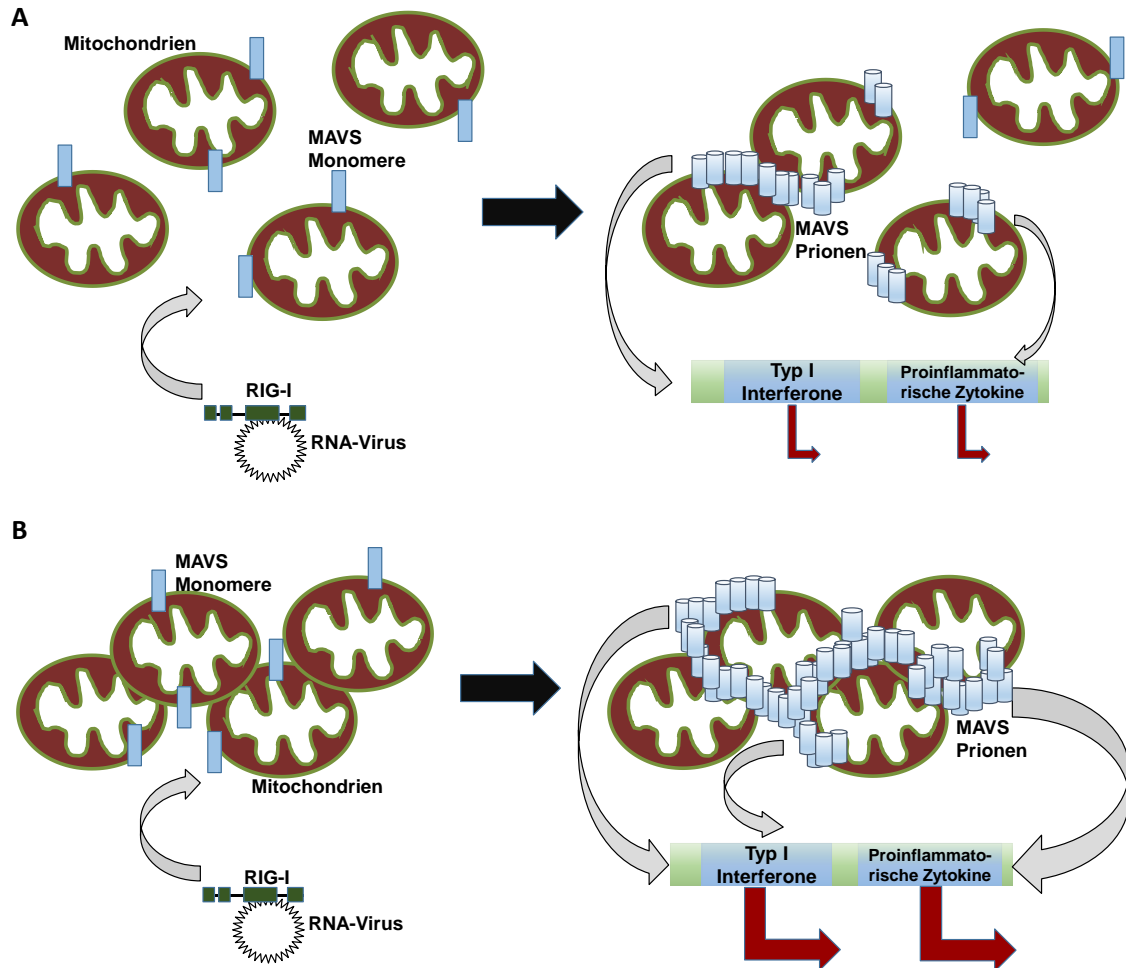


Abbildung 4.1 Verstärkte antivirale Immunantwort durch mitochondriale Fusion und Netzwerkintensivierung nach CRIF1 *knock-out*. (A) Die Aktivierung von RLRs wie RIG-I durch RNA-Viren initiiert durch CARD-CARD-Interaktionen zwischen RIG-I und MAVS eine antivirale Signal- und Effektor-Kaskade. Nach Auslösung entwickelt sich eine selbst erhaltende und verstärkende MAVS-Prionen-Bildung, infolge derer auch die nachgeordneten Signalkinasen und Transkriptionsfaktoren aktiviert werden und die Produktion von Typ I Interferonen und proinflammatorischen Zytokinen beginnt. (B) Nach *knock-out* von CRIF1 ergeben sich eine Reihe metabolischer Änderungen wie der Verlust der Atmungskettenkomplexe, eine Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials oder eine Abnahme des intrazellulären Sauerstoffverbrauches. Diese und andere metabolische Stressoren (insbesondere ROS) bedingen als kompensatorische Antwort hierauf ein Überwiegen mitochondrialer Fusionsprozesse und somit eine intensiviertere – auch dreidimensionale – Netzwerkbildung. Hierdurch wird nach Virusinfektion die RLR-initiierte MAVS-Prionenbildung verstärkt und vereinfacht. Dadurch ergibt sich ebenso eine gesteigerte Aktivierung der nachfolgenden Signalkaskade und somit eine erhöhte Syntheserate an antiviralen Effektoren. Schematische Darstellung.

5 Zusammenfassung

Die Mitglieder der RIG-I like Helikasen sind zytoplasmatische Mustererkennungsrezeptoren des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen virale RNA im Zytoplasma infizierter Zellen und lösen in der Folge eine Signalkaskade über den mitochondrial lokalisierten Adapter MAVS aus, die ein transkriptionelles Genprogramm induziert, das die Replikation und Vermehrung des Virus in den befallenen und benachbarten Zellen erschwert.

Die Suche nach Interaktionspartnern von RIG-I in unserer Arbeitsgruppe hatte in einem Experiment, das Proteine, die mit RIG-I co-immunopräzipitieren, massenspektrometrisch analysierte, das mitochondriale Protein CRIF1 als potentiellen Interaktionspartner von RIG-I identifiziert. Auch wenn sich die direkte Interaktion mit RIG-I als Artefakt herausstellte, hatten die Daten gezeigt, dass die Herunterregulierung von CRIF1 mittels siRNA zu einer verstärkten Replikation von RNA-Viren und zu einer verminderten Produktion von Interferon-induzierten Zytokinen führt.

Für die *loss of function* Experimente waren ein siRNA-vermittelter Knock-down verwendet worden. Da die Applikation von siRNA-Molekülen in der Untersuchung von RNA-erkennenden Mustererkennungsrezeptoren problematisch und fehleranfällig ist, sollte diese Beobachtung, die CRIF1 eine Rolle in der antiviralen Immunität zuschreibt, mit einer weiteren - immunologisch weniger Einfluss nehmende Methode - validiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher durch stabile Integration eines Cre-Rekombinase Konstruktes unter einem Doxycyclin-induzierbaren Promoter in einer murinen embryonalen Fibroblasten Zelllinie, in der CRIF1 von *LoxP sites* flankiert wird, ein stabiles induzierbares CRIF1 *knock-out*-System etabliert. Mit diesem erfolgte dann eine funktionelle Charakterisierung des Proteins CRIF1, insbesondere in Hinblick auf seine Bedeutung für den mitochondrialen Metabolismus und mittelbar für die angeborene intrazelluläre antivirale Immunität.

Die Depletion von CRIF1 bewirkte in diesem System nach Stimulation von MDA5 mittels poly I:C sowie nach durch RIG-I detektierter Infektion mit *Vesicular Stomatitis Virus* eine erhebliche Zunahme der Produktion an Typ-I Interferonen und pro-inflammatorischen Zytokinen gegenüber den Wildtyp-Kontrollen. Diese zentralen Effektoren des antiviralen Systems stehen damit für eine deutlich gesteigerte Aktivität der RLR-Signalkaskade nach CRIF1 *knock-out*. Zudem zeigen MEF CRIF1 *-/-* eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Infektion mit VSV, darstellbar durch eine höhere Zahl infizierter Zellen und eine verstärkte Expression viraler Proteine. In metabolischer Hinsicht

konnte eine Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials unter CRIF1 Depletion detektiert werden. Dies wird mutmaßlich durch den sich nach Verlust von CRIF1 einstellenden Expressionsabbruch fast aller mitochondrial kodierten Komponenten der Atmungskettenkomplexe hervorgerufen. Damit einhergehend zeigte sich funktionell eine Reduktion des intrazellulären Sauerstoffverbrauches in diesen Zellen.

Seit ihrer Entdeckung als primäres Organell des zellulären Energiestoffwechsels wurden zahlreiche Erkenntnisse über zusätzliche immunologische Funktionen der Mitochondrien gewonnen. Eine fundamentale Bedeutung der Mitochondrien als Signalknotenpunkt der zellulären Immunologie ist mittlerweile nicht nur generell akzeptiert, sie werden vielmehr als kritisches Element angesehen, als „[...] Herz der Immunität“ [191].

Durch die Charakterisierung der metabolischen und immunologischen Bedeutung von CRIF1 liefert die vorliegende Arbeit weitere Erkenntnisse über die bedeutenden Wechselwirkungen zwischen Mitochondrien, zellulärem Metabolismus und MAVS-basierter antiviraler Immunität.

6 Literaturverzeichnis

1. Andersson, S.G. and C.G. Kurland, *Origins of mitochondria and hydrogenosomes*. *Curr Opin Microbiol*, 1999. **2**(5): p. 535-41.
2. Andersson, S.G., et al., *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. *Nature*, 1998. **396**(6707): p. 133-40.
3. McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, *Mitochondria: more than just a powerhouse*. *Curr Biol*, 2006. **16**(14): p. R551-60.
4. Taanman, J.W., *The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1410**(2): p. 103-23.
5. Maximov, V., et al., *Mitochondrial 16S rRNA gene encodes a functional peptide, a potential drug for Alzheimer's disease and target for cancer therapy*. *Med Hypotheses*, 2002. **59**(6): p. 670-3.
6. DiMauro, S. and E.A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases*. *N Engl J Med*, 2003. **348**(26): p. 2656-68.
7. Conley, K.E., *Mitochondria to motion: optimizing oxidative phosphorylation to improve exercise performance*. *J Exp Biol*, 2016. **219**(Pt 2): p. 243-9.
8. Granata, S., et al., *Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease*. *Nutr Metab (Lond)*, 2015. **12**: p. 49.
9. Hajnoczky, G., et al., *Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis*. *Cell Calcium*, 2006. **40**(5-6): p. 553-60.
10. Barupala, D.P., et al., *Synthesis, Delivery and Regulation of Eukaryotic Heme and Fe-S Cluster Cofactors*. *Arch Biochem Biophys*, 2016.
11. Gatliff, J. and M. Campanella, *TSPO: kaleidoscopic 18-kDa amid biochemical pharmacology, control and targeting of mitochondria*. *Biochem J*, 2016. **473**(2): p. 107-21.
12. Green, D.R., *Apoptotic pathways: the roads to ruin*. *Cell*, 1998. **94**(6): p. 695-8.
13. Skulachev, V.P., *Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms*. *Mol Aspects Med*, 1999. **20**(3): p. 139-84.
14. Weinberg, S.E., L.A. Sena, and N.S. Chandel, *Mitochondria in the regulation of innate and adaptive immunity*. *Immunity*, 2015. **42**(3): p. 406-17.

15. Cooper, G.M., *The Mechanism of Oxidative Phosphorylation*. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000(Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9885/>).
16. Mitchell, P., *Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism*. Nature, 1961. **191**(4784): p. 144-148.
17. Prebble, J.N., *Contrasting Approaches to a Biological Problem: Paul Boyer, Peter Mitchell and the Mechanism of the ATP Synthase, 1961–1985*. Journal of the History of Biology, 2012. **46**(4): p. 699-737.
18. Brownlee, M., *Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 813-20.
19. Chen, L.B., *Mitochondrial membrane potential in living cells*. Annu Rev Cell Biol, 1988. **4**: p. 155-81.
20. Scorrano, L., et al., *A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis*. Dev Cell, 2002. **2**(1): p. 55-67.
21. Gottlieb, E., et al., *Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis*. Cell Death Differ, 2003. **10**(6): p. 709-17.
22. Zamzami, N., et al., *Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 367-77.
23. Zamzami, N., et al., *Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death in vivo*. J Exp Med, 1995. **181**(5): p. 1661-72.
24. Koshiba, T., et al., *Mitochondrial membrane potential is required for MAVS-mediated antiviral signaling*. Sci Signal, 2011. **4**(158): p. ra7.
25. Perl, A., et al., *Mitochondrial hyperpolarization: a checkpoint of T-cell life, death and autoimmunity*. Trends Immunol, 2004. **25**(7): p. 360-7.
26. Nagy, G., et al., *Nitric oxide, mitochondrial hyperpolarization, and T cell activation*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(11): p. 1625-31.
27. Commoner, B., J. Townsend, and G.E. Pake, *Free radicals in biological materials*. Nature, 1954. **174**(4432): p. 689-91.
28. Liemburg-Apers, D.C., et al., *Interactions between mitochondrial reactive oxygen species and cellular glucose metabolism*. Arch Toxicol, 2015. **89**(8): p. 1209-26.
29. Fridovich, I., *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 97-112.
30. Tsan, M.F., et al., *Induction of TNF-alpha and MnSOD by endotoxin: role of membrane CD14 and Toll-like receptor-4*. Am J Physiol Cell Physiol, 2001. **280**(6): p. C1422-30.
31. Ham, A.J. and D.C. Liebler, *Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria*. Biochemistry, 1995. **34**(17): p. 5754-61.

32. Radi, R., et al., *Detection of catalase in rat heart mitochondria*. J Biol Chem, 1991. **266**(32): p. 22028-34.
33. Oori, Y., *The cytochrome c peroxidase activity of cytochrome oxidase*. J Biol Chem, 1982. **257**(16): p. 9246-8.
34. Bindoli, A., L. Cavallini, and P. Jocelyn, *Mitochondrial lipid peroxidation by cumene hydroperoxide and its prevention by succinate*. Biochim Biophys Acta, 1982. **681**(3): p. 496-503.
35. Chance, B., H. Sies, and A. Boveris, *Hydroperoxide metabolism in mammalian organs*. Physiol Rev, 1979. **59**(3): p. 527-605.
36. Droge, W., *Free radicals in the physiological control of cell function*. Physiol Rev, 2002. **82**(1): p. 47-95.
37. Sena, L.A. and N.S. Chandel, *Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species*. Mol Cell, 2012. **48**(2): p. 158-67.
38. Chandel, N.S., et al., *Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(20): p. 11715-20.
39. Keyse, S.M. and R.M. Tyrrell, *Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(1): p. 99-103.
40. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. EMBO J, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
41. Ignarro, L.J. and P.J. Kadowitz, *The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1985. **25**: p. 171-91.
42. Radomski, M.W., R.M. Palmer, and S. Moncada, *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. Lancet, 1987. **2**(8567): p. 1057-8.
43. Fang, F.C., *Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(10): p. 820-32.
44. Kim, H.J., et al., *Reactive oxygen species induce antiviral innate immune response through IFN-lambda regulation in human nasal epithelial cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **49**(5): p. 855-65.
45. Olagnier, D., et al., *Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic programs in dengue virus-infected dendritic cells*. PLoS Pathog, 2014. **10**(12): p. e1004566.
46. Gamblin, S.J., et al., *The Structure and Receptor Binding Properties of the 1918 Influenza Hemagglutinin*. Science, 2004. **303**(5665): p. 1838-1842.

47. Andreas, A., et al., *Is there a way out for the 2014 Ebola outbreak in Western Africa?* Asian Pac J Trop Med, 2015. **8**(10): p. 773-8.
48. Alberts B, J.A., Lewis J, et al., *Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; Innate Immunity. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26846/>. 2002.*
49. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity.* Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
50. Schmidt, A., S. Endres, and S. Rothenfusser, *Pattern recognition of viral nucleic acids by RIG-I-like helicases.* J Mol Med (Berl), 2011. **89**(1): p. 5-12.
51. Huysamen, C. and G.D. Brown, *The fungal pattern recognition receptor, Dectin-1, and the associated cluster of C-type lectin-like receptors.* FEMS Microbiol Lett, 2009. **290**(2): p. 121-8.
52. Kim, Y.K., J.S. Shin, and M.H. Nahm, *NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases.* Yonsei Med J, 2016. **57**(1): p. 5-14.
53. Ablasser, A., et al., *RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate.* Nat Immunol, 2009. **10**(10): p. 1065-72.
54. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity.* Int Immunol, 2005. **17**(1): p. 1-14.
55. Yoneyama, M. and T. Fujita, *RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity.* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(5-6): p. 545-51.
56. Yoneyama, M., et al., *The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.* Nat Immunol, 2004. **5**(7): p. 730-7.
57. Andrejeva, J., et al., *The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(49): p. 17264-9.
58. Rothenfusser, S., et al., *The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I.* J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5260-8.
59. Dixit, E. and J.C. Kagan, *Intracellular pathogen detection by RIG-I-like receptors.* Adv Immunol, 2013. **117**: p. 99-125.
60. Monroe, K.M., S.M. McWhirter, and R.E. Vance, *Identification of host cytosolic sensors and bacterial factors regulating the type I interferon response to Legionella pneumophila.* PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000665.
61. Chiu, Y.H., J.B. Macmillan, and Z.J. Chen, *RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway.* Cell, 2009. **138**(3): p. 576-91.
62. Yoneyama, M., et al., *Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity.* J Immunol, 2005. **175**(5): p. 2851-8.

63. Kawasaki, T., T. Kawai, and S. Akira, *Recognition of nucleic acids by pattern-recognition receptors and its relevance in autoimmunity*. Immunol Rev, 2011. **243**(1): p. 61-73.
64. Goubau, D., S. Deddouche, and C. Reis e Sousa, *Cytosolic sensing of viruses*. Immunity, 2013. **38**(5): p. 855-69.
65. Berke, I.C., Y. Li, and Y. Modis, *Structural basis of innate immune recognition of viral RNA*. Cell Microbiol, 2013. **15**(3): p. 386-94.
66. Kowalinski, E., et al., *Structural basis for the activation of innate immune pattern-recognition receptor RIG-I by viral RNA*. Cell, 2011. **147**(2): p. 423-35.
67. Komuro, A. and C.M. Horvath, *RNA- and virus-independent inhibition of antiviral signaling by RNA helicase LGP2*. J Virol, 2006. **80**(24): p. 12332-42.
68. Bruns, A.M., et al., *The innate immune sensor LGP2 activates antiviral signaling by regulating MDA5-RNA interaction and filament assembly*. Mol Cell, 2014. **55**(5): p. 771-81.
69. Satoh, T., et al., *LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(4): p. 1512-7.
70. Bruns, A.M. and C.M. Horvath, *LGP2 synergy with MDA5 in RLR-mediated RNA recognition and antiviral signaling*. Cytokine, 2015. **74**(2): p. 198-206.
71. De Andrea, M., et al., *The interferon system: an overview*. Eur J Paediatr Neurol, 2002. **6 Suppl A**: p. A41-6; discussion A55-8.
72. Maher, S.G., et al., *Interferon: cellular executioner or white knight?* Curr Med Chem, 2007. **14**(12): p. 1279-89.
73. Davidson, S., M.K. Maini, and A. Wack, *Disease-promoting effects of type I interferons in viral, bacterial, and coinfections*. J Interferon Cytokine Res, 2015. **35**(4): p. 252-64.
74. Kang, D.C., et al., *Expression analysis and genomic characterization of human melanoma differentiation associated gene-5, mda-5: a novel type I interferon-responsive apoptosis-inducing gene*. Oncogene, 2004. **23**(9): p. 1789-800.
75. Hervas-Stubbs, S., et al., *Direct effects of type I interferons on cells of the immune system*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2619-27.
76. Perry, A.K., et al., *The host type I interferon response to viral and bacterial infections*. Cell Res, 2005. **15**(6): p. 407-22.
77. Beutler, B. and A. Cerami, *Cachectin and tumour necrosis factor as two sides of the same biological coin*. Nature, 1986. **320**(6063): p. 584-8.
78. Carswell, E.A., et al., *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(9): p. 3666-70.

79. Coppo, L. and P. Ghezzi, *Thiol regulation of pro-inflammatory cytokines and innate immunity: protein S-thiolation as a novel molecular mechanism*. *Biochem Soc Trans*, 2011. **39**(5): p. 1268-72.
80. Bradley, J.R., *TNF-mediated inflammatory disease*. *J Pathol*, 2008. **214**(2): p. 149-60.
81. Hehlhans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. *Immunology*, 2005. **115**(1): p. 1-20.
82. Ehlers, S., *Role of tumour necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF*. *Ann Rheum Dis*, 2003. **62 Suppl 2**: p. ii37-42.
83. Smith, C.A., et al., *A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins*. *Science*, 1990. **248**(4958): p. 1019-23.
84. Kawai, T., et al., *IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(10): p. 981-8.
85. Meylan, E., et al., *Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus*. *Nature*, 2005. **437**(7062): p. 1167-72.
86. Xu, L.G., et al., *VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN-beta signaling*. *Mol Cell*, 2005. **19**(6): p. 727-40.
87. Dixit, E., et al., *Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity*. *Cell*, 2010. **141**(4): p. 668-81.
88. Horner, S.M., et al., *Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(35): p. 14590-5.
89. Seth, R.B., et al., *Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF-kappaB and IRF 3*. *Cell*, 2005. **122**(5): p. 669-82.
90. Saha, S.K., et al., *Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif*. *EMBO J*, 2006. **25**(14): p. 3257-63.
91. Shi, C.S., et al., *SARS-coronavirus open reading frame-9b suppresses innate immunity by targeting mitochondria and the MAVS/TRAF3/TRAF6 signalosome*. *J Immunol*, 2014. **193**(6): p. 3080-9.
92. Koshiha, T., *[Mitochondria and antiviral immunity]*. *Seikagaku*, 2013. **85**(5): p. 336-44.
93. Baril, M., et al., *MAVS dimer is a crucial signaling component of innate immunity and the target of hepatitis C virus NS3/4A protease*. *J Virol*, 2009. **83**(3): p. 1299-311.
94. Guo, B. and G. Cheng, *Modulation of the interferon antiviral response by the TBK1/IKKi adaptor protein TANK*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 11817-26.
95. Michallet, M.C., et al., *TRADD protein is an essential component of the RIG-like helicase antiviral pathway*. *Immunity*, 2008. **28**(5): p. 651-61.

96. Hou, F., et al., *MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response*. Cell, 2011. **146**(3): p. 448-61.
97. Westermann, B., *Mitochondrial fusion and fission in cell life and death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 872-84.
98. Martinou, J.C. and R.J. Youle, *Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics*. Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 92-101.
99. Okamoto, K. and J.M. Shaw, *Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes*. Annu Rev Genet, 2005. **39**: p. 503-36.
100. Castanier, C., et al., *Mitochondrial dynamics regulate the RIG-I-like receptor antiviral pathway*. EMBO Rep, 2010. **11**(2): p. 133-8.
101. Yasukawa, K., et al., *Mitofusin 2 inhibits mitochondrial antiviral signaling*. Sci Signal, 2009. **2**(84): p. ra47.
102. Onoguchi, K., et al., *Virus-infection or 5'ppp-RNA activates antiviral signal through redistribution of IPS-1 mediated by MFN1*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1001012.
103. Chung, H.K., et al., *CR6-interacting factor 1 interacts with Gadd45 family proteins and modulates the cell cycle*. J Biol Chem, 2003. **278**(30): p. 28079-88.
104. Zhang, X., et al., *Cell cycle arrest of Jurkat cells by leukemic bone marrow stromal cells: possible mechanisms and involvement of CRIF1*. Transplant Proc, 2011. **43**(7): p. 2770-3.
105. Kang, H.J., et al., *CR6-interacting factor 1 (CRIF1) regulates NF-E2-related factor 2 (NRF2) protein stability by proteasome-mediated degradation*. J Biol Chem, 2010. **285**(28): p. 21258-68.
106. Kwon, M.C., et al., *Essential role of CR6-interacting factor 1 (Crif1) in E74-like factor 3 (ELF3)-mediated intestinal development*. J Biol Chem, 2009. **284**(48): p. 33634-41.
107. Kwon, M.C., et al., *Crif1 is a novel transcriptional coactivator of STAT3*. EMBO J, 2008. **27**(4): p. 642-53.
108. Suh, J.H., et al., *CR6-interacting factor 1 represses the transactivation of androgen receptor by direct interaction*. Mol Endocrinol, 2008. **22**(1): p. 33-46.
109. Oh, N.S., et al., *Phosphorylation of CKBBP2/CRIF1 by protein kinase CKII promotes cell proliferation*. Gene, 2007. **386**(1-2): p. 147-53.
110. Park, K.C., et al., *CR6-interacting factor 1 interacts with orphan nuclear receptor Nur77 and inhibits its transactivation*. Mol Endocrinol, 2005. **19**(1): p. 12-24.
111. Kim, S.J., et al., *CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane*. Cell Metab, 2012. **16**(2): p. 274-83.
112. Gaddy, D.F. and D.S. Lyles, *Vesicular stomatitis viruses expressing wild-type or mutant M proteins activate apoptosis through distinct pathways*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4170-9.

113. Mathur, A., et al., *Evaluation of fluorescent dyes for the detection of mitochondrial membrane potential changes in cultured cardiomyocytes*. Cardiovasc Res, 2000. **46**(1): p. 126-38.
114. Paul Held, K.N., Dee Shen, Wayne Patton, *Fluorescent Detection of Drug-Induced Mitochondrial Toxicity* BioTek Application Note, 2010: p. 2.
115. Heytler, P.G. and W.W. Prichard, *A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones*. Biochem Biophys Res Commun, 1962. **7**: p. 272-5.
116. Steenwijk, M.D., et al., *Unraveling the relationship between regional gray matter atrophy and pathology in connected white matter tracts in long-standing multiple sclerosis*. Hum Brain Mapp, 2015. **36**(5): p. 1796-807.
117. Sauer, B. and N. Henderson, *Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(14): p. 5166-70.
118. Hoess, R.H., M. Ziese, and N. Sternberg, *P1 site-specific recombination: nucleotide sequence of the recombining sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(11): p. 3398-402.
119. Kohan, D.E., *Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease*. Kidney Int, 2008. **74**(4): p. 427-37.
120. Peitz, M., et al., *Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4489-94.
121. van Bracht, E., et al., *Enhanced cellular uptake of albumin-based lyophilisomes when functionalized with cell-penetrating peptide TAT in HeLa cells*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e110813.
122. Joshi, S.K., K. Hashimoto, and P.A. Koni, *Induced DNA recombination by Cre recombinase protein transduction*. Genesis, 2002. **33**(1): p. 48-54.
123. Gossen, M. and H. Bujard, *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(12): p. 5547-51.
124. Lee, Y.B., et al., *Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors*. Exp Physiol, 2005. **90**(1): p. 33-7.
125. Wissmann, A., et al., *Tn10 tet operator mutations affecting Tet repressor recognition*. Nucleic Acids Res, 1986. **14**(10): p. 4253-66.
126. Corbel, S.Y. and F.M. Rossi, *Latest developments and in vivo use of the Tet system: ex vivo and in vivo delivery of tetracycline-regulated genes*. Curr Opin Biotechnol, 2002. **13**(5): p. 448-52.
127. Loew, R., et al., *Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression*. BMC Biotechnol, 2010. **10**: p. 81.

128. Nishijima, H., et al., *Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion system*. Biosci Trends, 2009. **3**(5): p. 161-7.
129. Hillen, W. and C. Berens, *Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance*. Annu Rev Microbiol, 1994. **48**: p. 345-69.
130. Gossen, M., et al., *Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells*. Science, 1995. **268**(5218): p. 1766-9.
131. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
132. Palchetti, S., et al., *Transfected poly(I:C) activates different dsRNA receptors, leading to apoptosis or immunoadjuvant response in androgen-independent prostate cancer cells*. J Biol Chem, 2015. **290**(9): p. 5470-83.
133. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
134. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.
135. Wu, M., et al., *Multiparameter metabolic analysis reveals a close link between attenuated mitochondrial bioenergetic function and enhanced glycolysis dependency in human tumor cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C125-36.
136. Chopra, I. and M. Roberts, *Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance*. Microbiol Mol Biol Rev, 2001. **65**(2): p. 232-60 ; second page, table of contents.
137. Riesbeck, K., A. Bredberg, and A. Forsgren, *Ciprofloxacin does not inhibit mitochondrial functions but other antibiotics do*. Antimicrob Agents Chemother, 1990. **34**(1): p. 167-9.
138. Fang, D.F., et al., *RAD23A negatively regulates RIG-I/MDA5 signaling through promoting TRAF2 polyubiquitination and degradation*. Biochem Biophys Res Commun, 2013.
139. Eilers, U., J. Klumperman, and H.P. Hauri, *Nocodazole, a microtubule-active drug, interferes with apical protein delivery in cultured intestinal epithelial cells (Caco-2)*. J Cell Biol, 1989. **108**(1): p. 13-22.
140. Cid-Arregui, A., et al., *Nocodazole-dependent transport, and brefeldin A--sensitive processing and sorting, of newly synthesized membrane proteins in cultured neurons*. J Neurosci, 1995. **15**(6): p. 4259-69.
141. Yacovone, S.K., et al., *Migration of Nucleocapsids in Vesicular Stomatitis Virus-Infected Cells Is Dependent on both Microtubules and Actin Filaments*. J Virol, 2016. **90**(13): p. 6159-70.

142. Zhang, X., et al., *Crif1 Promotes Adipogenic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells After Irradiation by Modulating the PKA/CREB Signaling Pathway*. *Stem Cells*, 2015. **33**(6): p. 1915-26.
143. Ryu, M.J., et al., *Crif1 Deficiency Reduces Adipose OXPHOS Capacity and Triggers Inflammation and Insulin Resistance in Mice*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(3): p. e1003356.
144. Byun, J., et al., *CR6-interacting factor 1 is a key regulator in Abeta-induced mitochondrial disruption and pathogenesis of Alzheimer's disease*. *Cell Death Differ*, 2015. **22**(6): p. 959-73.
145. Lim, S.J., et al., *Requirement for CRIF1 in RNA interference and Dicer-2 stability*. *RNA Biol*, 2014. **11**(9): p. 1171-9.
146. Saleh, M.C., et al., *Antiviral immunity in Drosophila requires systemic RNA interference spread*. *Nature*, 2009. **458**(7236): p. 346-50.
147. Reikine, S., J.B. Nguyen, and Y. Modis, *Pattern Recognition and Signaling Mechanisms of RIG-I and MDA5*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 342.
148. Honda, K., et al., *Regulation of the type I IFN induction: a current view*. *Int Immunol*, 2005. **17**(11): p. 1367-78.
149. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. *EMBO J*, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
150. Sato, M., et al., *Positive feedback regulation of type I IFN genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7*. *FEBS Lett*, 1998. **441**(1): p. 106-10.
151. Schoggins, J.W. and C.M. Rice, *Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions*. *Curr Opin Virol*, 2011. **1**(6): p. 519-25.
152. Renaud, E., et al., *Differential contribution of XPC, RAD23A, RAD23B and CENTRIN 2 to the UV-response in human cells*. *DNA Repair (Amst)*, 2011. **10**(8): p. 835-47.
153. Blount, J.R., et al., *Ubiquitin-binding site 2 of ataxin-3 prevents its proteasomal degradation by interacting with Rad23*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 4638.
154. Liang, R.Y., et al., *Rad23 interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (Ubl) domain*. *J Mol Biol*, 2014. **426**(24): p. 4049-60.
155. MacLean, A.M., et al., *Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner*. *PLoS Biol*, 2014. **12**(4): p. e1001835.
156. Chen, H. and Z. Jiang, *The essential adaptors of innate immune signaling*. *Protein Cell*, 2012.
157. Zemirli, N. and D. Arnoult, *Mitochondrial anti-viral immunity*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012. **44**(9): p. 1473-6.

158. Meeusen, S., J.M. McCaffery, and J. Nunnari, *Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro*. *Science*, 2004. **305**(5691): p. 1747-52.
159. Ishihara, N., et al., *Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **301**(4): p. 891-8.
160. Lyamzaev, K.G., et al., *Inhibition of mitochondrial bioenergetics: the effects on structure of mitochondria in the cell and on apoptosis*. *Acta Biochim Pol*, 2004. **51**(2): p. 553-62.
161. Kato, H., et al., *Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses*. *Nature*, 2006. **441**(7089): p. 101-5.
162. Vazquez-Calvo, A., et al., *Acid-dependent viral entry*. *Virus Res*, 2012. **167**(2): p. 125-37.
163. Schlegel, R., et al., *Inhibition of VSV binding and infectivity by phosphatidylserine: is phosphatidylserine a VSV-binding site?* *Cell*, 1983. **32**(2): p. 639-46.
164. Suzanne, M. and H. Steller, *Shaping organisms with apoptosis*. *Cell Death Differ*, 2013. **20**(5): p. 669-75.
165. Carneiro, F.A., et al., *Membrane recognition by vesicular stomatitis virus involves enthalpy-driven protein-lipid interactions*. *J Virol*, 2002. **76**(8): p. 3756-64.
166. Coil, D.A. and A.D. Miller, *Phosphatidylserine is not the cell surface receptor for vesicular stomatitis virus*. *J Virol*, 2004. **78**(20): p. 10920-6.
167. Johannsdottir, H.K., et al., *Host cell factors and functions involved in vesicular stomatitis virus entry*. *J Virol*, 2009. **83**(1): p. 440-53.
168. Findlay, J.S. and D. Ulaeto, *Semliki Forest virus and Sindbis virus, but not vaccinia virus, require glycolysis for optimal replication*. *J Gen Virol*, 2015. **96**(9): p. 2693-6.
169. Fontaine, K.A., et al., *Dengue virus induces and requires glycolysis for optimal replication*. *J Virol*, 2015. **89**(4): p. 2358-66.
170. Su, M.A., et al., *An invertebrate Warburg effect: a shrimp virus achieves successful replication by altering the host metabolome via the PI3K-Akt-mTOR pathway*. *PLoS Pathog*, 2014. **10**(6): p. e1004196.
171. Abrantes, J.L., et al., *Herpes simplex type 1 activates glycolysis through engagement of the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase (PFK-1)*. *Biochim Biophys Acta*, 2012. **1822**(8): p. 1198-206.
172. Superti, F., L. Seganti, and N. Orsi, *Effect of cellular inhibitors on the infection of various susceptible cells with vesicular stomatitis virus*. *Acta Virol*, 1988. **32**(6): p. 487-93.
173. Zhou, Y., et al., *Vesicular stomatitis virus is a potent agent for the treatment of malignant ascites*. *Oncol Rep*, 2016. **35**(3): p. 1573-81.
174. Jitschin, R., et al., *Mitochondrial metabolism contributes to oxidative stress and reveals therapeutic targets in chronic lymphocytic leukemia*. *Blood*, 2014. **123**(17): p. 2663-72.

175. Turrens, J.F., *Mitochondrial formation of reactive oxygen species*. J Physiol, 2003. **552**(Pt 2): p. 335-44.
176. Tal, M.C., et al., *Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(8): p. 2770-5.
177. Soucy-Faulkner, A., et al., *Requirement of NOX2 and reactive oxygen species for efficient RIG-I-mediated antiviral response through regulation of MAVS expression*. PLoS Pathog, 2010. **6**(6): p. e1000930.
178. Hsu, P.P. and D.M. Sabatini, *Cancer cell metabolism: Warburg and beyond*. Cell, 2008. **134**(5): p. 703-7.
179. Srivastava, A. and P. Mannam, *Warburg revisited: lessons for innate immunity and sepsis*. Front Physiol, 2015. **6**: p. 70.
180. Pantel, A., et al., *Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation*. PLoS Biol, 2014. **12**(1): p. e1001759.
181. Cheng, S.C., et al., *mTOR- and HIF-1alpha-mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity*. Science, 2014. **345**(6204): p. 1250684.
182. van der Meer, J.W., et al., *Trained immunity: A smart way to enhance innate immune defence*. Mol Immunol, 2015. **68**(1): p. 40-4.
183. Vazquez, A., et al., *Catabolic efficiency of aerobic glycolysis: the Warburg effect revisited*. BMC Syst Biol, 2010. **4**: p. 58.
184. Tondera, D., et al., *SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion*. EMBO J, 2009. **28**(11): p. 1589-600.
185. Youle, R.J. and A.M. van der Bliek, *Mitochondrial fission, fusion, and stress*. Science, 2012. **337**(6098): p. 1062-5.
186. Plecita-Hlavata, L., et al., *Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1777**(7-8): p. 834-46.
187. Benard, G., et al., *Mitochondrial bioenergetics and structural network organization*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 5): p. 838-48.
188. Jin, R., et al., *Japanese encephalitis virus activates autophagy as a viral immune evasion strategy*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52909.
189. Cai, X., et al., *Prion-like polymerization underlies signal transduction in antiviral immune defense and inflammasome activation*. Cell, 2014. **156**(6): p. 1207-22.
190. Shi, Y., et al., *An autoinhibitory mechanism modulates MAVS activity in antiviral innate immune response*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7811.
191. Mills, E.L., B. Kelly, and L.A.J. O'Neill, *Mitochondria are the powerhouses of immunity*. Nat Immunol, 2017. **18**(5): p. 488-498.

7 Verzeichnis der Abkürzungen und Akronyme

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADP/ATP	Adenosindiphosphat/ Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CARD	<i>Caspase activation and recruitment domain</i>
Cardif	<i>CARD adapter inducing interferon-beta</i>
CCCP	<i>Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CIAP	<i>Calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CMV	Cytomegalievirus
CO₂	Kohlenstoffdioxid
COX5B	Cytochrom c Oxidase Untereinheit 5B
Cre	Cre-Rekombinase
CRIF1	<i>CR6-interacting factor 1</i>
CytC	Cytochrom C
d	Tag
ddH₂O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
E. coli	Escherichia coli
ECAR	<i>Extracellular Acidification Rate</i>
Elf3	<i>E74-Like Factor 3</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescent activated cell sorting</i>
FADH₂	Flavin-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
FCCP	<i>Carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>

GADD45GIP1	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible 45-gamma interacting protein 1</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GOI	<i>Gene of Interest</i>
GPX1	Glutathion Peroxidase 1
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H⁺	Wasserstoffproton
H₂O	Wasser
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Wasserstoffchlorid
HIF1α	<i>Hypoxia inducible factor 1-α</i>
HO-1	Hämoxygenase 1
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HSV	Herpes simplex Virus
IFN β	Interferon beta
IFNAR	Interferon alpha/beta Rezeptor
IKK-α/β/μ	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha/ beta/ gamma</i>
IP10	<i>Interferon-gamma induced protein 10 kDa</i>
IPS-1	<i>Interferon-beta promoter stimulator 1</i>
IRF3/7	<i>IFN regulatory factor 3/7</i>
ISG	<i>Interferon stimulated genes</i>
IU	<i>International Unit</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
kJ	Kilo-Joule
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LGP2	<i>Laboratory of genetics and physiology-2</i>
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MAM	<i>Mitochondria Associated Membrane</i>
MAVS	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i>
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MEF	Maus Embryo-Fibroblasten
Mfn1/2	Mitofusin 1/2
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mM	Millimolar

MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge entsprechend etwa $6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mROS	mitochondriale ROS
MSCV	<i>Murine Stem Cell Virus</i>
mtDNA	mitochondriale DNA
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
MTS	<i>Mitochondrial Targeting Sequence</i>
mV	Millivolt
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
nDNA	nukleäre DANN
NEMO	<i>NF-κB essential modulator</i>
NFκB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLS	<i>Nuclear localization Sequence</i>
nm	Nanometer
ns	nicht signifikant
Nur77	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1 (=NR4A1)</i>
O₂⁻	Superoxidanion
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
OPA1	<i>Optic Atrophy 1</i>
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p.i.	post-Infektion
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
poly I:C	<i>Polyinosinic: polycytidylic acid</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>
q(RT-)-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i>
RLR	<i>RIG-I-like receptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	<i>Region of Interest</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
rtetR	Reverser tet-Repressor
rtTA	Reverser Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator

SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
SOD	Superoxid Dismutase
ss	Einzelstrang
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TANK	<i>TRAF family member-associated nuclear factor κB (NF-κB) activator</i>
TAT	Tat-Peptid
TBK1	<i>TANK binding kinase 1</i>
Tet	Tetracyclin
tetO	Tet-Operator
tetR	Tet-Repressor
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR	<i>Tumor necrosis factor Receptor</i>
TRADD	<i>TNFR1-associated death domain protein</i>
TRAF	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated factor</i>
TRE	<i>Tetracyclin Response Element</i>
TRIM25	<i>Tripartite motif-containing protein 25</i>
tTA	Tetracyclin-kontrollierter Transaktivator
UTR	Untranslatierte Region
VISA	<i>Virus induced signaling adapter</i>
Vol%	Volumenprozent
VP16	HSV Protein 16
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
wt	Wildtyp
$\Delta\psi_m$	Mitochondriales Membranpotential

8 Danksagung

Rückblickend auf die Jahre der Entstehung dieser Arbeit, gibt es einige Menschen, die mich persönlich und fachlich intensiv begleitet haben und denen mein Dank gebührt.

Allen voran ein riesengroßes Dankeschön an meine Eltern, die mir das Studium und die Dissertation ermöglicht haben und während des ganzen langen Weges vorbehaltlos an meiner Seite standen, gingen oder rannten. Sie haben es stets geschafft, mich wo immer nötig zu unterstützen, mir mit weitem und weisem Rat zu helfen und dabei dennoch die Entscheidung über die letztendliche Richtung in meine Hände zu legen! Dafür bin ich ihnen unendlich dankbar.

Mein Dank geht weiterhin an meinen Doktorvater Simon Rothenfuß. Ihm gelang es, wo erforderlich, Motivation zu verteilen und, wenn notwendig, Ergebnisse einzufordern. Seine Faszination für Wissenschaft und Erkenntnis ist bewundenswert und ansteckend.

Christian Wißkirchen und Andreas Schmidt gilt ein Dankeschön für ihr offenes Ohr, ihre helfenden Hände, ihre kritischen Augen und ihren bereichernden Humor. Herzlichen Dank an Simone Willms, die durch ihre Hilfe, ihre Erfahrung und ihr freundschaftliches Wesen den ganzen Laden am Laufen gehalten und essentiell zur Formung der Arbeitsgruppe beigetragen hat. Besten Dank an Carolin Schweimer für die Bereitstellung und Einarbeitung in das *Seahorse* System.

Wesentlich für das Gelingen einer derartigen Arbeit ist das passende Arbeitsumfeld: Hier geht mein Dank an Stefan Endres, der ein einmaliges und großartiges System zur Förderung junger Doktoranden und Studenten entwickelt hat und dem es durch seinen kollegialen Führungsstil gelungen ist, eine familiäre und optimistische Atmosphäre im gesamten Labor zu schaffen.

Abschließend ein besonderes Dankeschön an meine beiden Laborpartner Johannes Raps und Marcus Zeitlhofer für das freundschaftliche und helfende Miteinander sowohl in Zeiten der Dunkelheit wie auch in Phasen der Euphorie.

9 Publikationen

Poster

Hirschberger S, Wisskirchen C, Lietke S, Macke L, Willms S, Schmidt A, Rothenfuß S. Mitochondria meet innate immunity: Characterization of the mitochondrial protein CRIF1. Doktorarbeitstage Medizin, München, Deutschland, 2013

Saathoff F, Schmitt S, Schmidt A, Wisskirchen C, **Hirschberger S**, Macke L, Lietke S, Meissner F, Zischka H, Endres S, Rothenfusser S. Proteomic screening of mitochondria: A new tool to identify novel antiviral proteins. Cell Symposia: Mitochondria – from signaling to disease, Lisbon, Portugal, 2013

Vorträge

Hirschberger S, Mitochondria meet innate immunity, Wochenendseminar des Promotionsstudiums „Molekulare und Systembiologische Medizin“, Herrsching, Deutschland, 2013

10 Eidesstattliche Versicherung

Hirschberger, Simon

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

„Die Bedeutung der Mitochondrien in der angeborenen intrazellulären antiviralen Immunität: Charakterisierung des mitochondrialen Proteins CRIF1“

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, 21.01.2019

Ort, Datum

Simon Hirschberger

Unterschrift Doktorand