

**Rolle der viruskodierten Makrodomäne in
der differentiellen Genexpression
HCoV-229E-infizierter Zellen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
des Fachbereichs 08 - Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Lisa-Marie Seeber
(M. Sc.)

Gießen, 12. Dezember 2025

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Virologie des Fachbereiches 11 (Medizin, FB 11) der Justus-Liebig-Universität Gießen in der Zeit von November 2020 bis Dezember 2025 unter der Leitung von Prof. Dr. John Ziebuhr angefertigt.

1. **Gutachterin:** Apl. Prof. Dr. Elena Evgenieva-Hackenberg
Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

2. **Gutachter:** Prof. Dr. John Ziebuhr
Institut für Medizinische Virologie
Justus-Liebig-Universität Gießen

Inhaltsverzeichnis

Abstract	1
1. Einleitung	2
1.1 Nidoviren	2
1.2 Taxonomie und Morphologie.....	3
1.3 Genomorganisation	4
1.4 Viraler Lebenszyklus	5
1.5 Interferone und deren Rolle bei der antiviralen Immunantwort.....	7
1.6 Virale Mechanismen zur Umgehung der zellulärer Immunantwort	8
1.7 ADP-Ribosylierung	8
1.8 Humane PARPs und deren Rolle bei der antiviralen Immunantwort	9
1.9 Virale Makrodomäne und deren Funktion als De-ADP-Ribosylhydrolasen	12
2. Material	15
2.1 Synthetische Oligonukleotide	15
2.2 Verwendete Enzyme	17
2.3 Marker	18
2.4 Kits	18
2.5 Filter und Membranen	19
2.6 Antikörper	19
2.7 <i>Escherichia coli</i> -Stamm.....	20
2.8 Eukaryotische Zellen.....	21
2.9 Antibiotika und Inhibitoren	21
2.10 Plasmide.....	22
2.11 Puffer und Medium	22
2.12 Chemikalien	25
2.13 Allgemeine und Verbrauchsmaterialien	28
2.14 Verwendete Geräte	29
2.15 Verwendete Programme und WebTools.....	30
3. Methoden	31
3.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien.....	31
3.1.1 Kultivierung von Zellen.....	31
3.1.2 Differenzierung von THP-1-Zellen	32
3.2 Arbeiten mit Lentiviren	32
3.2.1 Design der sgRNAs.....	32
3.2.2 Klonierung von sgRNAs in Lenti-CRISPR-v2-Vektor.....	33
3.2.3 Transformation von Lenti-CRISPR-v2-Plasmid mit sgRNA	34
3.2.4 Aufreinigung und Validierung von Lenti-CRISPR-v2-Plasmid mit sgRNA.....	34

3.2.5	Lentivirus-Plasmid-Transfektion in HEK-293FT-Zellen.....	35
3.2.6	Zellviabilitätsassay für Lentiviren	36
3.2.7	CRISPR-Cas9- <i>Knockout</i> -Zelllinien-Transduktion	36
3.2.8	Validierung der CRISPR-Cas9- <i>Knockout</i> -Zelllinien	36
3.3	Arbeiten mit HCoV-229E	38
3.3.1	Virusvermehrung und Aufreinigung von Virus-Stocklösungen	38
3.3.2	Virustiterbestimmung	38
3.3.3	HCoV-229E-Infektion	39
3.4	Molekularbiologische Methoden	39
3.4.1	DNA-Isolation	39
3.4.2	Sanger-Sequenzierung	39
3.4.3	RNA-Isolation und DNase RQI-Behandlung	40
3.4.4	Polymerase-Kettenreaktion.....	40
3.4.5	Quantitative PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression	41
3.4.6	Gelelektrophorese.....	42
3.5	Biochemische Methoden.....	43
3.5.1	Gesamtproteinisolation aus Zellen.....	43
3.5.2	Quantitative Proteinanalyse mittels Bradford-Assay.....	43
3.5.3	Semi-quantitative Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	44
3.5.4	Semi-dry Western Blot	44
3.5.5	Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie	45
3.5.6	IFN- β -Bestimmung mittels ELISA	45
3.5.7	Zellviabilitätstest für PARP7-Inhibitor.....	45
4.	Ergebnisse.....	46
4.1	Wachstumsanalyse von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung.....	46
4.1.1	Replikationseffizienz von HCoV-229E in MRC-5-Zellen.....	46
4.1.2	Replikationseffizienz von HCoV-229E in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	49
4.1.3	Replikationseffizienz von HCoV-229E in makrophagenähnlichen Zellen.....	51
4.2	Transkriptomanalyse von humanen PARPs	53
4.2.1	Differentielle Genexpression in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung in MRC-5-Zellen	54
4.2.2	Differentielle Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung	60
4.2.3	Differentielle Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen während einer HCoV-229E-Infektion	66
4.3	Transkriptomanalyse von PARP7-assoziierten Genen.....	68
4.3.1	Differentielle Genexpression in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung in MRC-5-Zellen	68
4.3.2	Differentielle Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion.....	72

4.3.3	Differentielle Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen während einer HCoV-229E-Infektion	75
4.4	Proteinregulation in MRC-5-Zellen während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung.....	76
4.4.1	Proteinregulation in MRC-5-Zellen während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung.....	76
4.4.2	Proteinregulation in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung.....	79
4.5	Erzeugung von <i>Knockdown</i> - bzw. <i>Knockout</i> -Zellen	83
4.5.1	Validierung von A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} - <i>Knockdown</i> -Zellen	83
4.5.2	Wachstumsanalyse von HCoV-229E in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -PARP7- <i>KD</i> -Zellen.....	84
4.5.3	Differentielle Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7- <i>KD</i> in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung	85
4.5.3.1	Differentielle Genexpression von PARPs	87
4.5.3.2	Differentielle Genexpression von PARP7-assoziierten Genen	90
4.5.4	Proteinregulation in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7- <i>Knockdown</i>	92
4.6	Interferonfreisetzung in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen ohne bzw. mit PARP7- <i>KD</i> in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	95
4.7	Analyse des PARP7-Inhibitors RBN-2397 in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	98
5.	Diskussion	109
5.1	Wachstumsanalyse von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten in unterschiedlichen Zelltypen.....	109
5.1.1	Replikationseffizienz von HCoV-229E in MRC-5-Zellen.....	109
5.1.2	Replikationseffizienz von HCoV-229E in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	110
5.1.3	Replikationseffizienz von HCoV-229E in makrophagenähnlichen Zellen.....	110
5.2	Transkriptomanalyse in verschiedenen Zelltypen.....	112
5.2.1	Genexpression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen.....	112
5.2.2	Genexpression in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	113
5.2.3	Expression von PARP mRNA in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion	114
5.2.3.1	PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen	114
5.2.3.2	PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	116
5.2.3.3	PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten makrophagenähnlichen Zellen	116
5.2.4	Regulation von PARP7-assoziierten Genen in Abhängigkeit von HCoV-229E	118
5.2.4.1	Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen	118
5.2.4.2	Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	120
5.2.4.3	Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten makrophagenähnlichen Zellen	121
5.3	Zusammenhang zwischen Proteinregulation und Genexpression während einer HCoV-229E-Infektion	122
5.4	Auswirkungen eines PARP7- <i>Knockdowns</i> auf die HCoV-229E-Infektion	125
5.4.1	PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7- <i>KD</i>	126

5.4.2	Regulation PARP7-assoziiertes Gene in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD.....	127
5.4.3	Proteinregulation in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD.....	128
5.5	Wachstumsanalyse von HCoV-229E in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung	129
5.5.1	IFN-abhängige Replikation von HCoV-229E in MRC-5-Zellen.....	129
5.5.2	IFN-β-abhängige Replikation von HCoV-229E in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	131
5.6	Welchen Einfluss hat eine IFN-β-Vorbehandlung auf die Genexpression während der HCoV-229E-Infektion?	132
5.6.1	Genexpression in IFN-β-vorbehandelten HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen	132
5.6.2	Genexpression in IFN-β-vorbehandelten HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	133
5.6.3	Expression von PARP-mRNA in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN-β-Vorbehandlung	134
5.6.3.1	IFN-β-abhängige PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen.....	134
5.6.3.2	IFN-β-abhängige PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	135
5.6.4	Regulation von PARP7-assoziierten Genen in Abhängigkeit von HCoV-229E und IFN-β-Vorbehandlung	137
5.6.4.1	IFN-β-abhängige Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen	137
5.6.4.2	IFN-β-abhängige Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	138
5.7	Zusammenhang zwischen Proteinregulation und Genexpression während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung.....	140
5.8	Auswirkungen eines PARP7-Knockdowns auf die HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von IFN-β	142
5.8.1	PARP-Expression in Abhängigkeit von IFN-β und HCoV-229E-Infektion	143
5.8.2	Expression PARP7-assoziiertes Gene in Abhängigkeit von IFN-β und HCoV-229E-Infektion.....	145
5.8.3	IFN-β-abhängige Proteinregulation in HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD	145
5.9	Einfluss der MacD-Mutanten auf die Interferonfreisetzung in IFN-β-behandelten HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	146
5.10	Effekt des PARP7-Inhibitors RBN-2397 in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	149
6.	Zusammenfassung.....	154
7.	Anhang.....	155
8.	Literaturverzeichnis	188
9.	Danksagung.....	205
10.	Eidesstattliche Versicherung	206

Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (Ala)
ACE2	Angiotensin-konvertierendes Enzym 2 (engl. <i>angiotensin converting enzyme 2</i>)
ActB	Beta-Actin
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>Analysis of Variance</i>)
Appr1p	ADP-Ribose-1“-Phosphat
ARDS	engl. <i>acute respiratory distress syndrome</i>
Arg	Arginin (R)
ARTC	<i>Cholera-like</i> -ADP-Ribosyltransferasen
ARTD	<i>Diphtheria-toxin-like</i> -ADP-Ribosyltransferasen
ARTs	ADP-Ribosyltransferasen
APS	Ammoniumpersulfat
Asp	Aspartat (D)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
bp	Basenpaar
BMDM	<i>bone marrow-derived macrophage</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
C	Cystein (Cys)
CD13	Aminopeptidase N (auch APN)
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary</i>)
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CPE	zytopathischer Effekt (engl. <i>cytopathic effect</i>)
CRISPR	<i>clustered regulatory interspaced short palindromic repeats</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
Da	Dalton
DAPI	4'6-Diamidin-2-Phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Doppelmembranvesikel
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTX3L	Deltex-E3-Ubiquitin-Ligase 3L
Δ	Deletion (Delta)
E-Protein	Hüllprotein E (engl. <i>envelope</i>)

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Titrplex III)
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERGIC	ER-Golgi-Zwischenkompartiment (engl. ER-Golgi <i>intermediate compartment</i>)
<i>et al.</i>	und andere (lat. <i>et alii</i>)
FBS	fetales bovines Serum
FRA1	Fos- <i>related</i> Antigen1 (auch FOSL1)
fwd	engl. <i>forward/ sense</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Glu	Glutamat, Glutaminsäure (E)
H	Histidin (H)
HCoV	humanes Coronavirus
HCoV-229E	humanes Coronavirus 229E
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon- α/β -Rezeptor
IFNLR	Interferon- λ -Rezeptor
IKK	I κ B-Kinase
IL	Interleukin
IQR	Interquartilsabstand (engl. <i>interquartile range</i>)
IRF	Interferon-regulierender Faktor
ISGs	Interferon-stimulierte Gene
g	Gramm
h	Stunde/n
kb	Kilobase
KD	<i>Knockdown</i>
KO	<i>Knockout</i>
kDa	Kilodalton
KLK10	Kallikrein-10 (engl. <i>Kallikrein related peptidase 10</i>)
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCV2	Lenti-CRISPR v2 (LCV2)-Vektor
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin (K)
M-Protein	Membranprotein
MacD	Makrodomäne

MAR	Mono-ADP-Ribosylierung
mA	Milliampere
MAVS	engl. <i>mitochondrial antiviral-signaling protein</i>
MDA5	Melanom-Differenzierungsantigen 5 (engl. <i>melanoma differentiation-associated protein 5</i>)
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
mg	Milligramm
MHV	Murines Hepatitisvirus (engl. <i>mouse hepatitis virus</i>)
MOI	Multiplizität der Infektion (engl. <i>multiplicity of infection</i>)
M ^{pro}	Hauptprotease (engl. <i>main protease</i>)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Boten-RNA (engl. <i>messenger RNA</i>)
MTT	Thiazolyblau-Tetrazoliumbromid (auch MTS)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
N	Asparagin (Asn)
N-Protein	Nukleokapsid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (engl. <i>nicotinamide adenine dinculeotide</i>)
NEMO	Untereinheit des IκB-Kinase-Komplexes
NF-κB	<i>nuclear factor</i> kappa B
NGS	Next-Generation-Sequenzierung
nsp	Nichtstrukturproteine (engl. <i>non-structural proteins</i>)
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORA	Überrepräsentationsanalyse (engl. <i>Over-Representation Analysis</i>)
ORF	offener Leserahmen (engl. <i>open reading frame</i>)
p50	Untereinheit von NF-κB (auch als NF-κB1 bezeichnet)
p65	Untereinheit von NF-κB (auch als RELA bezeichnet)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Poly-ADP-Ribosylierung
p	Plasmid
p-	phosphoryliert
PAA	Polyacrylamid
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase

PARP7	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induzierte PARP (engl. TCDD <i>inducible</i> PARP, TiPARP), ADP-Ribosyltransferase <i>Diphtheria Toxin-Like</i> 14 (ARTD14)
PBS	phosphatgepufferte (Koch-) Salzlösung (engl. <i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PFU	infektiöse Einheit (engl. <i>plaque-forming unit</i>)
pg	Picogramm
pH	lat. <i>potentia hydrogenii</i>
PIPES	1,4-Piperazindiethansulfonsäure
PL	Papain- <i>like</i> -Proteasen (engl. <i>papain-like protease</i>)
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetat
poly(I:C)	Polyinosinsäure:Polycytidylsäure-Stimulation (engl. <i>polyinosinic-polycytidylic acid</i>)
pp	Polyprotein
PTM	Modifikationen nach der Translation (engl. <i>post-translational modifications</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Q	Glutamin (Gln)
rev	engl. <i>reverse/ antisense</i>
RFS	ribosomale Leserasterverschiebung (engl. <i>ribosomal frameshift</i>)
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene</i> I
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkription mit nachfolgender quantitativer PCR
RTC	Replikations- und Transkriptionskomplex
S-Protein	Spike-Protein
Ser	Serin (S)
SARS	<i>Severe acute respiratory syndrome</i>
sgRNA	<i>single guide</i> RNA
SOC	superoptimales Medium mit katabolischem Repressor
ss	einzelsträngig (engl. <i>single stranded</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte (Koch-) Salzlösung (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TBK1	TANK-bindende Kinase 1 (engl. <i>TANK-binding kinase</i> 1)

TCID ₅₀	engl. <i>Tissue culture infectious dose 50 %</i>
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMPRSS2	Transmembran-Serinprotease 2 (engl. <i>transmembrane protease serine subtype 2</i>)
TNKS	Tankyrasen
TRAF3	TNF <i>receptor-associated factor 3</i>
TRIF	TIR <i>domain-containing adapter inducing IFN-β</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	nicht-translatierter Bereich (engl. <i>untranslated region</i>)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (engl. <i>volume per volume</i>)
Vol	Volumen
vs.	versus
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (engl. <i>weight per volume</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Genomorganisation von HCoV-229E.....	5
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HCoV-229E.....	6
Abbildung 1-3: Übersicht ausgewählter antiviraler Signalwege	11
Abbildung 1-4: Alignment von Makrodomänen verschiedener Alpha- und Betacoronaviren.....	13
Abbildung 3-1: Identifizierung von Ausreißern anhand des Interquartilsabstandes (IQR)	42
Abbildung 4-1: Virustiter von HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer vorherigen Behandlung mit IFN- α 2, β 1 oder λ 1 24 und 48 hpi	47
Abbildung 4-2: Immunfluoreszenzanalyse von MRC-5-Zellen, die mit HCoV-229E infiziert (A1, A2) bzw. für 16 h IFN- β -behandelt und infiziert (B1, B2) wurden	48
Abbildung 4-3: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in MRC-5-Zellen abhängig von einer Vorbehandlung mit IFN- β . MRC-5-Zellen wurden infiziert (grau) bzw. mit IFN- β vorbehandelt und infiziert (blau)	48
Abbildung 4-4: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen abhängig von einer vorherigen Behandlung mit IFN- β	50
Abbildung 4-5: Immunfluoreszenzanalyse von A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen, die mit HCoV-229E infiziert (A1, A2) oder IFN- β -behandelt und infiziert (B1, B2) wurden.....	51
Abbildung 4-6: Mikroskopische Aufnahmen differenzierter makrophagenähnlicher Zellen im Phasenkontrast (A), nach Pappenheim-Färbung (B) und 48 hpi mit HCoV-229E (C)	52
Abbildung 4-7: Virustiter von mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten infizierten differenzierten makrophagenähnlichen Zellen	53
Abbildung 4-8: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen.....	55
Abbildung 4-9: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E (MOI 0,1)	56
Abbildung 4-10: Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E	57
Abbildung 4-11: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion (MOI 3,0).....	58
Abbildung 4-12: Regulation der Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion.....	59
Abbildung 4-13: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7 in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten	60
Abbildung 4-14: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen	61
Abbildung 4-15: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	63
Abbildung 4-16: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E MacD-Mutanten	64
Abbildung 4-17: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7 in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten	65
Abbildung 4-18: Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion.....	66
Abbildung 4-19: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13 und PARP14 in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer Infektion mit HCoV-229E (A) und MacD-Mutanten (B)	67
Abbildung 4-20: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	68
Abbildung 4-21: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion (MOI 3,0).....	69

Abbildung 4-22: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion	70
Abbildung 4-23: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von TBK1 (A), IRF7 (B) und IRF3 (C) in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten	71
Abbildung 4-24: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion.....	72
Abbildung 4-25: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E MacD-Mutanten	73
Abbildung 4-26: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von TBK1 (A), IRF7 (B) und IRF3 (C) in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q).....	74
Abbildung 4-27: Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion.....	75
Abbildung 4-28: Proteinanalyse von PARP7 und PARP9 in MRC-5-Zellisolaten	76
Abbildung 4-29: Proteinanalyse und Quantifizierung von PARP9 in MRC-5-Zelllysaten.....	77
Abbildung 4-30: Proteinregulation in MRC-5-Zellen während der HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β	78
Abbildung 4-31: Quantifizierung von TBK1 in MRC-5-Zelllysaten	79
Abbildung 4-32: Proteinregulation in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen während der Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β	82
Abbildung 4-33: Validierung von PARP7-KD in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	83
Abbildung 4-34: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD abhängig von einer vorherigen IFN- β -Behandlung	84
Abbildung 4-35: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD	86
Abbildung 4-36: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	87
Abbildung 4-37: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E MacD-Mutanten....	88
Abbildung 4-38: PARP7-Expression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und der Infektion mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten.....	89
Abbildung 4-39: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	90
Abbildung 4-40: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E MacD-Mutanten....	91
Abbildung 4-41: Proteinregulation in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD während der Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β	94
Abbildung 4-42: IFN- β -Freisetzung und Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und HCoV-229E-infizierten A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen.....	96
Abbildung 4-43: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen (A) und A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD (B).....	98
Abbildung 4-44: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	99
Abbildung 4-45: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion.....	100
Abbildung 4-46: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion	100

Abbildung 4-47: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion.....	101
Abbildung 4-48: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	102
Abbildung 4-49: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	103
Abbildung 4-50: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	104
Abbildung 4-51: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	105
Abbildung 4-52: Proteinregulation in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD während der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit RBN-2397 ...	107
Abbildung 5-1: Vereinfachte schematische Darstellung des NF-κB-Signalwegs mit der Rolle ausgewählter ARTD-Familienmitglieder bzw. PARPPs (WP5527).....	148
Abbildung 7-1: Sequenzierung klonierter LCV2-Plasmide mit je einer der drei PARP7 sgRNAs.....	155
Abbildung 7-2: Validierung der HCoV-229E MacD-Mutanten.....	156
Abbildung 7-3: Replikation von HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in MRC-5-Zellen abhängig von einer Vorbehandlung mit IFN-β.....	157
Abbildung 7-4: Immunfluoreszenzanalyse von A549-Zellen, die mit HCoV-229E MOI 0,1 (A2) oder MOI 5,0 (A3) infiziert wurden.....	157
Abbildung 7-5: PARP-Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A.....	158
Abbildung 7-6: PARP-Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S.....	159
Abbildung 7-7: Genexpression von PARPs und mit PARP7 im Zusammenhang stehenden antiviralen Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von IFN-β.....	160
Abbildung 7-8: Explorative Datenanalyse mittels Boxplot (A) und QQ-Plot (B) der PARP7-Expression des <i>raw</i> Datensatzes (A1, B1) bzw. des log ₁₀ -transformierten Datensatzes (A2, B2).....	168
Abbildung 7-9: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion.....	169
Abbildung 7-10: Genexpression in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E MacD-Mutanten.....	170
Abbildung 7-11: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A.....	171
Abbildung 7-12: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S.....	172
Abbildung 7-13: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	173
Abbildung 7-14: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q.....	174

Abbildung 7-15: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q	175
Abbildung 7-16: Zellvitalität in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung	175
Abbildung 7-17: Virusreplikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung	176
Abbildung 7-18: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q	176
Abbildung 7-19: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q	177
Abbildung 7-20: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q	178
Abbildung 7-21: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q	179
Abbildung 7-22: Replikationskinetik von HCoV-229E in Huh-7-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung	179
Abbildung 7-23: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	180
Abbildung 7-24: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	181
Abbildung 7-25: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	182
Abbildung 7-26: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	183
Abbildung 7-27: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	184
Abbildung 7-28: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	185
Abbildung 7-29: Genexpression von PARPs in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	186
Abbildung 7-30: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S	187

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht der 17 humanen PARPs	10
Tabelle 2-1: Übersicht der verwendete Oligonukleotide	15
Tabelle 2-2: Verwendete Enzyme	17
Tabelle 2-3: Verwendete Marker	18
Tabelle 2-4: Verwendete Kits	18
Tabelle 2-5: Filter und Membranen	19
Tabelle 2-6: Antikörper	19
Tabelle 2-7: Verwendeter <i>Escherichia coli</i> -Stamm	20
Tabelle 2-8: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zellen	21
Tabelle 2-9: Verwendete Antibiotika und Inhibitoren.....	21
Tabelle 2-10: Verwendete Ausgangsplasmide	22
Tabelle 2-11: Verwendete Puffer und Medium	22
Tabelle 2-12: Chemikalien	25
Tabelle 2-13: Allgemeine und Verbrauchsmaterialien	28
Tabelle 2-14: Verwendete Geräte	29
Tabelle 2-15: Verwendete Programme und WebTools	30
Tabelle 3-1: Ansatz Polyacrylamid-Gel für RT-qPCR/ Gradienten-PCR-Proben.....	43
Tabelle 3-2: Ansatz für 9 % SDS-PAA-Gele unterteilt in Trenn- und Sammelgel.....	44
Tabelle 7-1: Primereffizienzen der verwendeten RT-qPCR-Primersets für alle 17 humanen PARPs, IRF3, IRF7, TBK1 und GAPDH	155

Abstract

Abstract

Coronaviruses encode in their replicase genes a total of 16 nonstructural proteins (nsp) called nsp1 to nsp16, which are released from large polyprotein precursors by virus-encoded proteases. Nsp3 is the largest of these nonstructural proteins and contains numerous functional domains, including the macrodomain (MacD). In addition, it is shown to be involved in the formation of pore-containing membranous replication organelles in which viral RNA synthesis takes place. MacD was previously shown to bind ADP-ribose and to exhibit ADP-ribose-1"-phosphatase and de-ADP-ribosylation activities. Because post-translational modifications of viral and/or cellular proteins, including ADP-ribosylation, are known to affect innate immune responses, it has been suggested that MacD-mediated de-ADP-ribosylation activities support viral replication by modulating antiviral or other cellular pathways.

In this work, HCoV-229E WT and HCoV-229E MacD mutants were used to study their replication in different cell types and to analyze gene expression patterns and protein regulation in cells infected with these viruses. Additionally, potential effects of IFN- β pretreatment of cells to be infected with HCoV-229E on viral replication and cellular gene expression were characterized. The data showed that pretreatment with IFN- β results in reduced viral titers and limited spread in both MRC-5 and A549^{CD13+/TMPRSS2+} cell culture systems. Furthermore, the data revealed a differential gene regulation in response to IFN- β pretreatment and/or HCoV-229E infection. Detailed analyses focusing on cellular poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs), which posttranslationally modify proteins by ADP-ribosylation, revealed that PARPs can be categorised into groups based on distinct gene expression levels observed in virus-infected and/or IFN- β -treated cells. PARP9 expression was strictly IFN- β dependent, whereas PARP7 was specifically upregulated upon HCoV-229E infection. Despite strong PARP7 mRNA induction, neither reduced PARP7 protein levels nor pharmacological inhibition affected viral replication, supporting an immunomodulatory rather than antiviral role. Virus-induced changes in PARP7-associated antiviral genes, including FRA1 and IRF3, further highlighted altered immune signaling. A comparative analysis of various HCoV-229E MacD mutants revealed that substitutions of a single MacD residue (N1357) have a more profound impact on cellular gene expression than other MacD mutants in which the MacD was completely deleted or catalytically inactive. A549^{CD13+/TMPRSS2+} cells that were IFN- β -pretreated and infected with HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S showed increased IFN- β synthesis probably due to differentially regulated genes like FRA1.

In conclusion, the data identify the HCoV-229E MacD as a regulator of host antiviral defenses, regulating PARP expression, IRF3 and FRA1 signaling, and ADP-ribosylation during infection. Notably, residue-specific MacD mutants, especially those affecting N1357, triggered enhanced immune activation compared to catalytically inactive or deletion mutants, indicating unique contributions of individual MacD residues to innate immune modulation. Overall, these findings underscore the multifaceted role of MacD in coronavirus–host interactions and its potential for developing antiviral drugs and live attenuated vaccines against coronavirus-infections.

Einleitung

1. Einleitung

Die nachfolgenden Kapitel bieten eine Übersicht über Nido- bzw. Coronaviren, deren Genomorganisation, Lebenszyklus und virale Mechanismen, die es ermöglichen, einer zellulären Immunantwort entgegenzuwirken. Aus zellulärer Sicht werden beispielhaft antivirale Mechanismen, wie die ADP-Ribosylierung, näher beschrieben.

1.1 Nidoviren

RNA-Viren haben im Laufe ihrer Evolution eine enorme Diversität hinsichtlich ihrer Genomgröße und Replikationsmechanismen entwickelt. Vertreter der Ordnung der *Nidovirales* haben ein einzelsträngiges RNA-Genom mit positiver Orientierung (Plusstrang-RNA-Viren). Diese Virusordnung wurde 1996 eingeführt [Fauquet, 2005]. Die Bezeichnung *Nidovirales* ist abgeleitet von dem Wort „*nidus*“ (lat. für Nest) und bezieht sich auf den 3´-koterminale geschachtelte Satz subgenomischer mRNAs („*nested set of mRNAs*“) [Cavanagh, 1997]. Viren dieser Ordnung weisen ein breites Wirtsspektrum auf, sodass sie nicht nur von medizinischer Bedeutung sind, sondern auch eine bedeutende wirtschaftliche Rolle durch die Erkrankung von Nutztieren spielen.

In der Humanmedizin sind Nidoviren, die der Familie der *Coronaviridae* zugeordnet sind von besonderer Relevanz. Dazu zählen die humanen Coronaviren (HCoV) OC43, NL63, HKU-1 und 229E, die Infektionen der oberen Atemwege auslösen [Geller *et al.*, 2012]. Insbesondere in den vergangenen zwei Jahrzehnten zeigte sich die große Bedeutung von zoonotischen CoVs, die von Tieren auf den Menschen übertragen werden können. In einer Epidemie der Jahre 2002 und 2003 wurde SARS-CoV (engl. *severe acute respiratory syndrome*) relativ schnell als Ursache der gehäuft auftretenden schweren und häufig auch tödlich verlaufenden Pneumonien identifiziert. Die Zuordnung des bis dahin unbekanntes Erregers zur Familie der *Coronaviridae* erfolgte zunächst auf der Basis seiner Morphologie und wenig später auf der Grundlage seiner Genomsequenz [Drosten *et al.*, 2003, Marra *et al.*, 2003, Rota *et al.*, 2003]. Der Ursprung des Erregers wird auf Fledermäuse zurückgeführt, da diese ein bekanntes großes Reservoir für SARS-CoV-ähnliche CoVs darstellen [Li *et al.*, 2005], wobei wahrscheinlich weitere Zwischenwirte (insbesondere der Larvenroller) an der Übertragung dieses Virus auf den Menschen beteiligt waren.

Bereits 10 Jahre später erlangte ein weiterer Vertreter der *Coronaviridae* weltweite Aufmerksamkeit. Das *Middle-East-respiratory-syndrome-Coronavirus* (MERS-CoV) führte in einem relativ großen Teil der (relativ wenigen) infizierten Personen zu einer akuten respiratorischen Insuffizienz (engl. *acute respiratory distress syndrome*, ARDS), die mit einer hohen Letalität verbunden war. Identifiziert wurde MERS-CoV erstmals 2012 bei einem Patienten auf der arabischen Halbinsel. Natürliche Wirte sind vermutlich Dromedare, wodurch sich die gehäuften Übertragungen dieses zoonotischen Virus auf den Menschen insbesondere in Ländern des nahen Ostens und Afrikas erklären lassen. Mensch-zu-Mensch-Übertragungen sind relativ selten und erfordern einen engen Kontakt, wie er bei nahen Verwandten oder bei Personal in der intensivmedizinischen Betreuung schwer erkrankter

Einleitung

Personen vorkommt [World Health Organization, 2022, Mackay & Arden, 2015, Widagdo *et al.*, 2016, Peiris & Perlman, 2022].

Die erste durch ein CoV ausgelöste Pandemie begann im Dezember 2019 in Wuhan, China. Erste Genomsequenzen des bis dahin unbekanntes Erregers wurden im Januar/Februar 2020 veröffentlicht und bestätigten eine hohe genetische Übereinstimmung mit SARS-CoV [Wu *et al.*, 2020]. Basierend auf der phylogenetischen und taxonomischen Einordnung wurde die offizielle Bezeichnung SARS-CoV-2 für dieses Virus eingeführt [Gorbalenya *et al.*, 2020]. Parallel wurde von der *World Health Organization* (WHO) der Name COVID-19 (engl. *coronavirus disease* 2019) als Bezeichnung für die durch SARS-CoV-2 verursachte Erkrankung eingeführt. Die rasch einsetzende Ausbreitung des neu entdeckten Erregers wurde am 11. März 2020 von der WHO als Pandemie eingestuft und wurde durch die bereits zu Beginn ungewöhnlich hohe Übertragungsrate begünstigt [Amicone *et al.*, 2022].

Die drei beschriebenen CoVs, die insbesondere bei Fehlen einer vorbestehenden Immunität zu schweren Krankheitsverläufen führen können, verdeutlichen das hohe zoonotische Potential von CoVs, die in zahlreichen Säugetieren nachgewiesen wurden und sich bereits durch wenige Mutationen (vor allem im S-Gen) an andere Wirte anpassen können [Telenti *et al.*, 2021].

1.2 Taxonomie und Morphologie

Die Ordnung *Nidovirales* wird gegenwärtig in die Unterordnungen *Abnidorvirineae*, *Arnidorvirineae*, *Cornidorvirineae*, *Mesnidovirineae*, *Monidorvirineae*, *Nanidorvirineae*, *Ronidorvirineae* und *Tornidorvirineae* unterteilt [ICTV, 2025]. Nidoviren unterscheiden sich von anderen Plusstrang-RNA-Viren insbesondere durch ihre Genomgröße von 12,7- 41,1 Kilobasen (kb) und der Konservierung einer typischen Abfolge von Proteindomänen in den viralen Replikase-Polyproteinen, die zentrale Funktionen in der Virusgenom-Replikation und Transkription ausüben. Einige dieser Proteine sind spezifisch für Nidoviren [Gorbalenya *et al.*, 2006, Lauber *et al.*, 2024, Neuman *et al.*, 2025]. In vielen anderen Hinsichten unterscheiden sich Nidoviren sehr stark, zum Beispiel hinsichtlich ihrer Morphologie, der Größe und Anzahl von Strukturproteinen, sowie des Wirtsspektrums [Lauber *et al.*, 2024, Neuman *et al.*, 2025]. Allen Viren gemeinsam ist das Vorhandensein einer Membranhülle [Saber *et al.*, 2018, Tang *et al.*, 2022].

Nidoviren aus der Familie der *Coronaviridae* in der Unterordnung *Cornidorvirineae* wurden seit dem Auftreten von SARS-CoV im Jahr 2003, insbesondere aber seit dem Beginn der SARS-CoV-2-Pandemie, zunehmend intensiv erforscht. Die Bezeichnung Coronavirus leitet sich von dem charakteristischen Erscheinungsbild im Elektronenmikroskop ab. Dabei zeichnen sich die kugelförmigen Viruspartikel durch Fortsätze auf ihrer Oberfläche aus, die an die Zacken einer Krone (lat.: *corona*) erinnern. Diese Fortsätze (engl. *spikes*) werden durch virale Oberflächenglykoproteine gebildet, die in die Virushülle (Lipidmembran) eingebettet sind. Zur Familie der *Coronaviridae* zählen die Subfamilien *Letovirinae*, *Pitovirinae* und *Orthocoronavirinae*. Letztere werden in die vier Gattungen *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* und *Deltacoronavirus* unterteilt und stellen die Coronaviren im

Einleitung

engeren Sinne dar. Der Gattung *Alphacoronavirus* wird auch das humanpathogene Coronavirus 229E (HCoV-229E) zugeordnet [ICTV, 2025], welches im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde.

1.3 Genomorganisation

Das lineare, nicht-segmentierte, einzelsträngige RNA-Genom von Coronaviren gehört zu den größten bisher bekannten Genomen unter den RNA-Viren, wenn gleich in neueste Untersuchungen sogar noch deutlich größere, teilweise auch segmentierte Genome in einigen Vertretern der Nidoviren gefunden wurden [Lauber *et al.*, 2024, Neuman *et al.*, 2025]. Die Grundstruktur besteht aus einem 5'-nicht-translatierten Bereich (engl. *untranslated region*, UTR) mit einer *Cap*-Struktur, gefolgt von zwei überlappenden offenen Leserahmen (engl. *open reading frame*, ORF), den Strukturgenen, einer variablen Anzahl akzessorischer Gene und einer 3'-terminalen Poly(A)-Sequenz im 3'UTR. Durch die Translation des Replikase-Gens, bestehend aus den beiden ORFs 1a und 1b, werden zwei Polyproteine (pp) synthetisiert. Eines dieser Polyproteine (pp1a) wird vom ORF1a kodiert. Das zweite Polyprotein (pp1ab) wird von beiden ORFs (1a und 1b) kodiert und stellt eine C-terminal verlängerte Variante des pp1a dar. Seine Biosynthese erfordert eine (-1)-ribosomale Leserasterverschiebung (engl. *ribosomal frameshift*, RFS) während der Translation, die kurz vor dem Erreichen des ORF1a-Translationsstoppkodons erfolgt und die Fortsetzung der Translation im nachfolgenden ORF1b ermöglicht [Irigoyen *et al.*, 2016, Finkel *et al.*, 2021].

Die typische Struktur eines Coronavirusgenoms wird nachfolgend anhand von HCoV-229E dargestellt. Die beiden HCoV-229E-Polyproteine besitzen eine Größe von ca. 450 Kilodalton (kDa) (pp1a) bzw. 750 kDa (pp1ab). Sie werden autoproteolytisch durch zwei *Papain-like*-Proteasen (PL1, PL2) und die Hauptprotease (*main protease*, M^{pro}) co- und posttranslational in 16 Nichtstrukturproteine (engl. *non-structural proteins*, nsps) prozessiert (Abbildung 1-1). Die Benennung der nsps erfolgt anhand ihrer Anordnung im Polyprotein, beginnend am N-Terminus. Viele dieser Proteine sind an der Bildung funktioneller Replikations-Transkriptionskomplexe (RTC) beteiligt, die in konzentrierter Form innerhalb von virus-induzierten Doppelmembran-Vesikeln (DMVs) vorliegen (Kapitel 1.4) [Brian & Baric, 2005].

Einleitung

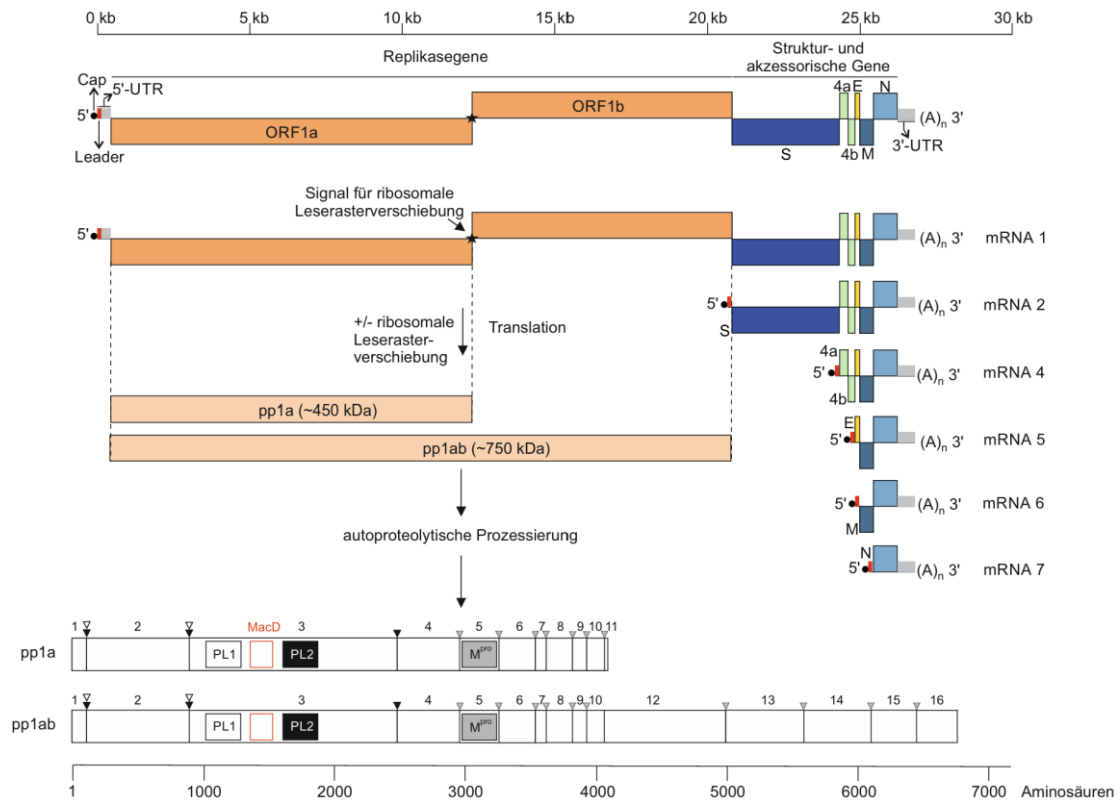


Abbildung 1-1: Genomorganisation von HCoV-229E. Die genomische RNA besitzt am 5'-Ende eine Cap-Struktur (schwarzer Kreis), eine 5'UTR (grau) sowie die Leader-Sequenz (rot), die einen Teil der 5'UTR bildet und an deren 5'-Ende liegt. Am 3'-Ende befindet sich eine Poly(A)-Sequenz ((A)_n). Das restliche Genom ist in verschiedene Abschnitte unterteilt, die die Replikase- (orange), Struktur- (verschiedene Blautöne bzw. gelb) und akzessorischen (grün) Gene enthalten. Etwa zwei Drittel des Genoms werden von ORF1a und ORF1b beansprucht. Diese werden während der Translation in die Polyproteine pp1a und pp1ab (hellorange) translatiert. Letzteres benötigt hierfür eine (-1)-ribosomale Leserasterverschiebung. Im Anschluss werden beide Polyproteine durch drei virale Proteasen (PL1, PL2, M^{pro}) autoproteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine (nsps) gespalten. Die von den 3 Proteasen gespaltenen Schnittstellen sind mit den für die Darstellung der 3 Proteasen verwendeten Farben gekennzeichnet (weiß, schwarz, grau). Die Spaltstellen zwischen nsp1 und nsp2 sowie zwischen nsp2 und nsp3 können von beiden Papain-ähnlichen Proteasen (PL1 und PL2) gespalten werden, während die nsp3|nsp4-Spaltstelle nur von der PL2 gespalten werden kann [Ziebuhr *et al.*, 2007]. Die im letzten Genomdrittel enthaltene Sequenz kodiert für die Strukturproteine (das Spike- (S), das Membran- (M), das Hüll- (engl. *envelope*, E) und das Nukleokapsid- (N) Protein) sowie für zwei kleine akzessorische Proteine (ORF4a, ORF4b). Die Position der Makrodomäne (MacD) in nsp3 ist rot gekennzeichnet.

1.4 Viraler Lebenszyklus

Der Replikationszyklus von Coronaviren beginnt mit der Bindung an spezifische Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche (Proteine, Kohlenhydrate u.a.). Eine Fusion der Virushülle mit zellulären Membranen erfolgt entweder direkt an der Plasmamembran oder mit endosomalen Membranen. Dabei bindet die S1-Domäne des HCoV-229E-Spike-Proteins an die Aminopeptidase N (APN, auch CD13), welche als spezifischer Rezeptor für HCoV-229E identifiziert wurde [Yeager *et al.*, 1992]. Im Anschluss erfolgt eine Konformationsänderung der S2-Domäne des S-Proteins, welches zur Fusion der viralen Membran mit der Wirtsmembran führt [Nomura *et al.*, 2004]. Die erforderliche Konformationsänderung des S-Proteins kann u.a. durch die Transmembrane-Serinprotease 2 (engl. *transmembrane protease serine subtype 2*, TMPRSS2) induziert werden [Bertram *et al.*, 2013].

Einleitung

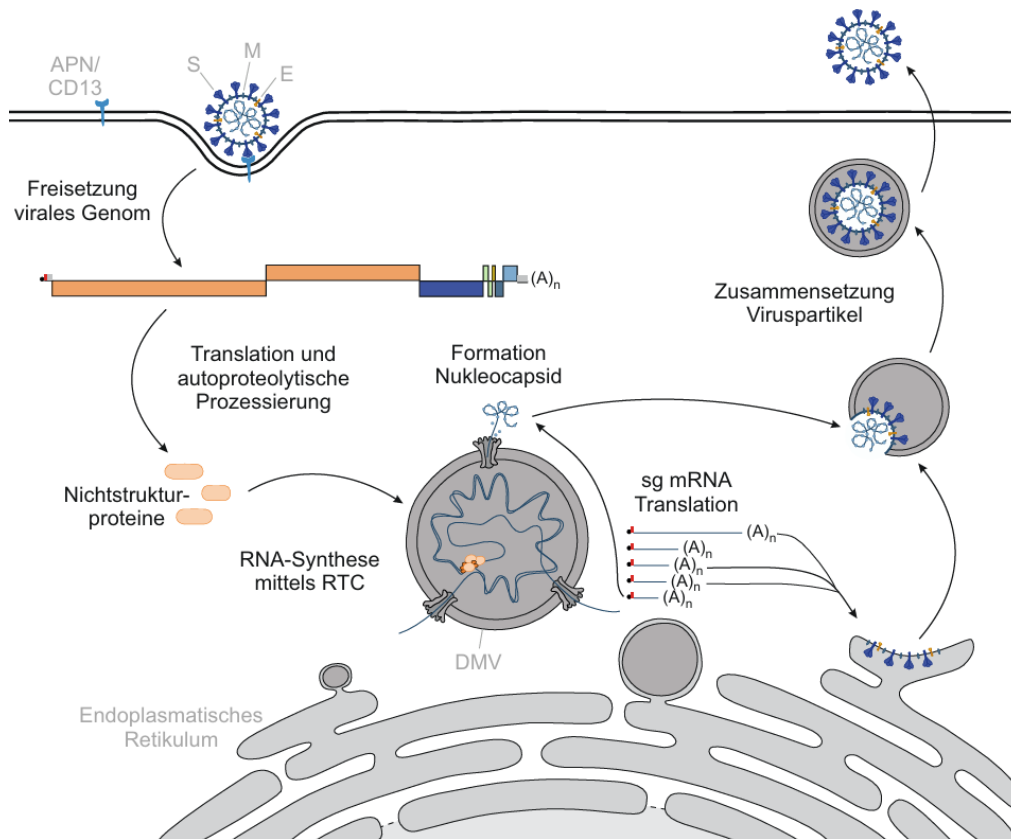


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von HCoV-229E. Durch Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt die Aufnahme des Viruspartikels in die Wirtszelle. Anschließend wird die virale Genom-RNA in das Zytoplasma freigesetzt und dient als Matrize für die Translation der Polyproteine, welche autoproteolytisch in 16 Nichtstrukturproteine (nsps) gespalten werden. Nsps bilden den Replikations-Transkriptions-Komplex (RTC), welcher der Synthese subgenomischer (sg) mRNAs und genomischer RNA innerhalb von virusinduzierten Doppelmembranvesikeln (DMVs) dient. Die Translation subgenomischer mRNAs führt zur Synthese der viralen Strukturproteine (S, M, E, N) und der akzessorischen Proteine. Das N-Protein bindet die neu synthetisierte genomische RNA um Nukleokapside zu bilden. Die viralen Strukturproteine S, E und M akkumulieren am endoplasmatischen Retikulum und dem intermediären Golgi-Kompartiment und interagieren mit dem Nukleokapsid. Viruspartikel entstehen durch Ausknospung in den Innenraum dieser Kompartimente, wo es zu weiteren Reifungsschritten (insbesondere Glykosylierungen) kommt. Mit Viruspartikeln gefüllte Vesikel werden dann zur Zelloberfläche transportiert und durch Exozytose aus der Zelle ausgeschleust.

Nach ihrer Freisetzung in das Zytoplasma dient die Genom-RNA (die eine positive Polarität hat) als *messenger RNA* (mRNA). Unter Verwendung der zellulären Translationsmaschinerie wird das Genom in die viralen Polyproteine (1a und 1ab) translatiert (Abbildung 1-2). Polyprotein 1ab entsteht durch eine (-1)-Leserasterverschiebung kurz vor dem Translationsstoppkodon des ORF1a, welche mit einer Häufigkeit von über 50 % stattfindet [Irigoyen *et al.*, 2016, Finkel *et al.*, 2021]. Beide Polyproteine werden autoproteolytisch gespalten, wobei aus pp1a die nsps 1 bis 11 gebildet werden, während aus pp1ab die nsps 1 bis 10 und 12 bis 16 gebildet werden. Nsps sind unter anderem für die Bildung funktioneller RTCs erforderlich, die die RNA-Synthese in den DMVs ausführen. Bei der Replikation, bei der das virale Genom (RNA(+)) als Matrize genutzt wird, entsteht ein *Antisense*-Strang (RNA(-)). Dieser wird im Anschluss als Matrize für die Synthese zahlreicher RNA(+)-Stränge verwendet, welcher als Genom-RNA in neue Virionen verpackt werden kann. Außerdem können diese Genom-RNAs für die Translation weiterer Replikase-Polyproteine oder als Matrize für die diskontinuierliche Synthese subgenomischer Minusstränge verwendet werden

Einleitung

[Sawicki & Sawicki, 1995, Sawicki *et al.*, 2007]. Bei einer HCoV-229E-Infektion werden subgenomische RNAs produziert, die für das S-Protein, das akzessorische Protein 4, das E-Protein, das M-Protein und das N-Protein kodieren. Die Membran-assoziierten Strukturproteine S, E und M lagern sich in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ein. Im weiteren Verlauf werden die Proteine dem sekretorischen Signalweg folgend modifiziert bzw. transportiert. Am Golgi-Kompartiment, nahe des ER-Golgi-Zwischenkompartiment (engl. ER-Golgi *intermediate compartment*, ERGIC), akkumulieren M- und E-Proteine. Anschließend erfolgt die Zusammensetzung der viralen Partikel. Die genomische RNA wird an das N-Protein gebunden, wodurch das Nukleokapsid entsteht. Die Interaktion von N- und M-Protein führt zu einer Knospung, wodurch die Viruspartikel in Vesikel verpackt werden. Diese Vesikel werden zur Membran der Wirtszelle transportiert und mittels Exozytose freigesetzt [Sturman *et al.*, 1980, Tooze *et al.*, 1987, Escors *et al.*, 2001]. Im weiteren Verlauf einer Infektion werden weitere (benachbarte) Zellen infiziert und der Zyklus beginnt erneut.

1.5 Interferone und deren Rolle bei der antiviralen Immunantwort

Durch eine Virusinfektion wird eine Vielzahl von Reaktionen in den infizierten Zellen induziert, einschließlich Mechanismen der angeborenen (*innate*) Immunität, um die Virusreplikation in der infizierten Wirtszelle zu unterdrücken und benachbarte Zellen vor dem jeweiligen Pathogen zu schützen. Eine wichtige Rolle spielen dabei Interferone (IFNs). Das sind multifunktionale Zytokine, die von einer Vielzahl von Zellen freigesetzt werden können. IFNs sind in drei Typen und deren Subtypen untergliedert. Zum Typ I zählen unter anderem IFN- α und IFN- β . Typ II umfasst ausschließlich IFN- γ , welches insbesondere von natürlichen Killerzellen und T-Zellen freigesetzt wird. Zum Typ III zählen verschiedene IFN- λ -Subtypen [Alspach *et al.*, 2019, Min *et al.*, 2021].

Während einer viralen Infektion übernehmen Typ-I- und Typ-III-IFNs eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunantwort, wobei Typ-I-IFNs schneller freigesetzt werden. IFN- β und IFN- λ können von unterschiedlichen Zellen synthetisiert werden, während IFN- α von Immunzellen, wie Monozyten oder dendritischen Zellen gebildet werden kann. Es wird angenommen, dass ca. 10 % des menschlichen Genoms von IFNs reguliert werden [Scott *et al.*, 2023], darunter insbesondere die IFN-stimulierten Gene (ISGs), wie IFN-regulierende Faktoren (IRF) oder ausgewählte ADP-Ribosyltransferasen. Zunehmend werden auch Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase 9 (PARP9)- PARP15 (Kapitel 1.8) als ISGs bezeichnet [Biaesch *et al.*, 2023]. ISGs verringern die Virusreplikation, indem sie beispielsweise die virale Transkription und/oder Translation hemmen oder zur Degradation viraler Nukleinsäuren führen. Durch die Sekretion von IFNs können benachbarte Zellen in einen antiviralen Zustand versetzt bzw. Immunzellen zum Infektionsort rekrutiert werden. Allerdings haben Viren Mechanismen entwickelt, die zu einer Hemmung der Produktion von Zytokinen oder zur Inaktivierung von deren Rezeptoren führen.

Einleitung

1.6 Virale Mechanismen zur Umgehung der zellulären Immunantwort

Viren nutzen unterschiedliche Mechanismen, die dazu beitragen, die zelluläre Immunantwort unvollständig, vermindert oder verzögert ablaufen zu lassen [Kikkert, 2020]. Während der Replikation werden virale RNAs und vor allem doppelsträngige RNA-Replikationsintermediate synthetisiert, die sich (je nach Virusfamilie, in unterschiedlichem Umfang) von zellulären RNAs unterscheiden und deshalb vom angeborenen Immunsystem als „fremd“ erkannt werden, wobei sogenannte zytoplasmatische PRRs (engl. *pattern recognition receptors*) eine zentrale Rolle spielen. Um diesen zellulären Erkennungsmechanismen zu entgehen, erfolgt die coronavirale RNA-Synthese weitgehend separiert vom Zytosol innerhalb der DMVs (Abbildung 1-2) [Kikkert, 2020]. Ein Austausch von Substraten (insbesondere Nukleotiden) und Produkten der viralen RNA-Synthese (genomische und subgenomische mRNAs) zwischen dem Innenraum der DMVs und dem Zytoplasma wird durch Poren ermöglicht, an deren Bildung nsp3 und nsp4 maßgeblich beteiligt sind [Zimmermann *et al.*, 2023].

Verschiedene Mechanismen wurden identifiziert, die insbesondere die Expression von IFN-Genen verhindern. Zum einen können virale Proteine wie nsp1 (von SARS-CoV-2 und MERS-CoV) an Ribosomen binden und dadurch die Translation zelleigener mRNAs verhindern [Schubert *et al.*, 2020, Devarkar *et al.*, 2023]. Diese Verringerung der Synthese zellulärer Proteine wird als Wirtszell-*Shutoff* bezeichnet und kann unter anderem zu einer verringerten Expression von Zytokinen und ISGs führen. Die vorhandene Translationskapazität der Zelle kann stattdessen präferentiell für die Synthese viraler Proteine genutzt werden [Nakagawa & Makino, 2021].

Spezifische Interaktionen zwischen viralen und zellulären Proteinen können außerdem die Erkennung viraler Strukturen durch die Zelle beeinflussen oder verhindern. Weiterhin können virale Proteasen spezifische zelluläre Substrate spalten, die an der angeborenen Immunität der Zelle beteiligt sind, um bestimmte antivirale Mechanismen zu unterdrücken. Die von SARS-CoV gebildete *Papain-like-Protease* (PLpro) inhibiert beispielsweise die Phosphorylierung von IRF3, wodurch im weiteren Verlauf Typ-I-IFN vermindert freigesetzt wird [Tanaka *et al.*, 2012, Nakagawa *et al.*, 2016, Kikkert, 2020, Yao *et al.*, 2023].

Darüber hinaus können Proteine durch Modifikationen nach der Translation (engl. *post-translational modifications*, PTMs) reguliert werden. Diese Modifikationen spielen eine Rolle während der Virusaufnahme in die Zelle, der Replikation, der Viruspartikel-Morphogenese und der Immunantwort der Wirtszelle. Zu den PTMs zählen unter anderem Phosphorylierung, Ubiquitylierung und ADP-Ribosylierung [Kikkert, 2020, Cheng *et al.*, 2022]. Nachfolgend wird ausschließlich die ADP-Ribosylierung näher betrachtet.

1.7 ADP-Ribosylierung

Die ADP-Ribosylierung zählt zu den reversiblen post-translationalen Modifikationen von Proteinen und Nukleinsäuren und wurde bereits 1963 identifiziert [Chambon *et al.*, 1963]. Die ADP-

Einleitung

Ribosylierung spielt eine Rolle bei DNA-Reparaturmechanismen, der Genregulation, sowie im Energiemetabolismus [Vyas *et al.*, 2013]. In dieser Arbeit soll ihre besondere Bedeutung für die antivirale Immunantwort in den Fokus gestellt werden. Bekannt ist, dass – neben zellulären und viralen Proteinen – auch DNA bzw. RNA ADP-ribosyliert werden kann [Munir *et al.*, 2018, Zarkovic *et al.*, 2018]. Für (Poly-) ADP-Ribose-Polymere wurde eine Halbwertszeit von wenigen Minuten gemessen. Mono-ADP-Ribose weist hingegen eine signifikant längere Halbwertszeit auf [Wielckens *et al.*, 1982, Alvarez-Gonzalez & Althaus, 1989].

Man unterscheidet zwischen dem Transfer eines (einzigen) ADP-Ribose-Moleküls (Mono-ADP-Ribosylierung, MARYlierung) und mehreren bzw. vielen ADP-Ribose-Molekülen (Poly-ADP-Ribosylierung, PARYlierung). ADP-Ribosylierungen erfolgen unter Verwendung des Kofaktors Nicotinamidadenindinukleotid (engl. *nicotinamide adenine dinucleotide*, NAD⁺) an unterschiedlichen Aminosäuren, wie zum Beispiel Lysin, Arginin, Glutamat, Aspartat oder Cystein. Die Reaktion wird von ADP-Ribosyltransferasen (ARTs) katalysiert. ARTs können in zwei Gruppen unterteilt werden, die *Diphtheria-toxin-like-ADP-Ribosyltransferasen* (ARTD) und die *Cholera-like-ADP-Ribosyltransferasen* (ARTC). Zu der Familie der ARTDs zählen PARPs und Tankyrasen (TNKS) (Kapitel 1.8) [Gibson and Kraus, 2012].

1.8 Humane PARPs und deren Rolle bei der antiviralen Immunantwort

Das menschliche Genom kodiert für 17 PARPs. Diese zeichnen sich unter anderem durch eine hoch konservierte Sequenz innerhalb der katalytischen Domäne aus, die als *PARP signature motif* bezeichnet wird. Die charakteristische Sekundärstruktur bindet NAD⁺, den für die ADP-Ribosylierung benötigten Cofaktor. PARPs sind im Zellkern und/oder dem Zytoplasma lokalisiert. Anhand ihrer Struktur und Funktion erfolgt die Einteilung in DNA-abhängige PARPs (PARP1, PARP2, PARP3), Tankyrasen (PARP5a, PARP5b), PARPs, die eine Makrodomäne (PARP9, PARP14, PARP15) oder ein Cys-Cys-Cys-His (CCCH) Zink-Finger-Motiv und eine WWE PAR-bindende Domäne (PARP7, PARP12, PARP13) besitzen [Zhu *et al.*, 2021]. Die Kategorisierung kann auch anhand der katalytischen Aktivität erfolgen (Tabelle 1-1). Darüber hinaus unterscheiden sich PARPs in ihrer enzymatischen Aktivität insbesondere im Hinblick auf die ADP-Ribosylierung, sodass in der nachfolgenden Tabelle in Poly-ADP-Ribosylierung (PAR) und Mono-ADP-Ribosylierung (MAR) unterteilt wird. Zusätzlich sind die bei Uniprot hinterlegten Sequenzlängen und Proteingrößen aller Isoformen aufgeführt.

Einleitung

Tabelle 1-1: Übersicht der 17 humanen PARPs

Bezeichnung	Sequenzlänge [AS]	Proteingrößen bekannter Isoformen [kDa]	Gruppierung	enzymatische Aktivität
PARP1	1014	113 (11, 108, 35, 42)	DNA-abhängig	PAR
PARP2	583	66 (20, 60, 12)	DNA-abhängig	PAR
PARP3	533/ 540	60 (38, 6)	DNA-abhängig	MAR, PAR
PARP4	1724	193		MAR, PAR
PARP5a	1327	142 (65, 119, 141, 3, 24, 7)	Tankyrase	PAR
PARP5b	1166	127 (128)	Tankyrase	PAR
PARP6	630	71 (58, 43)		MAR
PARP7	657	76 (59, 42)	CCCH PARP	MAR
PARP8	854	96 (91)		MAR
PARP9	854	96 (92, 80, 13, 46)	macroPARP	MAR
PARP10	1025	110 (35, 14, 9, 81, 19, 11, 111, 18, 110, 16, 15)		MAR
PARP11	338	40 (30, 39, 38, 28, 6, 22, 5)		MAR
PARP12	701	79 (9, 19, 5, 47)	CCCH PARP	MAR
PARP13 (ZAP)	902	101 (ZAPL), 78 (ZAPS) (68, 42, 19)	CCCH PARP	katalytisch inaktiv, MAR postuliert
PARP14	1801	203 (194, 171, 189, 90, 21, 33)	macroPARP	MAR
PARP15	678	75 (50, 53, 42)	macroPARP	MAR
PARP16	322	36 (23, 8)		MAR

In den vergangenen Jahren wurden PARPs vermehrt im Bereich der Krebsforschung und im Zusammenhang mit bakteriellen und viralen Infektionen analysiert. Dennoch ist die Mehrheit der 17 identifizierten PARPs bisher nur wenig charakterisiert worden.

PARPs können die antivirale Immunantwort modulieren, indem sie innerhalb verschiedenster Signalwege aktivierend oder inhibierend wirken. Dabei können sowohl zelluläre als auch virale Proteine ADP-ribosyliert werden. PARPs können unter anderem die von RNA-Sensoren regulierte antivirale Immunantwort, die NF- κ B-abhängige Inflammation und die Stress-abhängige angeborene Immunantwort beeinflussen. Stellvertretend für die 17 bisher bekannten humanen PARPs werden

Einleitung

nachfolgend bekannte Signalwege und Interaktionspartner von PARP7 im Zusammenhang mit einer viralen Infektion näher betrachtet.

PARP7, auch bezeichnet als 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induzierte PARP (engl. *TCDD inducible* PARP, TiPARP) oder *ADP-Ribosyltransferase Diphtheria Toxin-Like 14* (ARTD14), ist vor allem im Zellkern, aber auch im Zytosol von Lungen-, Haut- oder Blutzellen zu finden [GeneCards, 2025]. Bei einer Infektion mit SARS-CoV-2 wird PARP7-mRNA vermehrt exprimiert [Heer *et al.*, 2020] und kann als Repressor des Typ-I-IFN-Signalweges wirken [Rasmussen *et al.*, 2023]. Zusätzlich mono-ADP-ribosyliert PARP7 die Serin/Threonin-Protein-Kinase TBK1, wodurch die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7 verhindert wird. Dies führt zu einer verringerten Expression von IFNs und ISGs [Yamada *et al.*, 2016, Rasmussen *et al.*, 2023]. Manetsch *et al.* konnten darüber hinaus eine PARP7-induzierte Mono-ADP-Ribosylierung des *Fos-related antigen 1* (FRA1 bzw. FOSL1) nachweisen [Manetsch *et al.*, 2023]. FRA1 wird dadurch stabilisiert. Allerdings kann keine Interaktion mit IRF1 erfolgen, wodurch die Expression verschiedener ISGs, wie *retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I) verhindert wird [Naulin *et al.*, 2024]. Eine Auswahl der beschriebenen Interaktionen ist in Abbildung 1-3 dargestellt.

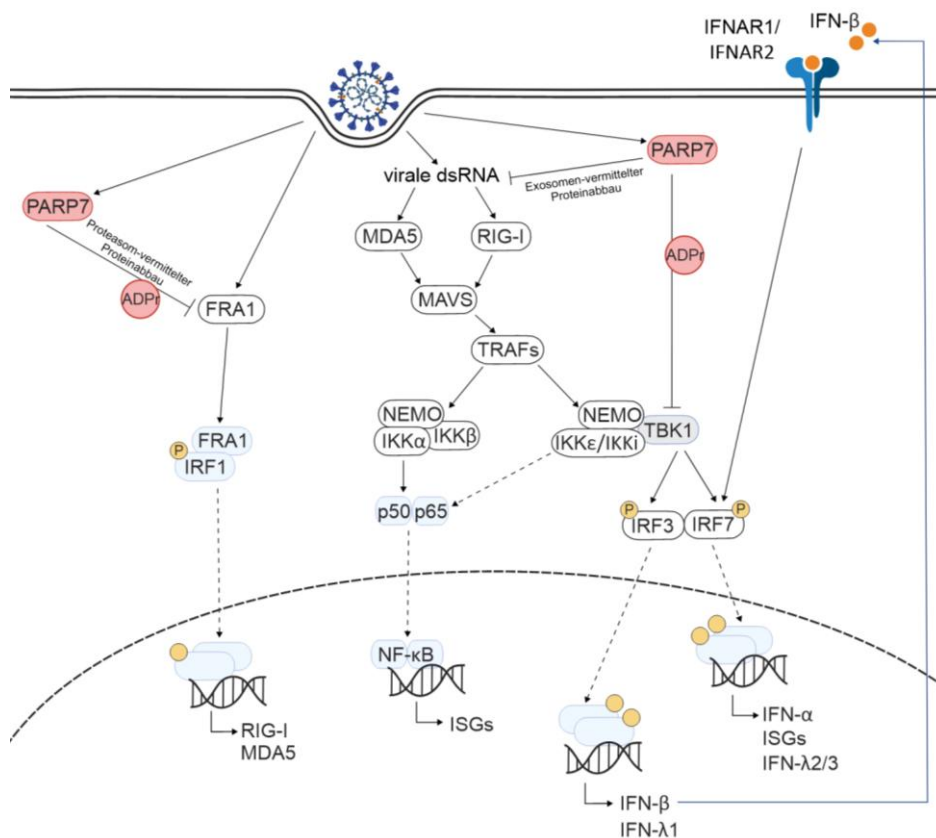


Abbildung 1-3: Übersicht ausgewählter antiviraler Signalwege. Durch eine Infektion werden verschiedene antivirale Signalwege aktiviert, darunter beispielsweise FRA1, MDA5 und RIG-I. Dies führt zur erhöhten Genexpression bzw. Freisetzung von IFNs und ISGs. IFNs können benachbarte Zellen bereits vor einer Infektion aktivieren. Für ausgewählte Signalwege bzw. Proteine wurde ein Zusammenhang mit PARP7 postuliert. Bekannte PARP7-assoziierte Modifikationen durch ADP-Ribosylierung sind rot hervorgehoben.

Einleitung

Im Kontext von Virusinfektionen wurden für PARP7 sowohl pro- als auch antivirale Wirkungen beschrieben. Während PARP7 durch die ADP-Ribosylierung von TBK1 die Replikation von Influenza-A-Viren fördert, wird die RNA des Sindbisvirus (eines Alphavirus) nach der Bindung an PARP7 degradiert [Atasheva *et al.*, 2014, Yamada *et al.*, 2016, Kozaki *et al.*, 2017]. Eine andere Studie zeigte, dass die Expression von PARP7 nicht nur durch die Infektion mit dem murinen Hepatitisvirus (engl. *mouse hepatitis virus*, MHV), sondern auch durch die Zugabe von IFN- β induziert wird [Grunewald *et al.*, 2019]. Weitere Substrate für die ADP-Ribosylierung sind DNA-Reparatur-Proteine, wie PARP1 und PARP2, sodass PARP7 vermutlich auch eine regulatorische Rolle bei der Reparatur von DNA-Schäden spielt [Palavalli Parsons *et al.*, 2021]. Zusätzlich wurde gezeigt, dass PARP7 sich selbst ADP-ribosylieren kann [MacPherson *et al.*, 2013]. Welche Auswirkungen diese Modifikation auf die Aktivität des Proteins hat, ist bisher unklar. Für PARP1 konnte eine Funktionsänderung bestätigt werden [Prokhorova *et al.*, 2021].

Eine ADP-Ribosylierung kann durch die Abspaltung von ADP-Ribose rückgängig gemacht werden. Der Prozess wird als De-ADP-Ribosylierung bezeichnet. Diese Modifikation wird von ADP-Ribosylhydrolasen, Enzymen mit Phosphodiesterase-Aktivität, sowie von Makrodomänen katalysiert [Li *et al.*, 2022]. Auch für coronavirale MacDs konnte eine de-ADP-ribosylierende Aktivität gezeigt werden [Li *et al.*, 2016, Fehr *et al.*, 2018].

1.9 Virale Makrodomäne und deren Funktion als De-ADP-Ribosylhydrolase

In den frühen 1990er Jahren wurde eine hoch konservierte Region in nsp3, dem größten nsp von CoVs, in einer Vergleichsstudie von Einzelstrang-RNA-Viren identifiziert und aufgrund der unbekanntenen Funktion zunächst als X-Domäne bezeichnet [Lee *et al.*, 1991]. Später erfolgte die Umbenennung bedingt durch die Ähnlichkeit mit der C-terminalen Domäne (MacroH2A) des H2A-Histons [Pehrson and Fuji, 1998]. Die Makrodomäne konnte bei Vertretern der *Coronaviridae*, *Togaviridae*, *Iridoviridae*, sowie bei Rubella-Virus und Hepatitis-E-Virus nachgewiesen werden. Darüber hinaus ist sie in Archaeen, Hefen, Bakterien und Eukaryoten zu finden [Rack *et al.*, 2016, Fehr *et al.*, 2018, Leung *et al.*, 2018, Rack *et al.*, 2020].

Im Genom von HCoV-229E ist die für die MacD kodierende Sequenz (516 Nukleotide) im nsp3 (4761 Nukleotide) lokalisiert. Neben der MacD enthält nsp3 weitere Domänen wie beispielsweise die viralen Proteasen (PL1 und PL2). Die MacD-Proteindomäne besteht aus 172 Aminosäuren, welche in einer $\alpha/\beta/\alpha$ -Sandwich-Faltung angeordnet sind (Abbildung 1-4). Die Veröffentlichung der Kristallstruktur der MacD von SARS-CoV ermöglichte die Identifizierung von Aminosäuren, welche an der ADP-Ribosylierung, unter anderem durch die Bindung und Positionierung der ADP-Ribose, beteiligt sind [Saikatendu *et al.*, 2005, Egloff *et al.*, 2006]. Sequenzvergleiche zeigen, dass Alpha- und Betacoronaviren hoch konservierte Sequenzmotive, wie Valin-Asparagin-Alanin/Prolin-Alanin-Asparagin (VNAAN bzw. VN PAN), Valin-Glycin-Prolin (VGP) und Glycin-Isoleucin-Phenylalanin (GIF) besitzen, die auch in Delta- und Gammacoronaviren zu finden sind [Hassler *et al.*, 2011].

Einleitung

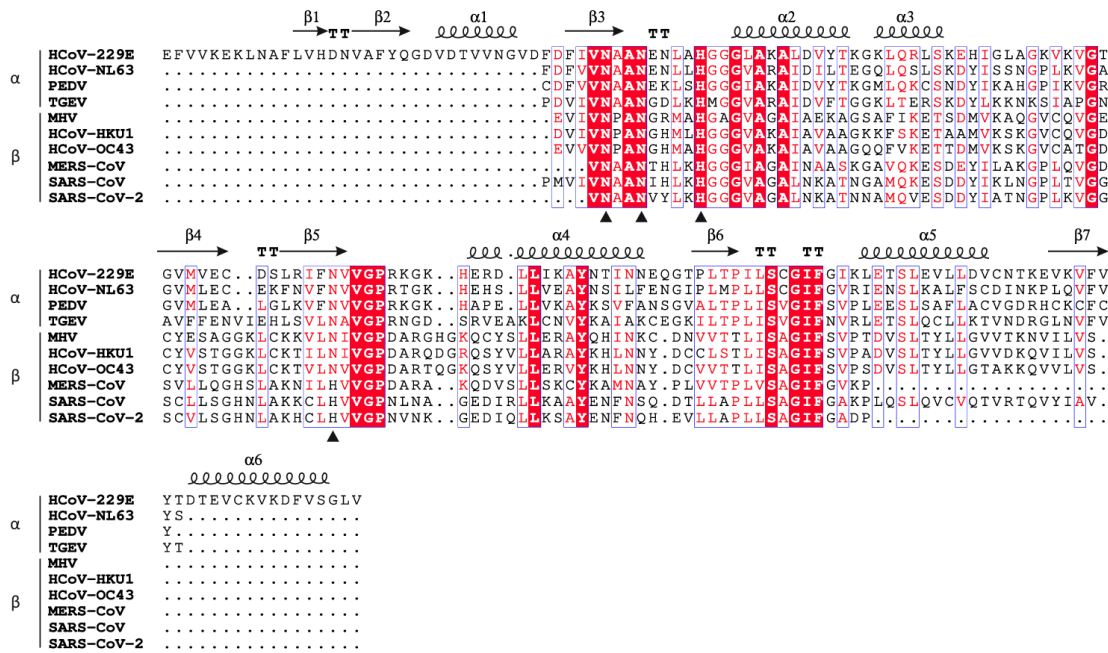


Abbildung 1-4: Alignment von Makrodomänen verschiedener Alpha- und Betacoronaviren. Die Sequenzen wurden von der *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) Webseite entnommen und mit Hilfe von Clustal-Omega und ESPript [Robert & Gouet, 2014] verglichen und dargestellt. Rot hinterlegt sind Aminosäuren, die zwischen allen aufgeführten Viren konserviert sind. Aminosäuren in roter Schrift kennzeichnen die Konservierung physiko-chemisch verwandter Aminosäuren. Blau umrahmt sind (in dieser Auswahl) überwiegend konservierte Aminosäuren. Oberhalb der Sequenz ist die Sekundärstruktur der HCoV-229E-MacD abgebildet (PDB: 3EWQ). Substituierte Aminosäuren, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind durch schwarze Dreiecke gekennzeichnet.

Konservierte Aminosäuren sind insbesondere an der Oberfläche bzw. nahe der ADP-Ribose-Bindungstasche lokalisiert. Das VNAAN- bzw. VNPAN-Motiv wird mit der katalytischen Bindungstasche assoziiert und übernimmt dabei die Positionierung der distalen Ribose und des Proteins [Rack *et al.*, 2020]. Auch das GIF-Motiv ist an der Anordnung der Ribose mittels Van-der-Waals-Wechselwirkungen beteiligt [Alhammad & Fehr, 2020].

Die enzymatische Aktivität der coronaviralen Makrodomäne war zunächst unklar, bis es gelang, eine ADP-Ribose-1st-Phosphatase-Aktivität [Putics *et al.*, 2005] und einige Jahre später eine Hydrolase-Aktivität, bei der ADP-Ribose von Proteinen abgespalten wird, nachzuweisen [Rosenthal *et al.*, 2013, Li *et al.*, 2016]. Für eine De-ADP-Ribosylierung wird die Bindung an mono- oder poly-ADP-Ribose vorausgesetzt, weshalb MacDs eine sogenannte *ADP-ribose recognition domain* besitzen. Neben Mono- bzw. Poly-ADP-Ribose können auch deren Derivate, wie beispielsweise ADP-Ribose-1st-Phosphat (Appr1p), als Substrat dienen. Die Bindung und anschließende Hydrolyse von ADPr spielt eine Rolle in diversen zellulären Prozessen [Egloff *et al.*, 2006, Palazzo *et al.*, 2019]. Putics *et al.* zeigten, dass ein Aktivitätsverlust der MacD jedoch keinen Einfluss auf die Synthese viraler RNA *in vitro* hat. Diese und weitere Studien weisen darauf hin, dass virale MacDs keine direkte Rolle bei der Synthese der viralen RNA besitzen [Putics *et al.*, 2005, Egloff *et al.*, 2006]. In einigen CoVs (MHV und MERS-CoV) scheint die MacD jedoch entscheidend an der Replikation *in vitro*, der Pathogenese *in vivo* und/oder der Immunantwort beteiligt zu sein [Eriksson *et al.*, 2008, Alhammad *et al.*, 2023].

Einleitung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden revers-genetisch hergestellte HCoV-229E-MacD-Mutanten verwendet, die an den in Abbildung 1-4 durch schwarze Pfeile hervorgehobenen Aminosäurepositionen Substitutionen enthielten. Frühere biochemische Untersuchungen mit bakteriell hergestellten MacD-Varianten hatten gezeigt, dass diese Substitutionen (in unterschiedlichem Umfang) zu einer verminderten De-ADP-Ribosylierungsaktivität führten. N1302, N1305 bzw. H1310 wurden dabei mit Alanin substituiert. N1357 wurde zu Histidin, Serin oder Glutamin mutiert. Frühere Studien unter Verwendung einer MHV_N1347A-Mutante hatten eine verringerte Replikation und Pathogenese dieser MacD-Mutante nachweisen können [Eriksson *et al.*, 2008, Grunewald *et al.*, 2019]. Diese MHV-Mutante entspricht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten HCoV-229E_N1305A-Mutante. Andere Studien legten den Schluss nahe, dass N1302, N1305 und H1310 Teil des aktiven Zentrums der MacD sind und vermutlich eine Rolle bei der Katalyse oder Substratbindung spielen [Putics *et al.*, 2005]. Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit eine Deletionsmutante (HCoV-229E_ΔMacD) als weitere Kontrolle verwendet, bei der die kodierende Sequenz der kompletten MacD aus der nsp3-Sequenz entfernt wurde (diese umfasst die in Abbildung 1-4 dargestellten Aminosäurereste E1265 bis V1434).

Material

2. Material

In den nachfolgenden Unterkapiteln sind die verwendeten Chemikalien, Organismen und Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

2.1 Synthetische Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma IDT, Coralville, Iowa (USA), bezogen. Nachfolgend sind synthetische Oligonukleotide aufgeführt, die für Klonierungen, Reverse Transkription mit nachfolgender quantitativer PCR (RT-qPCR), Mutagenesen und Sequenzierungen verwendet wurden. Die Sequenzen sind jeweils in 5'-3'-Richtung dargestellt und die Orientierung als *forward* (fwd) oder *revers* (rev) angegeben.

Tabelle 2-1: Übersicht der verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Bezeichnung des erzeugten Plasmids
Primer für Validierung der HCoV-229E-MacD-Mutanten		
Oli45 (fwd)	5´-GTTGTTGACCAAGTTGAAG-3´	--
AP168 (fwd)	5´-TTGTACGCCCACTAAGAAGGC-3´	--
TNI 6,2k down (rev)	5´-AAAGTAAGCATAGAGTCAGTAAAC-3´	--
5550 dn (rev)	5´-CTTCAGCATCACCCCTTGTCACC-3´	--
Primer für mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-qPCR		
PARP1-qRT-fwd	5´-TGGAACATCAAGGACGAGCT-3´	--
PARP1-qRT-rev	5´-CATCGCTCTTGAAGACCAGC-3´	--
PARP2-qRT-fwd	5´-CTCCCTTGAAGCCAGAGTCA-3´	--
PARP2-qRT-rev	5´-CTGCCTTGATTTGTGCCACT-3´	--
PARP3-qRT-fwd	5´-TACCAGCTTCTCAAGTGCCA-3´	--
PARP3-qRT-rev	5´-CACAGCAGCTTCCGATTACC-3´	--
PARP4-qRT-fwd	5´-GACATCACACCACCTCCTGA-3´	--
PARP4-qRT-rev	5´-CCTCCCTCCATTCCCACTTT-3´	--
PARP5a-qRT-fwd	5´-AGTCTTCTCCCCTGCACTTC-3´	--
PARP5a-qRT-rev	5´-CCTGGCATTGGATCAGCTC-3´	--
PARP5b-qRT-fwd	5´-ACGGACAAATGGGCTTTCAC-3´	--
PARP5b-qRT-rev	5´-AACAAGAGGGCAGAGCAGAT-3´	--
PARP6-qRT-fwd	5´-GAGGCACAGTTGGTTCAAGG-3´	--
PARP6-qRT-rev	5´-GATGGAACGGTTCATGAGGC-3´	--
PARP7-qRT-fwd	5´-TGACCCTCGAGTCTGTGGAA-3´	--
PARP7-qRT-rev	5´-TCATGCCATGACTGCCATT-3´	--
PARP8-qRT-fwd	5´-ACTTTTGAACCGTCCTTGCC-3´	--

Material

PARP8-qRT-rev	5´-TGGAGTAGGACTTGCTGAGC-3´	--
PARP9-qRT-fwd	5´-GAGTCTCCAGAACCACCACA-3´	--
PARP9-qRT-rev	5´-TCCTTGCCATTTCTCCTGT-3´	--
PARP10-qRT-fwd	5´-CTGTGGACCTGCTGTTGCTG-3´	--
PARP10-qRT-rev	5´-GGATGTCGTAGTGGGGGACA-3´	--
PARP11-qRT-fwd	5´-CTGTGAAAACGAGGCCATCC-3´	--
PARP11-qRT-rev	5´-CCTGCAAAAGAACTCCCACA-3´	--
PARP12-qRT-fwd	5´-TCCTCTGTCACCAAACCTCC-3´	--
PARP12-qRT-rev	5´-CTCGTAGTTGTGCTTTCCGG-3´	--
PARP13-qRT-fwd	5´-CGCAAGTTCACGTATCTGGG-3´	--
PARP13-qRT-rev	5´-AGGTAAGTGCTGCCTGGATT-3´	--
PARP14-qRT-fwd	5´-ATCTCAAAGCAGGGGTCTCC-3´	--
PARP14-qRT-rev	5´-TGGGAGGCAAATGGATGAGT-3´	--
PARP15-qRT-fwd	5´-CTGTTTTGCATGGTCCAGCT-3´	--
PARP15-qRT-rev	5´-ACTGAGTCTGCATCTGTCCC-3´	--
PARP16-qRT-fwd	5´-CGTCAAGTGCCAAACCAAGA-3´	--
PARP16-qRT-rev	5´-TCTTGGGTGGCTTCTGTGAA-3´	--
IRF3_3040-fwd	5´-TCTGCCCTCAACCGCAAAGAAG-3´	--
IRF3_3274-rev	5´-TACTGCCTCCACCATTGGTGTC-3´	--
IRF7_3505-fwd	5´-CCACGCTATACCATCTACCTGG-3´	--
IRF7_3855-rev	5´-GCTGCTATCCAGGAAGACACA-3´	--
TBK1_38573-fwd	5´-CAACCTGGAAGCGGCAGAGTTA-3´	--
TBK1_44059-rev	5´-ACCTGGAGATAATCTGCTGTCTGA-3´	--
GAPDH-fwd	5´-CTGCTCCTCCTGTTTCGACAGT-3´	--
GAPDH-rev	5´-CCGTTGACTCCGACCTTCAC-3´	--

Primer für die Klonierung für CRISPR/Cas9-System		
PARP7_sgRNA1_fwd	5´-CACCGTGCCTACACAGTCTGGCTC-3´	Lenti-CRISPR-v2-PARP7-sgRNA1
PARP7_sgRNA1_rev	5´-AAACGAGCCAGACTGTGTAGTGAC-3´	
PARP7_sgRNA2_fwd	5´-CACCGAAGGATGGGCTTCCGGTATC-3´	Lenti-CRISPR-v2-PARP7-sgRNA2
PARP7_sgRNA2_rev	5´-AAACGATACCGGAAGCCCATCCTTC-3´	
PARP7_sgRNA3_fwd	5´-CACCGGGTTCACCAGCTCAAACACG-3´	Lenti-CRISPR-v2-PARP7-sgRNA3
PARP7_sgRNA3_rev	5´-AAACCGTGTGTTGAGCTGGTGAACCC-3´	

(RT-q) PCR-Amplifikations bzw. Sequenzierprimer für CRISPR/Cas9-System		
hU6-fwd	5´-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3´	--
HIV-psi_fwd	5´-GAGAGAGATGGGTGCGAGAG-3´	--
HIV-psi_rev	5´-CCCTCATATCTCCTCCTCCA-3´	--
CAS9_fwd	5´-GACATCGGCACCAACTCTGT-3´	--

Material

CAS9_rev	5´-GGTGCTGTCCACCAGTTTCT-3´	--
PARP7_565_fwd	5´-GAGCAGTTGGAGCTAATCCAC-3´	--
PARP7_759_rev	5´-CCTCAAAGACCTCAGGGTTCC-3´	--
PARP7_1429_rev	5´-CACTCTGCCACTTTTGAGTAG-3´	--
PARP7_1474_rev	5´-GGTTACAGTAAAATCTTTCC-3´	--

2.2 Verwendete Enzyme

Sofern nicht separat beschrieben, wurden die in Tabelle 2-2 aufgelisteten Enzyme und die zugehörigen Puffer laut Herstellerangaben eingesetzt.

Tabelle 2-2: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Verwendung
<i>DreamTaq</i> DNA Polymerase (5 U/µl) und zugehörige Puffer	Thermo Fisher Scientific (EP0702)	PCR
Esp3I (BsmBI) (10 U/µl)	Thermo Fisher Scientific (ER0452)	Lenti-CRISPR v2 Plasmid Ligation
Maxima Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Thermo Fisher Scientific (EP0742)	Reverse Transkription
<i>Phusion High Fidelity</i> DNA Polymerase (2 U/µl) und zugehörige Puffer	Thermo Fisher Scientific (F530L)	PCR für Klonierungen/ Mutagenesen
RNase A (10 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific (EN0531)	Plasmidaufreinigung
RNase-Free DNase Set	Qiagen (79254)	<i>On-column</i> DNase-Verdau für NGS-Probenpräparation
RQ1 RNase-free DNase (1 U/µl) und zugehörige Puffer	Promega (M6101)	DNase-Verdau in isolierten RNA-Proben
T4-DNA-Ligase (400.000 U/ml)	New England Biolabs (M0202S)	Lenti-CRISPR v2 Plasmid Ligation
T4-PNK (10.000 U/ml)	New England Biolabs (M0201S)	Lenti-CRISPR v2 Plasmid Ligation

Material

2.3 Marker

Die Größenordnung von Nukleinsäuren bzw. Proteinen erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 2-3 aufgeführten Marker.

Tabelle 2-3: Verwendete Marker

	Bezeichnung	Hersteller (Bestellnummer)
DNA-Größenmarker	<i>GeneRuler 1 kb DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (SM0311)
	<i>GeneRuler Low Range DNA Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (SM1193)
RNA-Größenmarker	<i>RNA ScreenTape Ladder</i>	Agilent Technologies (5067-5578)
Protein-Molekulargewichtsmarker	<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Fisher Scientific (26617)

2.4 Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 2-4: Verwendete Kits

Name	Hersteller
Human IFN-beta DuoSet ELISA	R&D Systems/ biotechnie (DY814-05)
innuPREP <i>PCRpure</i> Kit	Analytik Jena (845-KS-5010250)
<i>Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit</i>	New England Biolabs (E3005L)
<i>Mini-Viral RNA Extraction Kit</i>	Zymogen
Monarch DNA Gel <i>Extraction</i> Kit	NEB (T1020L)
<i>NucleoSpin Tissue genomic DNA from tissue Kit</i>	Macherey-Nagel (740952.50)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (12145)
<i>RNA Clean & Concentrator™-5</i>	Zymo Research (R1015)
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen (74106)
<i>SYBR™ Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems (4309155)
<i>Quick-RNA™ Viral Kit</i>	Zymo Research (R1034)

Material

2.5 Filter und Membranen

Die verwendeten Filter und Membranen sind Tabelle 2-5 zu entnehmen.

Tabelle 2-5: Filter und Membranen

Bezeichnung	Hersteller	Verwendung
Whatman™ 3MMCHR	GE Healthcare	Blotting-Papier
FP 30/0.2 CA-S	Whatman	0,2 µm Filter
Protan™ 0,45 µM NC	Amersham™	Membran für den Western Blot (Nitrocellulose)
Immobilon-P Transfer Membran, PVDF, Porengröße 0,45 µm, 26,5 cm x 3,75 m	Merck (IPVH00010)	Membran für den Western Blot (PVDF)

2.6 Antikörper

Alle verwendeten Antikörper, die eingesetzten Verdünnungen und Anwendungen (IF: Immunfluoreszenz, WB: Western Blot) sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 2-6: Antikörper

Antikörper	Verwendung	Verdünnung	Firma (Bestellnummer)
Primärantikörper			
<i>mouse</i> anti-beta Actin mAK	WB	1:4.000	Santa Cruz (sc-47778)
<i>mouse</i> anti-GAPDH mAK (6C5)	WB	1:4.000	Abcam (ab8245)
<i>mouse</i> anti-HCoV-229E-N-AK	IF WB	1:200 1:250	Eurofins/Ingenasa M.30.HCo.B1E7; Batch 250609
<i>mouse</i> anti-IRF-3 (D9J5Q) mAK	WB	1:250	Cell Signaling (10949S)
<i>rabbit</i> anti-FRA1 pAK	WB	1:250	Invitrogen (PA5-76185)
<i>rabbit</i> anti-PARP7 pAK	WB	1:250	Abcam (ab84664)
<i>rabbit</i> anti-PARP9 pAK	WB	1:250	Abcam (ab53796)

Material

<i>rabbit</i> anti-Poly/Mono-ADP Ribose (D9P7Z) mAK	WB	1:500	Cell Signaling (89190S)
<i>rabbit</i> anti-TBK1/NAK (D1B4) mAK	WB	1:250	Cell Signaling (3504S)
Sekundärantikörper			
AlexaFluor® 594 F(ab') ₂ Fragment <i>goat-α-mouse</i> IgG	IF	1:500	Invitrogen (A11005)
AlexaFluor® 488 F(ab') ₂ Fragment <i>goat-α-rabbit</i> IgG	IF	1:500	Invitrogen (A11070)
IRDye 800CM, <i>goat</i> anti- <i>mouse</i>	WB	1:15.000	LI-COR Biosciences (926-32210)
IRDye 800CM, <i>goat</i> anti- <i>rabbit</i>	WB	1:15.000	LI-COR Biosciences (926-32211)
Goat anti- <i>rabbit</i> Immunoglobulins HRP pAK	WB	1:2.000	Dako (P0448)
Goat anti- <i>mouse</i> Immunoglobulins HRP pAK	WB	1:2.000	Dako (P0447)

2.7 *Escherichia coli*-Stamm

Für sämtliche Klonierungen wurde der *Escherichia coli* (*E. coli*)-Stamm TOP10F'.

Tabelle 2-7: Verwendeter *Escherichia coli*-Stamm

Stamm	Genotyp
TOP10F'	F'[<i>lacI</i> ^q Tn10(<i>tet</i> ^R)] <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL(Str</i> ^R) <i>endA1</i> λ

Material

2.8 Eukaryotische Zellen

Für sämtliche *in cellulo* durchgeführten Versuche wurden die nachfolgenden Zelltypen verwendet.

Tabelle 2-8: Übersicht der verwendeten eukaryotischen Zellen

Bezeichnung	Kurzbeschreibung der Zellen	Hersteller (Bestellnummer)
A549	humane Lungenkrebs-Zelllinie	CLS (300114)
A549 ^{CD13+/TMPRSS2+}	humane Lungenkrebs-Zelllinie, die CD13 und TMPRSS2 exprimieren	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Krysztof Pyrc
HEK-293FT	humane, embryonale Nierenzellen (engl. <i>human embryonic kidney</i>), schnell wachsend (F), transfiziert mit SV40 T Antigen (T)	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Kracht
Huh-7	humane Hepatom-Zellen	CLS (300156)
MRC-5	humane Lungenfibroblasten	ATCC (CCL-171)
THP-1	humane Monozyten isoliert von einem Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML)	DSMZ (ACC16)

2.9 Antibiotika und Inhibitoren

Die verwendeten Antibiotika und Inhibitoren sind Tabelle 2-9 zu entnehmen.

Tabelle 2-9: Verwendete Antibiotika und Inhibitoren

Name	Hersteller (Bestellnummer)	Verwendung
Ampicillin	Carl Roth (K029.2)	Transformation von <i>E. coli</i> Top10 F' [100 mg/ml in ddH ₂ O]
Atamparib (RBN-2397)	Selleckchem.com (S8993)	PARP7-Inhibitor
Blasticidin S	Sigma-Aldrich (SBR00022)	Selektion der A549 ^{CD13+/TMPRSS2+} -Zellen
Geneticin G418	Gibco (10131027)	
Leupeptin hemisulfate	Carl Roth (CN33.1)	Proteinisolation
Microcystin	Enzo (ALX-350-012-C100)	Proteinisolation
Penicillin/ Streptomycin	Gibco (15140122)	Zellkultivierung
Pepstatin A	Appllichem (A2205)	Proteinisolation

Material

Phenylmethyl-sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich (P7626)	Proteinisolation
Protease Inhibitor	Roche (04693132001)	Proteinisolation
Puromycin	Sigma-Aldrich (P8833)	Selektion der <i>Knockout</i> -Zellen
<i>RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor</i>	Invitrogen (P/N100000840)	Proteinisolation

2.10 Plasmide

Die für das CRISPR/Cas9-System benötigten Plasmide wurden von Prof. Dr. Kracht zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2-10: Verwendete Ausgangsplasmide

Bezeichnung	Resistenz	Verwendung	Hersteller (Bestellnummer)
pMD2.G	Ampicillin	Transfektions-Helferplasmid für CRISPR-Cas9-System	Addgene (12259)
psPAX2	Ampicillin	Transfektions-Helferplasmid für CRISPR-Cas9-System	Addgene (12260)
Lenti-CRISPR-LCV2	Ampicillin, Puromycin	Klonierung der sgRNA für CRISPR-Cas9-System	Addgene (52961)

2.11 Puffer und Medium

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer bzw. Medien ist in Tabelle 2-11 aufgeführt.

Tabelle 2-11: Verwendete Puffer und Medium

Bezeichnung	Zusammensetzung	Verwendung
Avicell™-MEM-Gemisch	1,2 % Avicell™ [2,4 % [w/v] Avicell™ in H ₂ O gelöst] 1X MEM 10 % FBS	Titration mittels Plaque-Assay
Blockierlösung	5 % [w/v] Milchpulver 0,1 % [v/v] Tween-20 in TBS-Puffer	Western Blot Blockierlösung

Material

CaCl ₂ -Lösung	10 mM PIPES [pH 7,0] 60 mM CaCl ₂ 15 % [v/v] Glycerin	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>
ELISA-Substratlösung	Phosphat-Citrat-Puffer 46 mM Zitronensäure-1-hydrat 100 mM Na ₂ HPO ₄ in H ₂ O gelöst [pH 5,0] 1 mg TMB (gelöst in 1 ml DMSO) 1,7 µl 35 % H ₂ O ₂ pro 9 ml Puffer frisch hinzufügen	ELISA
Fixierlösung	3,7 % Formaldehyd in PBS	Mikroskopie
Kristallviolett-Lösung	0,15 % [w/v] Kristallviolett 20 % [v/v] Ethanol	Titration mittels Plaque-Assay
6X Ladepuffer für DNA-Proben	10 mM Tris-HCl [pH 7,6] 60 % [w/v] Glycerin 60 mM EDTA 0,03 % [w/v] Bromophenolblau 0,03 % [w/v] Xylencyanol FF	Gelelektrophorese
1X Laemmli-Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,1 % [w/v] SDS	SDS-PAGE
4X Laemmli-Probenpuffer	250 mM Tris-Base 4 % [w/v] SDS 20 % [v/v] Glycerin 0,02 % [w/v] Bromphenolblau 20 % β-Mercapthoethanol [pH 6,8]	SDS-PAGE
LB-Agarplatten	LB-Medium 15 g/l Micro Agar	<i>E. coli</i> Kultivierung
Luria-Bertani (LB)-Medium	1 % [w/v] Trypton 1 % [w/v] NaCl 0,5 % [w/v] Hefeextrakt gelöst in ddH ₂ O	<i>E. coli</i> Kultivierung

Material

1X PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ [pH 7,3]	Zellkultur, IF
Permeabilisierungslösung	0,1 % Triton-X-100 in PBS	Mikroskopie
Ponceau S-Färbelösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure	Validierung Proteinübertrag auf PVDF-Membran
Puffer 1	50 mM Tris-Cl [pH 7,5] 10 mM EDTA 0,1 µg/ml RNaseA	Plasmid-Minipräparation
Puffer 2	200 mM NaOH 1 % [w/v] SDS	
Puffer 3	3 M Kaliumacetat [pH 5,0]	
RIPA-Puffer	50 mM Tris-Cl [pH 7,5] 150 mM NaCl 1 % [v/v] Triton X-100 0,5 % [w/v] Natriumdesoxycholat 0,1 % [w/v] SDS 1 mM EDTA	Gesamtproteinisolation durch Zelllyse
Sammelgelpuffer	1 M Tris [pH 6,8]	SDS-PAGE
Spezial-Lysepuffer	10 mM Tris [pH 7,05] 30 mM Na ₄ P ₂ O ₇ 50 mM NaCl 1 % Triton-X-100 2 mM Na ₃ VO ₄ 50 mM NaF 20 mM β-Glycerophosphat 1 µg Pepstatin A 10 µg Leupeptin hemisulfate 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid 1 µM Microcystin pro ml Spezial-Lysepuffer frisch hinzugeben	Proteinisolation
5X TAE-Puffer	800 mM Tris-Base 1 M Essigsäure 50 mM EDTA	Gelelektrophorese

Material

	[pH 8,0]	
5X TBE-Puffer	445 mM Tris-Base 445 mM Borsäure 10 mM EDTA [pH 8,0]	Gelelektrophorese
10X TBS-Puffer	100 mM Tris-Base 1,5 M NaCl [pH 8,0]	Western Blot
1X TBS-T	0,1 % [v/v] Tween-20 in TBS	Waschlösung Western Blot
TNE-Puffer	40 mM Tris 140 mM NaCl 1 mM EDTA [pH 7,4]	Virusaufreinigung mit 30 % Succrose-TNE Puffer mittels Ultrazentrifugation
1X Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % [v/v] Methanol	Western Blot
Trenngelpuffer	1 M Tris [pH 8,8]	Western Blot

2.12 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2-12 mit der Angabe von Hersteller und Katalognummer aufgeführt.

Tabelle 2-12: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller (Bestellnummer)
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung: Roti-phorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth (3029.1)
Agar-Agar	Carl Roth (6494.3)
Albumin Standard	Thermo Scientific (23209)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (13375)
Avicel RC-591 MCC/ <i>Carboxymethylcellulose Sodium</i>	Dupont (RC591-NFDR080I)
Borsäure	Carl Roth (6943.6)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (8076.4)
Bromphenolblau	Sigma Aldrich (B-5525)
10X <i>Buffer</i> for T4-DNA-Ligase (10 mM ATP)	New England Biolabs (B0202S)
10X <i>Buffer</i> Tango (with BSA)	Thermo Fisher (BY5)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (2382)
<i>CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)</i>	Promega (G3582)

Material

Chloroform	Carl Roth (Y015.2)
DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol	Sigma Aldrich (D9542)
DMEM	Gibco (41966-029)
DMSO	Thermo Fisher (F-515)
100 mM dNTP Set (ATP, CTP, UTP, GTP)	Invitrogen (10297-018)
ECL™ <i>Western Blotting Detection Reagents</i>	Cytiva (RPN2106)
Essigsäure 100 %	Carl Roth (3738.5)
Ethanol 70 %	SAV Liquid Production GmbH (ETO-5000-70-1)
Ethanol ≥ 99,8 %	Honeywell (24102-2.5L)
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich (E-8751)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck (1.08418)
<i>Fetal Bovine Serum</i>	Gibco (A5256701)
Formaldehydlösung 37 %	Carl Roth (4979.1)
Giemsa-Lösung	Carl Roth (T862.2)
Glycerin/ Glycerol	Carl Roth (3783.2)
β-Glycerophosphat	Sigma Aldrich (G-6251)
IL-4	Prepotech (200-04)
IL-13	Prepotech (200-13)
<i>Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate</i>	Millipore (WBKLS0500)
Interferon-α	Invitrogen (111012)
Interferon-β (Hu-IFN-β 1a)	Biozol (PBL-11410-2)
Interleukin-29/ Interferon Lambda 1, <i>human cell-expressed</i>	Biozol (PBL-11725-1)
Isopropanol	Honeywell (33539-2.5L)
Kaliumacetat	Merck (1.04820)
Kaliumchlorid	Carl Roth (6781.1)
(Di-) Kaliumdihydrogen-phosphat	Carl Roth (T875.1)
Kristalviolett	Sigma Aldrich (61135-25G)
Lipofectamine™ LTX Reagenz mit PLUS Reagenz	Invitrogen (15338100)
LPS <i>E. coli</i> O111:B4	Sigma Aldrich (L2630 (10 mg))
Luria-Bertani (LB)-Medium	Carl Roth (X968.3)
Magermilchpulver	Sucofin
May-Grünwald-Lösung	Carl Roth (T863.2)
MEM (2X)	Gibco (21935-028)
β-Mercaptoethanol	Carl Roth (4227.3)
Methanol	Honeywell (32213-2.5L)
Natriumazid	Carl Roth (K305.1)
Natriumchlorid	Carl Roth (P029.3)

Material

Natriumdesoxycholat	Merck (6504)
Tetra-Natriumdiphosphat	Carl Roth (T833.1), AppliChem (121710.1211)
Natriumfluorid	Merck (6449), AppliChem (A0401)
Di-Natriumhydrogen-phosphat Dihydrat	Carl Roth (4984.1)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth (CN30.3)
Natriumhydroxid	Carl Roth (6771.1)
Natriumorthovanadat	AppliChem (A2196)
Nuklease-freies Wasser	New England Biolabs (B1502E)
Oligo(dT)18 Primer (0,5 µg/µl)	Thermo Fisher (S0132)
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma Aldrich (P1585-5MG) 1 mM PMA in DMSO
1,4-Piperazindiethansulfon-säure (PIPES)	Sigma Aldrich (P-1851)
Polybrene (Hexadimethrinbromid)	Sigma Aldrich (1076898)
T4-Polynucleotide Kinase Buffer (10X)	New England Biolabs (B0201S)
Ponseau S	Merck (15927)
<i>ProLong Gold Antifade Mountant</i>	Invitrogen (P36934)
<i>Random Hexamers</i>	Invitrogen (N8080127)
<i>Recombinant Human IFN-γ</i>	R&D Systems (285-IF-100)
RNA ScreenTape Sample Buffer	Agilent Technologies (5067-5577)
RPMI-1640 Medium	Sigma Aldrich (R8758-500ml)
ROTI Load 1 (4X)	Carl Roth (K929.1)
Roti®-Quant-Reagenz (5X)	Carl Roth (K015.3)
Saccharose	Carl Roth (4621.1)
Salzsäure 37 %	Carl Roth (X942.1)
Schwefelsäure	Carl Roth (4623.1)
SOC-Medium	Invitrogen (15544034)
3,3',5,5'-Tetramethyl-benzidin (TMB)	Carl Roth (4107.1)
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (2367.1)
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich (M2128-5g)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth (A411.3)
Triton X-100	Sigma Aldrich (T8787-250ML)
Trizol	Invitrogen (15596026)
Trypsin-EDTA (10X)	Gibco (10779413)
Tween 20	Carl Roth (9127.2)
Universal Agarose	BioCat (AGA500-BCAT)
Wasserstoffperoxid 35 %	Carl Roth (9683.4)
Xylencyanol FF	Sigma Aldrich (X-4126)
Zitronensäure-1-hydrat	Merck (244)

Material

2.13 Allgemeine und Verbrauchsmaterialien

Nachfolgende Tabelle beinhaltet die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 2-13: Allgemeine und Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller (Bestellnummer)
<i>Centrifuge Tubes Polypropylene</i> (32 ml)	Beckman Coulter (355642)
Corning Costar TC-behandelte Multiwellplatten	Sigma Aldrich (CLS3513-50EA)
<i>Cover Slips</i>	Epredia (CB00120RA120MNZ0)
Deckgläschen	Nunc (171862)
Einweg-Spritze	Omnifix (4617207V)
Falcons	Greiner (188 271), Sarstedt (62.547.254)
T25/ T75 Flaschen	LabSolute (7 696 781), Sarstedt (83.3911.002)
gestopfte Spitzen (0- 1250 µl)	Nerbe Plus GmbH (06-622-5300, 06-662-5300, 06-695-5300)
Kryo-Gefäße <i>CryoPure</i>	Sarstedt (72.380.992)
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, epredia (MZ-0002)
Reaktionsgefäße	Sarstedt (72.690.001)
RNA ScreenTape	Agilent Technologies (5067-5576)
Sapphire PCR Consumables 96-well- PCR-Platte	Greiner (669285)
serologische Pipetten (5- 50 ml)	Greiner (606180, 607180, 760180, 768180)
<i>Tapestation Loading Tip</i>	Agilent Technologies (5067-5598)
8-well-Chamber Slides	Sarstedt (94.6170.802)
6, 12, 24, 96-well Platten	Sarstedt (83.3920.005, 83.3921.005, 83.3922.005, 83.3924.005)
10 cm/ 15 cm Zellkulturschalen	Sarstedt (83.3902, 83.3903)

Material

2.14 Verwendete Geräte

Die verwendeten Maschinen sind in Tabelle 2-14 aufgeführt.

Tabelle 2-14: Verwendete Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
<i>Chemi Doc Touch Imaging Systems</i>	Bio-Rad
Gelelektrophoreseapparatur (Agarosegele)	Carl Roth (N562.1, HP70.1)
Heizblock	Eppendorf (Thermomixer comfort)
Inkubator (<i>E. coli</i>)	New Brunswick Scientific (innova 44)
Inkubator (Zellkultur)	Panasonic Group (Sanyo CO ₂ Incubator)
LightCycler 480 II	Roche
diverse Mehrkanalpipetten	Biohit Proline Plus
Mikroskop BZ-X810	Keyence
Multipipette	Sartorius (Picus 10 ml)
NanoDrop 1000 UV	Thermo Scientific
Neubauer-Zählkammer	LaborOptik
Odyssey-Imaging-System	Li-COR Biosciences
PerfectBlue™ 'Semi-Dry'-Blotter	Sedec/ VWR
Photometer für Küvetten	Eppendorf (BioPhotometer plus)
Photometer für Multiwellplatten	Tecan (spark multimode-microplate-reader)
Pipetboy	Integra
PowerPac Basic	Biorad
Schüttler	New Brunswick Scientific (Innova44)
Schwenktisch	Edmund Bühler GmbH, Heidolph (UNIMAX 2010)
SDS-PAA-Gelapparatur	VWR (Model: Twin L)
Sterilwerkbank	Thermo Scientific (HeraSafe KS)
Stickstofftank	Tec-lab GmbH (Taylor-Wharton LABS-40K)
Tapestation 4150	Agilent Technologies
Thermocycler <i>MyCycler™</i>	Biorad
Ultrazentrifuge LE-80	Beckman
UV-Tisch	Vilber Lourmat
(Tisch-) Zentrifuge	Fisher Scientific (accuSpin Micro 17), VWR (himac CT15RE), VWR (Mega Star 1.6R), Thermo Scientific (Sorvall RC 6+)

Material

2.15 Verwendete Programme und WebTools

Für die Datenerhebung, Datenauswertung bzw. statistische Analysen wurden die nachfolgenden Programme bzw. WebTools verwendet.

Tabelle 2-15: Verwendete Programme und WebTools

Bezeichnung der Software	Verwendung
Bioinformatics & Evolutionary Genomics	Erstellung von VENN-Diagrammen
Chopchop	sgRNA-Design
CoralDRAW (Version 2019 oder neuer)	Erstellen von Abbildungen
Crustal W Version 1.83	Erstellung von Sequenz-Alignment
ESPrnt 3.0	Zufügen eines Farbkodes im Sequenz-Alignment
GraphPad Prism 9	Graphische Auswertung
Human Lentiviral CRISPR Library v1 Addgene	sgRNA-Design
Image Lab 6.1	Datenexport Western Blot-Abbildungen
Image Studio Lite Version 5.2	Western Blot-Aufnahmen
Metascape – A Gene Annotation & Analysis Resource	Erstellung von Genannotation, Signalweganalysen, Interaktionsanalysen
Primer3Plus	Primer-Design für RT-qPCR
RStudio (Version 2022.07.2+576 oder neuer)	Statistische Datenauswertung
SeqBuilder Pro17 (DNASTAR Lasergene 17)	Theoretische Klonierung, Primer-Design

Methoden

3. Methoden

3.1 Arbeiten mit humanen Zelllinien

Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Analyse verschiedener Zelllinien hinsichtlich der PARP-mRNA-Expression während der Infektion mit HCoV-229E und der damit verbundenen De-ADP-Ribosylierungsaktivität der viralen MacD. Für diese Analysen wurden humane Hepatom-Zellen (Huh-7-Zellen), humane embryonale Lungenfibroblasten (MRC-5-Zellen), eine stabile Monozytenzelllinie, die aus einem Patienten mit akuter Leukämie gewonnen wurde (THP-1-Zellen), und eine humane Lungenepithelzelllinie aus einem Adenokarzinom (A549-Zellen) kultiviert. Um eine effizientere Infektion mit HCoV-229E zu ermöglichen, wurden A549-Zellen verwendet, die CD13 und TMPRSS2 stabil exprimierten [Lie *et al.*, 2023]. Im weiteren Verlauf wurden mittels CRISPR-Cas9 PARP-*Knockouts* bzw. *Knockdowns* in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen generiert. Für die Produktion von Lentiviren wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK-293FT-Zellen) verwendet.

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die in Tabelle 2-8 aufgelisteten Zellen und permanenten Zelllinien wurden in den entsprechenden Kulturmedien mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) in Flüssigstickstoff gelagert. Für die Inkulturnahme von in Stickstoff gelagerten Zellen wurde das Einfriermedium nach zügigem Auftauen durch das jeweilige Vollmedium mit den entsprechenden Zusätzen ersetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung. THP-1-Zellen wurden in *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-) Medium mit 10 % [v/v] fetalem bovines Serum (FBS), Penicillin [100 U/ml] und Streptomycin [100 µg/ml] kultiviert. Als Medium für Huh-7-, MRC-5-, A549- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) mit 10 % [v/v] FBS und Penicillin [100 U/ml] und Streptomycin [100 µg/ml] verwendet. Dem Kulturmedium für A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde zusätzlich Geneticin [500 µg/ml] und Blasticidin S [10 µg/ml] beigefügt. HEK-293FT-Zellen wurden in DMEM mit 10 % [v/v] FBS und Geneticin [500 µg/ml] kultiviert. Vor der Lentivirus-Produktion wurden HEK-293FT-Zellen bei einer maximalen Konfluenz von 70 % maximal zehnmal passagiert.

Zum Vereinzeln und Aussäen der Zellen wurden adhärente Zellen mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Durch die Inkubation mit 0,05 % [v/v] Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wurden die Zellen gelöst. Im Anschluss wurden die Zellen in frischem Medium vereinzelt und in entsprechende Zellkulturgefäße überführt. Für eine präzise Zellaussaat erfolgte die Zellzahlbestimmung unter Verwendung einer Neubauer-Zählkammer.

Für die Kultivierung der THP-1-Zellen wurde die Zellsuspension 5 min bei 800 x g zentrifugiert und das Pellet anschließend in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 1,8 x 10⁵ bzw. 1,6 x 10⁵ Zellen pro ml eingestellt. Im Abstand von 2 bzw. 3 Tagen wurde die Zellzahl eingestellt.

Methoden

3.1.2 Differenzierung von THP-1-Zellen

Für die Differenzierung der THP-1-Monozyten in adhärenente makrophagenähnliche Zellen wurde Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA) verwendet. Die PMA-induzierte Differenzierung erfolgte in RPMI-Medium mit 50 nM PMA bei 37 °C (THP1(M0)-Zellen). Nach 24 h wurde das PMA-RPMI-Medium abgenommen, die Zellen einmal mit RPMI-Medium gewaschen und für weitere 24 h in RPMI-Medium kultiviert. Eine weitere Differenzierung zu M1- (THP1(M1)-Zellen) und M2- (THP1(M2)-Zellen) makrophagenähnlichen Zellen erfolgte im Anschluss [Genin *et al.*, 2015, Richter *et al.*, 2022]. Für THP1(M1)-Zellen wurden je 10 ng/ml rekombinantes humanes IFN- γ und Lipopolysaccharide (LPS) verwendet. Die Differenzierung in THP1(M2)-Zellen erfolgte durch die Zugabe von je 20 ng/ml Interleukin (IL)-4 und IL-13. Makrophagenähnliche Zellen wurden in 8-well-Chamber-view-Slides (1 x 10⁵ Zellen/ Chamber in 250 μ l), 12-well-Platten (3 x 10⁵ Zellen/well in 1 ml) oder 6-well-Platten (6 x 10⁵ Zellen/ well in 2 ml) differenziert. Nach weiteren 72 h Inkubation wurden die differenzierten THP-1-Zellen für die Versuche verwendet.

Nach abgeschlossener Differenzierung wurden die Zellen nach einer May-Grünwald-Färbung mikroskopisch analysiert. Für die Färbung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 3,4 % Paraformaldehyd und 0,1 % Triton-X-100 für 15 min auf Eis. Die Fixierlösung wurde entfernt und erneut mit PBS gewaschen. Nach vollständiger Trocknung wurden die Zellen für 5 min in May-Grünwald-Lösung inkubiert. Überschüssige Farblösung wurde durch die Inkubation in Wasser für 5 min entfernt, bevor 30 min in Giemsa-Farblösung (1:20 in Wasser verdünnt) inkubiert wurde. Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift in Wasser. Die vollständig getrockneten Proben wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt.

3.2 Arbeiten mit Lentiviren

Lentiviren wurden verwendet, um *clustered regulatory interspaced short palindromic repeats* (CRISPR-) Cas9 *Knockout* bzw. *Knockdown* Zelllinien zu generieren [Ran *et al.*, 2013, Joung *et al.*, 2017]. Dies erfolgte in Kooperation mit dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie (Gießen).

3.2.1 Design der sgRNAs

Die Auswahl der verwendeten *single guide* (sg) RNA-Sequenzen erfolgte unter Verwendung der CHOPCHOP-Webseite und der *Addgene Library*. Um eine möglichst hohe *Knockout*-Effizienz zu erlangen, wurden für jedes Gen drei sgRNAs anhand der ermittelten Effizienz bei niedrigem *Off-target*-Effekt ausgewählt. Da die anschließende Klonierung auf Restriktionsverdau und Ligation der sgRNA-Sequenz und dem Lenti-CRISPR v2 (LCV2) Vektor beruht, wurden die entsprechenden Restriktionsüberhänge an die Sequenzen angefügt. Die vollständigen Sequenzen sind in Tabelle 2-1 aufgelistet. Die DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma *Integrated DNA Technologies* (IDT) synthetisiert und in nukleasefreiem Wasser gelöst [100 μ M].

Methoden

3.2.2 Klonierung von sgRNAs in Lenti-CRISPR-v2-Vektor

Die Klonierung der sgRNAs erfolgte in *E. coli* TOP10F'.

Herstellung von kompetenten *E. coli* TOP10F'

Für die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* [Seidman & Struhl, 2001] wurde eine Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Für den Ansatz einer Hauptkultur wurde 1/200 der Übernachtskultur verwendet. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 180 rpm bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,375. Im Anschluss wurden die Bakterien für 15 min bei 2900 x g und 4 °C pelletiert. 20 ml kalte CaCl₂-Lösung wurden zum Resuspendieren des Pellets verwendet. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und die Suspension anschließend auf Eis für 30 min inkubiert. Zum Aliquotieren wurde das Pellet nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 730 x g und 4 °C in 5 ml kalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und in vorgekühlte Reaktionsgefäße abgefüllt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Verwendung einer Sterilwerkbank. Die Lagerung der kompetenten *E. coli* TOP10F' erfolgte bei -80 °C.

Herstellung phosphorylierter ds-Oligonukleotide

Für die Herstellung von ds-Oligonukleotiden wurden jeweils 1 µl fwd bzw. rev sgRNA ss-Oligonukleotid unter Verwendung von 5 µl 10x T4-PNK-Puffer A und 43 µl nukleasefreiem Wasser aneinandergelagert. Das verwendete Temperaturprofil bestand aus den folgenden Schritten:

Denaturierung:	4 min bei 95 °C
Annealing:	10 min bei 70 °C
Elongation:	15 min bei 37 °C
Abkühlen:	4 °C

Im zweiten Schritt erfolgte die Phosphorylierung in einem 10-µl-Ansatz mit 2 µl ds-Oligonukleotid-Lösung, 1 µl T4-PNK (10 U), 1 µl 10x T4-PNK-Puffer A, 1 µl 10 mM ATP und 5 µl nukleasefreiem Wasser. Die Modifikation erfolgte für 30 min bei 37 °C. Im Anschluss erfolgte die Inaktivierung der T4-PNK für 10 min bei 70 °C. Die phosphorylierten ds-Oligonukleotide wurden auf 4 °C abgekühlt und anschließend 1:8 in nukleasefreiem Wasser verdünnt.

Aufreinigung von Lenti-CRISPR-v2-Plasmid

Für die spätere Ligation wurden pro sgRNA 100 ng LCV2-Plasmid benötigt. In einem ersten Schritt wurde das LCV2-Plasmid hergestellt. Dafür wurden 100 µl einer kompetenten *E. coli*-Suspension mit 1 µl Plasmid für eine Transformation versetzt und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Nach Herabkühlen auf Eis für 2 min wurden 500 µl LB-Medium zugefügt. Für die Herstellung des LB-Mediums wurde 1 % [w/v] Trypton, 1 % [w/v] NaCl und 0,5 % [w/v] Hefeextrakt in ddH₂O gelöst und autoklaviert. Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C

Methoden

auf LB-Agarplatten. Auf einer Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) wurden 150 µl des Ansatzes ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Ligation von sgRNA und Lenti-CRISPR-v2-Plasmid

Das LCV2-Plasmid wurde mittels 10 U Esp3I (BsmBI) an dessen Restriktionsschnittstelle linearisiert. Unter Verwendung der 1 µl T4-DNA-Ligase [400 U/µl] und 1 µl 10 mM ATP wurden 2 µl verdünnte p-ds-Oligonukleotid-Lösung in einem Gesamtvolumen von 20 µl ligiert. Der Probenansatz wurde für 5 min auf 37 °C erwärmt und anschließend die Temperatur für 5 min auf 21 °C abgesenkt. Dieses Temperaturprofil wurde weitere fünfmal wiederholt.

3.2.3 Transformation von Lenti-CRISPR-v2-Plasmid mit sgRNA

Die Transformation wurde in *E. coli* TOP10F' durchgeführt. Zu den kompetenten Bakterienzellen wurden 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zugefügt. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 s bei 42 °C. Im Anschluss wurden die Proben 2 min auf Eis abgekühlt, bevor 200 µl vorgewärmtes superoptimales Medium mit katabolischem Repressor (SOC) zugefügt wurden. Die Hälfte des Ansatzes wurde auf LB-Agar mit Ampicillin [100 µg/ml] ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Am Folgetag wurde eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] für eine Plasmidisolierung übertragen und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert.

3.2.4 Aufreinigung und Validierung von Lenti-CRISPR-v2-Plasmid mit sgRNA

Die Validierung der klonierten sgRNAs erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung. Für eine Plasmid-Minipräparation wurden 3 ml einer Übernachtskultur für 3 min bei 21.000 x g zentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe und Vermengen von 150 µl Puffer 2 wurden die Zellen für maximal 5 min bei RT lysiert. Nach der Zugabe von 150 µl Puffer 3 wurde der Ansatz für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 21.000 x g um Zelldebris zu entfernen. Für die anschließende DNA-Fällung wurde der Überstand mit 0,8 Vol Isopropanol vermischt und für 30 min bei 21.000 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde einmal mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen. Nach Trocknung bei RT wurde das Pellet in 50 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. Das aufgereinigte LCV2-Plasmid wurde sequenziert, um sicherzustellen, dass die sgRNA erfolgreich integriert wurde. Die Sequenz des verwendeten Sequenzierprimers hU6-fwd ist Tabelle 2-1 zu entnehmen. Nach Sequenzbestätigung (Anhang Abbildung 7-1) wurden die mit PARP-sgRNA-Lenti-CRISPR-v2 transformierten *E.-coli*-Kulturen in 50 % Glycerol bei -80 °C eingelagert.

Die Herstellung größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des Plasmid-Midi-Kits der Firma Qiagen als Plasmid-Midipräparation. Mittels Transformation wurden die Helferplasmide pMD2.G und psPAX2 für die anschließende Aufreinigung kultiviert. Das Plasmid pMD2.G stellt das Hüllprotein VSV-G zur Verfügung, welches für die Produktion der Pseudo-Lentivirus-Partikel

Methoden

benötigt wird. Das zweite Helferplasmid psPAX2 besitzt das gag-pol-Element, das psi-Element, sowie zwei Gene, die für das Rev- bzw. das Tat-Protein kodieren. Für die Bildung der Lentiviren werden strukturelle und enzymatische Proteine mit Hilfe des gag-pol-Elements kodiert. Das Rev-Protein wird für den Export nicht gespleißter und teilweise gespleißter viraler RNAs vom Zellkern in das Zytoplasma benötigt. Nach der Transkription der RNA, wobei das Tat-Protein benötigt wird, dient das psi-Element der Verpackung der RNA in neue Lentiviruspartikel. Gemeinsam mit dem LCV2-Plasmid, welches die verschiedenen sgRNAs beinhaltet, stehen damit alle benötigten Komponenten zur Verfügung [Mátrai *et al.*, 2010, Sakuma *et al.*, 2012].

3.2.5 Lentivirus-Plasmid-Transfektion in HEK-293FT-Zellen

Nach der Klonierung der sgRNA-Oligos erfolgte die Transfektion von HEK-293FT-Zellen zur Lentivirus-Produktion. Die Kultivierungsbedingungen der Zellen sind Kapitel 3.1.1 zu entnehmen. 24 h vor der Transfektion wurden 2×10^6 Zellen pro T25-Flasche in einem Gesamtvolumen von 5 ml DMEM-Medium ausgesetzt.

Für jedes zu transduzierende Plasmid wurden die nachfolgenden Komponenten in separaten Reaktionsansätzen für je eine T25-Flasche vorbereitet.

LCV2-Target-Ansatz:

Opti-MEM	321 μ l
pMD2.G (lentivirales Helferplasmid)	2,2 μ g
psPAX2 (lentivirales Helferplasmid)	3,3 μ g
LCV2-Plasmid mit klonierter sgRNA	4,4 μ g

Als Kontrolle wurde ein LCV2-Target-Ansatz mit LCV2-Plasmid ohne sgRNA mitgeführt.

PLUS-Reagenz-Ansatz:

Opti-MEM	321 μ l
PLUS-Reagenz	42,4 μ l

Lipofectamin-2000-Ansatz:

Opti-MEM	642,9 μ l
Lipofectamin 2000	38,6 μ l

Anschließend wurde der LCV2-Target-Ansatz und der PLUS-Reagenz-Ansatz vermengt und invertiert. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde der Lipofectamin-2000-Ansatz zugefügt, invertiert und weitere 5 min inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss auf den HEK-293FT-Zellen tropfenweise verteilt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂. 4 h nach der Transduktion wurde das Medium erneuert. Nach 2 d wurde der Zellkulturüberstand bei 500 x g für 5 min abzentrifugiert. Zelldebris wurde durch Filtration mit einer verwendeten Porengröße von 0,45 μ m entfernt. Die Lagerung der Lentiviren erfolgte bei -80 °C.

Methoden

3.2.6 Zellviabilitätsassay für Lentiviren

Für die Transduktion der Zellen mit einer festgelegten MOI wurde der LCV2-Leervektor-Virusüberstand für eine Titration verwendet. Lentiviren sind nicht in der Lage, Plaques zu bilden, weshalb die Titration mittels MTT-Assay erfolgte. 24 h nach der Transduktion der Zellen mit unterschiedlichen LCV2-Volumina erfolgte die Aussaat in Triplikaten im 96-well-Format mit einer Zellzahl von 4×10^3 Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Den adhären Zellen wurde Puromycin [1 μ g/ml] für die Selektion zugefügt, bis die Zellen der nicht transduzierten Kontrolle nach 2 Tagen vollständig abgestorben waren. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und je 96 μ l Medium und 4 μ l MTS-Lösung zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37 °C. Intakte bzw. metabolisch aktive Zellen reduzieren währenddessen das gelbe, wasserlösliche Substrat zu blauem, wasserunlöslichen Formazan. Die Formazanmenge ist direkt proportional zu der Anzahl lebender Zellen und wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm detektiert. Nach Subtraktion des Hintergrundsignals wurde das Verhältnis zwischen nicht transduzierten und transduzierten Proben ermittelt und der Anteil lebender Zellen prozentual abhängig von der verwendeten LCV2-Menge angegeben.

3.2.7 CRISPR-Cas9-Knockout-Zelllinien-Transduktion

24 h vor der lentiviralen Transduktion wurden $0,5 \times 10^6$ A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen pro Vertiefung einer 6-well-Platte in einem Gesamtvolumen von 2 ml/well ausgesetzt. Vor der Transduktion wurden 8 μ g Polybrene pro well hinzugegeben. Polybrene ist ein Polymer mit positiver Ladung, welches die Effizienz der lentiviralen Infektion in Säugetierzellen verbessert, indem es die ladungsbasierte Abstoßung zwischen Virionen und Zelloberfläche abschwächt [Davis *et al.*, 2002]. Dafür erfolgte die Inkubation der Zellen mit Polybrene bei 37 °C für 10 min. Im Anschluss wurden 500 μ l Lentivirusüberstand pro well (basierend auf MTT-Assay) hinzugegeben und weitere 24 h kultiviert. Transduzierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, trypsinisiert und in einem Verhältnis von 1:3 in 10-cm-Platten ausgesät. Erfolgreich transduzierte Zellen besitzen eine Puromycin-Resistenz, welche Bestandteil des LCV2-Plasmids ist. Nach 24 h erfolgte die Selektion, indem der Überstand durch Vollmedium mit 2 μ g/ml Puromycin ersetzt wurde. Bei der 14-tägigen Puromycin-Selektion wurde im Abstand von 2-3 Tagen das Medium erneuert und dadurch abgestorbene Zellen entnommen.

3.2.8 Validierung der CRISPR-Cas9-Knockout-Zelllinien

Für den Transport und das weitere Arbeiten mit den erzeugten Zellen musste ein Herabstufen auf die biologische Sicherheitsstufe 1 erfolgen. Dafür wurde mittels RT-qPCR die Präsenz von Lentiviren analysiert.

Lentivirus-Kontroll-SYBR-Green-RT-qPCR

Pro Zelllinie wurden 200 μ l Zellkulturüberstand entnommen und mittels PCR auf lentivirale Rückstände geprüft. Der Überstand wurde bei 16.000 x g für 1 min abzentrifugiert, um Zelldebris zu

Methoden

entfernen. Die Isolation der RNA erfolgte mit Hilfe des *Mini-Viral-RNA-Extraktionskits* der Firma Zymogen unter Herstellerangaben. Eluiert wurde die RNA in 10 µl nukleasefreiem Wasser. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt und für die anschließende cDNA-Synthese auf 10 ng der mitgeführten Positivkontrolle (Lentivirusstock) normalisiert eingesetzt. Der Reaktionsansatz beinhaltete außerdem 1 µl Random-Hexamere, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 100 U Maxima Reverse Transkriptase mit dem zugehörigen Puffer. Das Gesamtvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 20 µl eingestellt. Die Proben wurden 10 min bei 25 °C und 1 h bei 42 °C inkubiert. Durch Erhitzen für 10 min bei 70 °C wurde die Reaktion abgestoppt und die Konzentration anschließend photometrisch ermittelt.

Der Nachweis von Lentiviren im Zellkulturüberstand erfolgte durch RT-qPCR. Das Prinzip basiert auf der Bestimmung der Nukleinsäuremenge nach jedem Amplifikationszyklus. Die Detektion erfolgt durch interkalierende Farbstoffe, wie beispielsweise *SYBR Green*, die an doppelsträngige DNA angelagert werden. Dem *Fast SYBR Green Master Mix* der Firma *Applied Biosystems* wurde je 0,25 µM fwd und rev Primer sowie 1 µl der jeweiligen cDNA zugefügt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 2-1 zu entnehmen. Das Reaktionsvolumen wurde mit nukleasefreiem Wasser auf 10 µl eingestellt.

Für die Analyse wurde das nachfolgende Programm am *Lightcycler 480* verwendet:

Initiale Denaturierung:	10 min bei 95 °C	
Denaturierung:	10 s bei 95 °C	} 40x
Annealing/ Elongation:	1 min bei 60 °C	
Schmelzkurve:	kontinuierliches Erhitzen auf 95 °C (0,11 °C/s)	

Der ausgegebene Messwert, der sogenannte *cycle threshold* (Ct-) Wert, entspricht grafisch betrachtet dem Schnittpunkt der Amplifikationskurve und der Schwellenwertlinie (*Threshold*). Das Herabstufen der Zelllinien auf die biologische Sicherheitsstufe 1 erfolgte anhand des Ct-Wertes abhängig von der mitgeführten Positivkontrolle.

Validierung der *Knockout-Zelllinien*

Im Anschluss erfolgte die Validierung von *A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Knockout-Zelllinien* mittels Sanger-Sequenzierung und Western-Blot-Analyse. Die Vorgehensweise für die Validierung auf Proteinebene ist Kapitel 3.5.1- 3.5.4 zu entnehmen. Genomische DNA wurde mittels *Genomic DNA from tissue* Kit der Firma Macherey-Nagel unter Herstellerangaben isoliert. Nach einer PCR-basierten Amplifikation der zu prüfenden Sequenzbereiche, erfolgte die Sequenzierung durch die Firma LGC.

Methoden

3.3 Arbeiten mit HCoV-229E

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Coronaviren sind HCoV-229E WT und verschiedene MacD-Mutanten. Letztere dienen dazu, ein besseres Verständnis für die Rolle der viralen Makrodomäne während der Infektion zu erhalten.

3.3.1 Virusvermehrung und Aufreinigung von Virus-Stocklösungen

Die HCoV-229E-MacD-Mutanten wurden mittels zielgerichteter Mutagenese und dem revers-genetischen System nach Thiel *et al.* erzeugt und von Kollegen zur Verfügung gestellt [Thiel *et al.*, 2001, Thiel & Siddell, 2005]. Die Herstellung von Virus-Stocklösungen für HCoV-229E WT und den MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_H1310A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357S, HCoV-229E_N1357Q) erfolgte auf 90 % konfluenten Huh-7-Zellen in 15-cm-Zellkulturplatten. Eine Stunde nach der Infektion wurde das Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FBS und 1 % Pen/Strep) erneuert und für weitere 2- 3 Tage bei 33 °C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend für 10 min bei 4.500 x g bei 4 °C zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen. In einem für die Ultrazentrifugation geeigneten Reaktionsgefäß wurde ein 30 %iges Saccharosekissen (Saccharose gelöst in TNE-Puffer) vorgelegt. Der Virusüberstand wurde auf dieses geschichtet und für mindestens 2 h bei 112.500 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Viruspartikel auf Eis in Medium aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Für die Bestimmung der Virustiter wurden Plaque-Assays bzw. TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose 50 %*)-Assays durchgeführt.

3.3.2 Virustiterbestimmung

Abhängig von der im Anschluss zu infizierenden Zelllinie wurde der Virustiter mittels TCID₅₀- oder Plaque-Assay ermittelt. Für Huh-7- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde der Virustiter mittels Plaque-Assay bestimmt. TCID₅₀-Assays wurden für fibroblasten- bzw. makrophagenähnliche Zellen verwendet.

TCID₅₀-Assay

Für die Virustiterbestimmung direkt nach der Virusaufreinigung kann ein TCID₅₀-Assay durchgeführt werden. Dafür wurden MRC-5-Zellen in einer 96-well-Platte ausgesät und bei 37 °C inkubiert. Bei ca. 90-95 %iger Konfluenz wurden die Zellen mit einer logarithmischen Virusverdünnungsreihe (10⁻²-10⁻⁹) mit je 100 µl pro well infiziert. Nach 7 Tagen bei 33 °C wurden die Zellen mittels Lichtmikroskopie auf zytopathische Effekte (CPE) analysiert. Der Virustiter wurde im Anschluss nach der Methode von Reed und Muench ermittelt [Reed & Muench, 1938] und in TCID₅₀/ml angegeben. Die berechneten Virustiter dienen der Infektion von MRC-5- und differenzierten THP-1-Zellen mit einer definierten MOI.

Methoden

Plaque-Assay

Eine weitere Methode, um Virustiter zu bestimmen, ist der Plaque-Assay. Huh-7-Zellen wurden in 24-well-Platten ausgesät und bei 37 °C kultiviert. Ein konfluenten Zellrasen wurde mit einer logarithmischen Verdünnungsreihe (10^{-1} - 10^{-9}) infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 33 °C wurde der Überstand verworfen und der Zellrasen mit 500 µl Avicell™- *Minimal Essential Medium* (MEM-) Gemisch pro well überschichtet. Nach 3 Tagen Inkubation bei 33 °C wurde der Overlay-Überstand entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Das Anfärben der Zellen erfolgte mit Kristallviolett. Die Virustiter wurden anhand der ausgezählten Plaques berechnet und als PFU/ml (engl. *plaque forming units*, infektiöse Einheiten pro ml) angegeben.

3.3.3 HCoV-229E-Infektion

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Infektion in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN bzw. einem PARP7-Inhibitor (RBN-2397, Atamparib). Dafür wurde ein 90 % konfluenten Zellrasen für 16 h mit 100 U IFN-β pro ml Kulturmedium oder 7,8 nM Atamparib für 24 h bei 37 °C behandelt. MRC-5-Zellen wurden zusätzlich mit 100 U IFN-α bzw. λ pro ml behandelt. Die Infektion erfolgte für 1 h mit HCoV-229E WT oder einer der MacD-Mutanten mit einer MOI von 0,1 (falls nicht anders angegeben) bei 33 °C. Im Anschluss erfolgte ein Mediumwechsel. Nach weiteren 7 bis 95 h wurde der Virustiter aus dem Überstand bestimmt und die Zellen nach einmaligem Waschen mit PBS für weitere Analysen verwendet.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten molekularbiologischen Methoden werden in den nachfolgenden Unterkapiteln erklärt.

3.4.1 DNA-Isolation

Für die Validierung der erzeugten *Knockout*-Zelllinien wurden Sequenzbereiche nahe der sgRNA-Erkennungsposition mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Dafür wurde genomische DNA aus 1×10^7 Zellen mittels *NucleoSpin Tissue genomic DNA from tissue Kit* der Firma Macherey-Nagel unter Herstellerangaben isoliert.

3.4.2 Sanger-Sequenzierung

Die detailliertere Überprüfung der Klonierung erfolgte mittels Sequenzierung. Für die Analyse bei der Firma LGC wurden je 100 ng/µl Plasmid bzw. 10-40 ng/µl PCR-Fragment in einem Gesamtansatz von 10 µl mit 5 µM Sequenzierprimer benötigt. Alle verwendeten Primer sind Tabelle 2-1 zu entnehmen. Die Auswertung der übermittelten Sequenzierungsergebnisse erfolgt mittels SeqMan Pro 17 Software (DNASTAR Lasergene 17).

Methoden

3.4.3 RNA-Isolation und DNase-RQI-Behandlung

Die RNA-Isolation für *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-Analysen erfolgte mit Hilfe des *RNeasy-Mini-Kits* der Firma Qiagen mit einem *On-column-DNase-Verdau* (*RNase-free DNase Set*) unter Herstellerangaben. Die Elution erfolgte in 30 µl nukleasefreiem Wasser. Die Konzentration wurde photometrisch ermittelt und die Qualität der isolierten RNA zusätzlich mittels Tapestation 4150 quantifiziert. In Kooperation mit Dr. Jochen Wilhelm und Prof. Dr. Marek Bartkuhn erfolgte die Genexpressionsanalyse der RNA-Proben.

Für die Genexpressionsanalysen mittels RT-qPCR wurde RNA mittels Trizol isoliert. Die Zellen wurden einmal mit PBS gespült und im Anschluss mit 1 ml Trizol pro 10 cm² überschichtet. Nach 5 min bei RT wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl Chloroform pro ml Trizol kräftig invertiert. Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugieren für 15 min bei 12.000 x g bei 4 °C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol pro ml Trizol vermengt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 12.000 x g bei 4 °C wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol pro ml Trizol gewaschen. Zum vollständigen Entfernen des Überstandes wurde erneut für 5 min bei 7.500 x g bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet bei RT getrocknet. Im Anschluss wurde die RNA in 20 µl nukleasefreiem H₂O gelöst. In einem 10 µl Gesamtreaktionsansatz, bestehend aus 8 µl gelöster RNA und je 1 µl DNase RQI und dem zugehörigem 10X Reaktionspuffer, wurde DNA für 30 min bei 37 °C degradiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 1 µl der zugehörigen Stopp-Lösung und anschließender Inkubation für 10 min bei 65 °C. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt.

3.4.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR diente der Amplifikation von Genabschnitten und der zielgerichteten Mutagenese. Für die Vervielfältigung eines Sequenzbereichs der DNA-Matrize wurden spezifische Primer in sense (fwd) und antisense (rev)-Richtung (Tabelle 2-1) verwendet.

Um die Fehlerrate bei Klonierungen zu minimieren, wurde die Polymerase *Phusion High Fidelity* entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Im *Thermocycler* wurde das nachfolgende Programm verwendet:

Initiale Denaturierung:	5 min bei 98 °C	} 35x
Denaturierung:	45 s bei 98 °C	
Annealing:	45 s bei 55 °C	
Elongation:	30 s/kb bei 72 °C	
Finale Elongation:	10 min bei 72 °C	

Methoden

DNA-Amplifikationen, die nicht der Klonierung dienten, wurden mit der *DreamTaq*-Polymerase nach Herstellerangaben durchgeführt. Das verwendete Programm im *Thermocycler* bestand aus den folgenden Schritten:

Initiale Denaturierung:	5 min bei 95 °C	} 35x
Denaturierung:	45 s bei 95 °C	
Annealing:	45 s bei 55 °C	
Elongation:	30 s/kb bei 72 °C	
Finale Elongation:	10 min bei 72 °C	

Alle generierten PCR-Amplifikate wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese vor ihrer weiteren Verwendung analysiert und ggf. aufgereinigt (NEB-DNA-Gel-*Extraction*-Kit) bzw. aufkonzentriert (innuPREP-*PCRpure*-Kit).

3.4.5 Quantitative PCR zur Bestimmung der mRNA-Expression

Zur Bestimmung der zellulären mRNA-Expression der 17 humanen PARPs, IRF3, IRF7, TBK1 sowie des als Kontrolle mitgeführten *Housekeeping*-Gens Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden zunächst die Primereffizienzen ermittelt. Das verwendete Temperaturprofil am *LightCycler* 480 wurde vorab mittels Gradienten-PCR optimiert.

Reverse Transkription:	10 min bei 55 °C (4,4 °C/s)	} 40x
Initiale Denaturierung:	1 min bei 98 °C (4,4 °C/s)	
Denaturierung:	10 s bei 98 °C (4,4 °C/s)	
Annealing:	10 s bei 61 °C (2,2 °C/s)	
Elongation:	30 s bei 72 °C (4,4 °C/s)	
Schmelzkurve:	kontinuierliches Erhitzen auf 95 °C (0,11 °C/s)	

Der Reaktionsansatz beinhaltete 1X Luna *Warm Start RT Enzyme*-Mix, 1X Luna *Universal One-Step Reaction*-Mix und je 0,25 µM fwd und rev Primer. Die Primersequenzen können Tabelle 2-1 entnommen werden.

Die aus MRC-5-Zellen isolierte RNA wurde für die Bestimmung der Primereffizienzen $\frac{1}{2^{(n+1)}}$ (mit n = 1, 2, ... 6) verdünnt und der Ct-Wert in Triplikaten in 96-well-Platten bestimmt. Die Verdünnung deckte dabei einen Bereich von 90-550 ng/µl ab. Zur Berechnung der spezifischen Primereffizienz diente die Abweichung (R^2+1) einer linearen Trendkurve. Die Primereffizienzen sind dem Anhang in Tabelle 7-1 zu entnehmen. Die Proben wurden zusätzlich mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Kapitel 3.4.6).

Für die Probenmessung wurden als Template 200 ng RNA, verdünnt in nukleasefreiem Wasser, eingesetzt. Unter Verwendung von RStudio wurden die in technischen Duplikaten ($n \geq 3$) bestimmten Ct-Werte mittels $\Delta\Delta Ct$ -Methode nach Pfaffl [Pfaffl, 2001] berechnet. Die nachfolgende

Methoden

Gleichung diente der Berechnung, wobei als Ct-Werte die Mittelwerte von mindestens drei Messungen sowie die in Tabelle 7-1 gelisteten Primereffizienzen verwendet wurden:

$$\Delta\Delta Ct = \frac{\frac{\text{Primereffizienz GAPDH}^{\overline{Ct-\text{Wert GAPDH Probe}}}}{\text{Primereffizienz PARP}^{\overline{Ct-\text{Wert PARP Probe}}}}}{\frac{\text{Primereffizienz GAPDH}^{\overline{Ct-\text{Wert GAPDH Kontrolle}}}}{\text{Primereffizienz PARP}^{\overline{Ct-\text{Wert PARP Kontrolle}}}}}$$

Ausreißer der voneinander unabhängig berechneten $\Delta\Delta Ct$ -Werte wurden mittels dem Interquartilsabstand (engl. *interquartile range*, IQR) identifiziert und dem Datensatz entnommen. Diese Methode basiert dabei auf der Berechnung des arithmetischen Mittelwerts (Median), sowie dem 25. und 75. Perzentil. Der Interquartilsabstand umfasst dabei die Differenz zwischen dem 3. Quartil (75. Perzentil) und dem 1. Quartil (25. Perzentil). Als Ausreißer wurden Messungen klassifiziert, die eine Abweichung um $>$ oder $<$ $1,5 \times \text{IQR}$ aufwiesen.

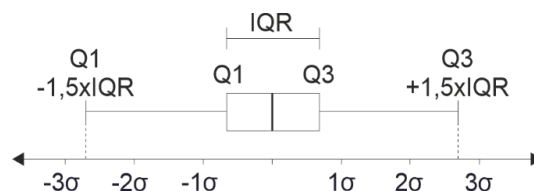


Abbildung 3-1: Identifizierung von Ausreißern anhand des Interquartilsabstandes (IQR)

Um signifikante Unterschiede der mRNA-Expression in Abhängigkeit verschiedener Faktoren, wie Infektion oder IFN- β -Behandlung, in mehreren Gruppen zu identifizieren, wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (engl. *Two-way ANOVA*) verwendet. Diese Analyse setzt eine Normalverteilung und Homogenität der Einzeldatensätze der Gene voraus [Wollschläger, 2012, Eichner, 2020]. Um dies gewährleisten zu können, wurde eine Log_{10} -Datentransformation durchgeführt. Mit Hilfe von RStudio erfolgte im Anschluss die zweifaktorielle ANOVA, welche um eine Post-hoc-Analyse mit *Tukey's-Honestly-Significant-Difference-Test* erweitert wurde, um Aussagen über Unterschiede zwischen HCoV-229E WT und MacD-Mutanten treffen zu können. Die graphische Darstellung erfolgte abschließend mit GrapPad Prism 9. Der in R verwendete Programmiercode für die Analyse der PARPs ist im Anhang beigefügt.

3.4.6 Gelelektrophorese

Die Auftrennung mittels Gelelektrophorese erfolgt je nach Probentyp mit einer unterschiedlichen Gelzusammensetzung.

Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der DNA-Produkte wurde ein Agarosegel im elektrischen Feld verwendet. 0,8 bzw. 1 % [w/v] Agarose wurde in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Die abgekühlte Flüssigkeit wurde mit Ethidiumbromid (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) versetzt. Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit 6X Ladebuffer vermengt. In TAE-Puffer erfolgte die Auftrennung bei konstant 120 V.

Methoden

Anschließend erfolgte die Detektion mittels UV-Strahlung. Als Größenstandard wurde eine 1 kb *DNA Ladder* bzw. *Low Range DNA Ladder* verwendet.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zusätzlich wurden Proben, die der Bestimmung der Primereffizienz dienen, auf einem SDS-PAA-Gel aufgetragen. Die Zusammensetzung kann Tabelle 3-1 entnommen werden.

Tabelle 3-1: Ansatz Polyacrylamid-Gel für RT-qPCR/ Gradienten-PCR-Proben

Komponenten	Volumen
H ₂ O	5,85 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung: Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Roth	6 ml
5X TBE	3 ml
10 % Ammoniumpersulfat (APS) in H ₂ O	100 µl
TEMED	10 µl

Die Proben wurden bei 20 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Das Gel wurde für die UV-basierte Auswertung 15 min mit Ethidiumbromid (0,8 ng/ml in H₂O) gefärbt.

3.5 Biochemische Methoden

Für den Nachweis auf Proteinebene wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Des Weiteren wurden infizierte Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse untersucht.

3.5.1 Gesamtproteinisolation aus Zellen

Die Probennahme für die Gesamtproteinisolation erfolgte aus 6-well-Platten bzw. 10-cm-Zellkulturschalen. Dafür wurde der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen, gelöst und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellen wurden für 3 min bei 500 x g zentrifugiert und trocken bei -80 °C eingefroren. Der Zellaufschluss erfolgte unter Verwendung von 80-150 µl Spezial-Lysepuffer (abhängig von der Zellpelletgröße). Nach vollständiger Resuspension der Zellen wurden die Proben 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Zelldebris für 15 min bei 11.650 x g bei 4 °C pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

3.5.2 Quantitative Proteinanalyse mittels Bradford-Assay

Die Ermittlung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte in Duplikaten im 96-well-Format. Je 100 µl einer 1:300 Proben-Verdünnung in PBS wurden pro well vorgelegt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (engl. *bovine serum albumin*, BSA) verwendet. Jeweils 100 µl der BSA-Standardreihe (0-35 µg/ml) wurden aufgetragen. Nach Zugabe von weiteren 100 µl 40 % Bradford-Reagenz erfolgte die photometrische Messung bei 595 nm. Pro Probe wurden je 30-100 µg Protein mit 4X *ROTI-Load*-Ladepuffer und Wasser auf ein Gesamtvolumen von 25-30 µl eingestellt.

Methoden

3.5.3 Semi-quantitative Proteinanalyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die isolierte Gesamtproteinmenge wurde auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch anhand des Molekulargewichtes aufgetrennt. Verwendet wurde ein SDS-haltiges, diskontinuierliches Tris-HCl/Tris-Glycin-Puffersystem nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Vor dem Auftragen der Proben auf das Polyacrylamidgel wurden diese 10 min bei 99 °C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte unter konstanter Stromstärke von 90 mA in Laemmli-Laufpuffer. *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* wurde als Größenstandard mitgeführt. Verwendet wurden 9 % Polyacrylamidgele (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Ansatz für 9 % SDS-PAA-Gele unterteilt in Trenn- und Sammelgel

Komponenten	Trenngel	Sammelgel
1 M Tris pH 8,8	10,35 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	760 µl
H ₂ O	4,9 ml	2,81 ml
Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung: Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), Roth	8,1 ml	840 µl
50 % Glycerol	2,45 ml	450 µl
2 % Natriumdodecylsulfat in H ₂ O	1,35 ml	250 µl
40 % Ammoniumpersulfat in H ₂ O	41 µl	15 µl
TEMED	27 µl	10 µl

3.5.4 Semi-dry Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Die zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden dabei auf eine in Methanol aktivierte PVDF-Transfermembran übertragen. Für den Transfer wurden vier Whatman™-3MMCHR-Papiere in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde wie folgt geschichtet: 2 Lagen Whatman™-3MMCHR-Papier, Transfermembran, Polyacrylamidgel, 2 Lagen Whatman™-3MMCHR-Papier. Nach dem Verschließen der vertikalen Blotapparatur erfolgte der Transfer nach dem *Semi-dry*-Verfahren innerhalb 120 min bei konstanten 0,8 mA/cm² Auflagefläche.

Der Proteinübertrag auf die Membran wurde durch Anfärben mit Ponceau S überprüft. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gewaschen und in Blockierlösung 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Bindung des Primär-Antikörpers über Nacht bei 4 °C. Die verwendeten Verdünnungen der Antikörper sind Tabelle 2-6 zu entnehmen. Am Folgetag wurde dreimal mit TBS-T gewaschen. Die mit HRP konjugierten Sekundär-Antikörper wurden 1:2.000 in Blockierlösung verdünnt und die Membran darin 1 h bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Waschschritten erfolgte die Inkubation mit

Methoden

Immobilon UltraPlus Western HRP Substrate. Im Anschluss erfolgte die Detektion und Auswertung mit Hilfe des *Chemi-Doc-Touch-Imaging-Systems* und der zugehörigen Software. Für die Detektion weiterer Proteine wurde die Membran mit Methanol reaktiviert, 1 h in Blockierlösung bei RT inkubiert und die beschriebenen Schritte mit den entsprechenden Antikörpern wiederholt.

3.5.5 Indirekte Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Mit der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung erfolgt der Nachweis virusspezifischer bzw. zellulärer Bestandteile. Die Zellen wurden dafür auf runden Deckgläschen in 24-well-Platten ausgesät. Im Anschluss erfolgte die Vorbehandlung bzw. Infektion. Nach Abschluss der Versuchszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % [w/v] Formaldehyd, 0,1 % [v/v] Triton X-100 über Nacht bei 4 °C überschichtet. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primär-Antikörper (Tabelle 2-6) inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Nach Zugabe der Sekundär-Antikörper und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurden die Zellen 2 h bei RT im Dunklen inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte jeweils in 3 % BSA in PBS. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mittels *ProLong Gold Antifade Mountant* fixiert. Für die Auswertung wurden die Zellen am Mikroskop BZ-X810 analysiert.

3.5.6 IFN- β -Bestimmung mittels ELISA

Die Detektion von in den Zellüberstand freigesetztem IFN- β erfolgte mit dem ELISA-DuoSet für humanes IFN- β entsprechend den Herstellerangaben. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wurde in DMSO [1 mg/ml] gelöst und 1:10 in Phosphat-Citrat-Puffer verdünnt. Dies wurde nach Zugabe von 1,7 μ l 35 % Wasserstoffperoxid als Substratlösung eingesetzt. Als Probenmaterial wurde Zellkulturüberstand 48 hpi verwendet.

3.5.7 Zellviabilitätstest für PARP7-Inhibitor

Für die Bestimmung einer nicht toxischen Konzentration des verwendeten PARP7-Inhibitors (RBN-2397) wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dafür wurden MRC-5-, A549^{CD13+/TMPRSS2+}- bzw. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in 96-well-Platten ausgesät. Bei einer Konfluenz des Zellrasens von 80-90 % erfolgte die Zugabe von RBN-2397 in Konzentrationen zwischen 0-1000 nM. Die Zellen wurden bei 37 °C für weitere 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und durch 100 μ l MTT-Lösung [5 mg/ml] ersetzt. Nach einer Inkubation für 4 h bei 37 °C wurde die Lösung abgenommen, und die Platten wurden getrocknet. Im Anschluss wurden 50 μ l Isopropanol pro well hinzugefügt und 15 min bei RT in Bewegung inkubiert. Die Detektion erfolgte durch die Bestimmung der Absorption bei 570 nm. Für die Kalkulation wurde die Referenzwellenlänge (690 nm) verwendet.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Verschiedene humane Zelltypen wurden hinsichtlich ihres Verhaltens während einer Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten insbesondere in Hinblick auf eine Regulation der Genexpression gegenübergestellt. Das Ziel dieser Untersuchung war es, ein geeignetes Zellsystem für die Charakterisierung der viralen Makrodomäne zu identifizieren. Im weiteren Verlauf wurde die Expression zellulärer PARPs, insbesondere PARP7 und eine Auswahl zugehöriger Signalwege im Zusammenhang mit der Immunantwort näher betrachtet.

4.1 Wachstumsanalyse von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung

Zu Beginn wurde die Wachstumskinetik von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in verschiedenen Zelltypen erfasst. Diese ist nachfolgend exemplarisch für MRC-5-, A549^{CD13+/TMPRSS2+}- und differenzierte THP-1-Zellen aufgeführt. Die Aminosäuresequenzen der MacD-Mutanten wurden mittels Sanger-Sequenzierung im Vorfeld überprüft und die (Punkt-) Mutationen bestätigt (Anhang Abbildung 7-2). Für einige dieser MacD-Mutanten konnte biochemisch eine verringerte De-ADP-Ribosylierungsaktivität [Hartmann, 2023], sowie eine verringerte Virusreplikation [Kuri *et al.*, 2011, Grunewald *et al.*, 2019] gezeigt werden.

4.1.1 Replikationseffizienz von HCoV-229E in MRC-5-Zellen

MRC-5-Zellen sind primäre Zellen, welche aus dem Lungengewebe eines männlichen Fötus stammen. Sie weisen eine fibroblastenähnliche Morphologie auf und ermöglichen eine effiziente Virusreplikation. Andere Studien konnten zeigen, dass durch die Zugabe von Typ I oder Typ II IFN MRC-5-Zellen in einen antiviralen Status versetzt werden und die Replikation von HCoV-229E verringert wird [Duncan *et al.*, 2023]. Darauf basierend wurden MRC-5-Zellen mit je 100 U IFN- α 2, β 1 bzw. λ 1 für 16 h inkubiert und im Anschluss mit HCoV-229E infiziert (MOI 0,1, 33 °C). Die Virustiter wurden 24 und 48 hpi analysiert (Abbildung 4-1).

Ergebnisse

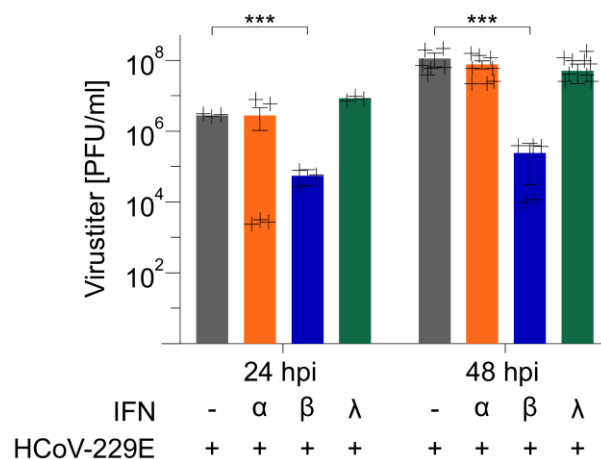


Abbildung 4-1: Virustiter von HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer vorherigen Behandlung mit IFN- α 2, β 1 oder λ 1 24 und 48 hpi. Die Virustiter [PFU/ml] wurden für unbehandelte (grau), IFN- α 2-behandelte (orange), IFN- β 1-behandelte (blau) oder IFN- λ 1-behandelte (grün) HCoV-229E-infizierte (MOI 0,1, 33 °C) MRC-5-Zellen abgebildet. Eine Vorbehandlung wurde für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Die Titration erfolgte mittels Plaque-Assay auf Huh-7-Zellen. Dargestellt sind mindestens drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert \pm SEM). Statistische Signifikanzen wurden mittels t-Test erfasst (***) ($p \leq 0,0005$).

In MRC-5-Zellen, welche mit IFN- β 1 vorbehandelt wurden, konnte eine signifikant verringerte Virusmenge 24 sowie 48 hpi nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit IFN- α 2 bzw. IFN- λ 1 konnte keine signifikante Änderung der Virustiter im Vergleich mit unbehandelten Zellen detektiert werden. Zwischen den beiden Messzeitpunkten konnte in allen Proben ein Anstieg des Virustiters von ein bis zwei log-Stufen mit fortschreitender Zeit nachgewiesen werden. Für nachfolgende Versuche wurde ausschließlich IFN- β 1 verwendet.

Zusätzlich erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung (Kapitel 3.5.5), um die Menge und die Verteilung infizierter Zellen zu analysieren. MRC-5-Zellen wurden in Abhängigkeit von IFN- β mit HCoV-229E infiziert, fixiert, permeabilisiert und nach einer Immunfluoreszenzfärbung mikroskopisch ausgewertet. In Abbildung 4-2 wurden Zellkerne mittels DAPI (blau) und Zellen, die das virale N-Protein aufwiesen, rot angefärbt.

Ergebnisse

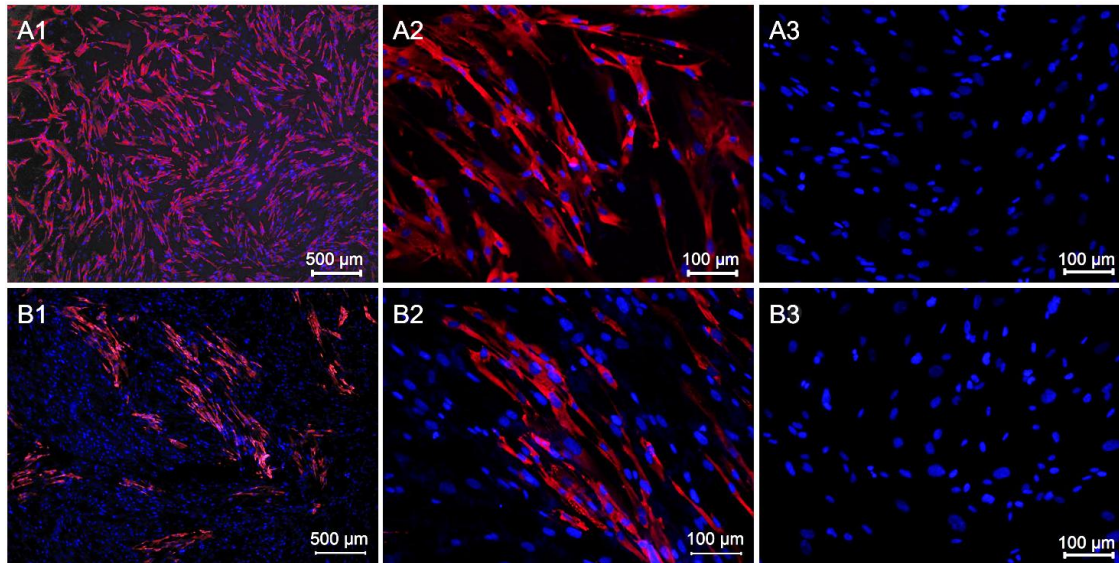


Abbildung 4-2: Immunfluoreszenzanalyse von MRC-5-Zellen, die mit HCoV-229E infiziert (A1, A2) bzw. für 16 h IFN- β -behandelt und infiziert (B1, B2) wurden. Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert, 48 hpi fixiert und permeabilisiert. Unbehandelte (A3) und IFN- β -behandelte (B3) nicht infizierte Kontrollen wurden analog mitgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Infizierte Zellen wurden mit einem HCoV-229E-N-Protein-spezifischen Primärantikörper nachgewiesen. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor 594 F(ab')₂ Fragment *goat- α -mouse- IgG* (rot) verwendet.

Die Immunfluoreszenzanalyse zeigte eine Infektion des MRC-5-Zellrasens mit HCoV-229E. Zellen, die mit IFN- β vorbehandelt wurden, wiesen ein verringertes und lokal begrenztes Signal für HCoV-229E-N-Protein-positive Zellen auf.

Um mögliche IFN- β -induzierte Unterschiede während der Infektion zu bestimmen, wurde die Replikation mittels Plaque-Assay (Kapitel 3.3.2) in einem Zeitraum von 8-96 hpi für HCoV-229E (Abbildung 4-3A) und ausgewählte MacD-Mutanten (HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357Q) analysiert (Anhang Abbildung 7-3). Dargestellt ist der Verlauf der Infektion mit HCoV-229E und die Virustiter von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten 48 hpi (Abbildung 4-3B).

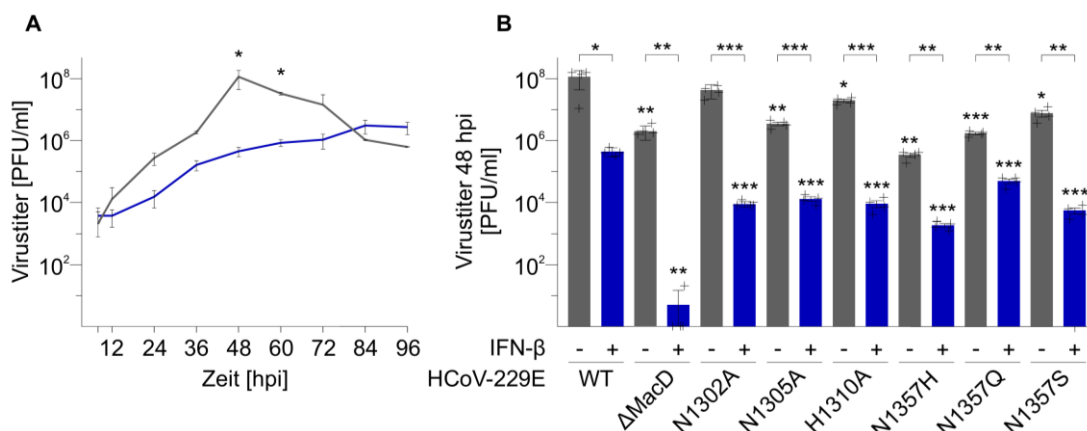


Abbildung 4-3: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in MRC-5-Zellen abhängig von einer Vorbehandlung mit IFN- β . MRC-5-Zellen wurden infiziert (grau) bzw. mit IFN- β vorbehandelt und infiziert (blau). Die Infektion erfolgte mit HCoV-229E (A) oder HCoV-229E-MacD-Mutanten (B) jeweils mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die

Ergebnisse

Virustiterbestimmung [PFU/ml] erfolgte mit Hilfe von Plaque-Assays in Huh-7-Zellen über einen Zeitraum von 8 bis 96 hpi (A) oder 48 hpi (B). Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei (A) bzw. vier (B) unabhängigen Versuchsansätzen (Mittelwert \pm SEM). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,0005$). Aufgetragen sind die Vergleiche unbehandelter und IFN- β -behandelter Proben nach Infektion mit dem jeweiligen Virus, sowie die Vergleiche der einzelnen HCoV-229E-MacD-Mutanten zu HCoV-229E.

Die Infektion mit HCoV-229E zeigte einen Anstieg des Virustiters zwischen 8 bis 48 hpi. Ohne IFN- β -Behandlung erfolgte anschließend ein Rückgang. Bei einer Behandlung vor der Infektion wurde eine Zunahme des Virustiters von 8 bis 96 hpi detektiert. Die Virusmenge war im Vergleich mit der unbehandelten Probe reduziert, wobei ein signifikanter Unterschied 48 und 60 hpi erkennbar war. Ein signifikant verringerter Virustiter nach IFN- β -Behandlung konnte in allen getesteten MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_H1310A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S) 48 hpi verzeichnet werden. Der Vergleich der MacD-Mutanten mit HCoV-229E zeigte signifikant verringerte Virustiter, mit Ausnahme von unbehandelten HCoV-229E_N1302A-infizierten Zellen.

4.1.2 Replikationseffizienz von HCoV-229E in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Für einen Vergleich verschiedener Zelltypen, die ursprünglich aus dem Lungengewebe stammen, wurden A549-Zellen verwendet. Andere Studien zeigen, dass die Replikation von HCoV-229E in A549-Zellen nicht effizient ist [Poppe *et al.*, 2017, Cheng *et al.*, 2021]. Daher wurde die Infektiosität von A549-Zellen und A549-Zellen, welche zusätzlich die Oberflächenmoleküle CD13 und TMPRSS2 aufweisen, verglichen. Mit HCoV-229E (MOI 0,1) infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wiesen 48 hpi Virustiter von bis zu 10^6 PFU/ml auf, während für A549-Zellen keine PFU mittels Plaque-Assay ermittelt werden konnten. Zusätzlich konnte mikroskopisch keine HCoV-229E-Infektion von A549-Zellen nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 7-4). Basierend auf diesen Daten wurden für anschließende Infektionsexperimente A549-Zellen verwendet, die CD13 und TMPRSS2 exprimieren und damit eine Infektion mit HCoV-229E ermöglichen [Lie *et al.*, 2023].

In Abbildung 4-4 sind die Virustiter in Abhängigkeit von IFN- β für die Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten dargestellt. In unbehandelten Proben wurden 48 hpi Virustiter von 10^6 PFU/ml detektiert. Eine zusätzliche IFN- β -Behandlung HCoV-229E-infizierter A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen resultierte in geringeren Virustitern von 10^4 PFU/ml.

Ergebnisse

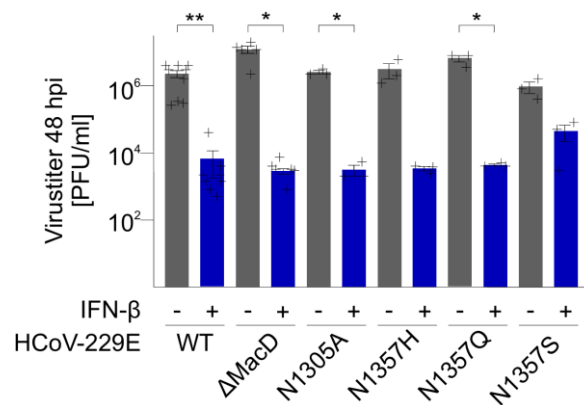


Abbildung 4-4: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen abhängig von einer vorherigen Behandlung mit IFN-β. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden infiziert (grau) bzw. mit IFN-β vorbehandelt und infiziert (blau). Eine Vorbehandlung wurde 16 h bei 37 °C durchgeführt. Die Infektion erfolgte mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten jeweils mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Der Virustiter [PFU/ml] wurde mit Hilfe von Plaque-Assays in Huh-7-Zellen 48 hpi ermittelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Versuchsansätzen (Mittelwert ± SEM). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bestimmt (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,005).

Für ausgewählte HCoV-229E-MacD-Mutanten wurden die Virustiter 48 hpi ermittelt. Stellvertretend wurde neben der Deletionsmutante (HCoV-229E_ΔMacD), eine MacD-Mutante des aktiven Zentrums (HCoV-229E_N1305A) und Mutanten an Position N1357 (HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) verwendet, deren Bedeutung zuvor in MHV untersucht wurde [Grunewald *et al.*, 2019]. Mit Ausnahme von HCoV-229E_N1357S zeigten alle Mutanten in unbehandelten und vorbehandelten Proben HCoV-229E-ähnliche Virustiter. Eine signifikante Verringerung in IFN-β-behandelten Proben konnte, wie auch in MRC-5-Zellen (Kapitel 4.1.1), für HCoV-229E-, HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1305A- und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen detektiert werden. Proben, welche mit HCoV-229E_N1357S infiziert und nicht vorbehandelt wurden, wiesen einen niedrigeren Virustiter verglichen mit allen anderen verwendeten Viren auf (Abbildung 4-4B). Die Zugabe von IFN-β vor der Infektion mit HCoV-229E_N1357H oder HCoV-229E_N1357S führte zu keiner signifikanten Verringerung der Virustiter.

Der Einfluss der IFN-β-Vorbehandlung auf die Ausbreitung der HCoV-229E-Infektion wurde parallel dazu mikroskopisch analysiert. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden mit IFN-β inkubiert und/oder mit einer MOI von 0,1 infiziert. 48 hpi wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und auf HCoV-229E-N-Protein-positive Zellen überprüft (Abbildung 4-5).

Ergebnisse

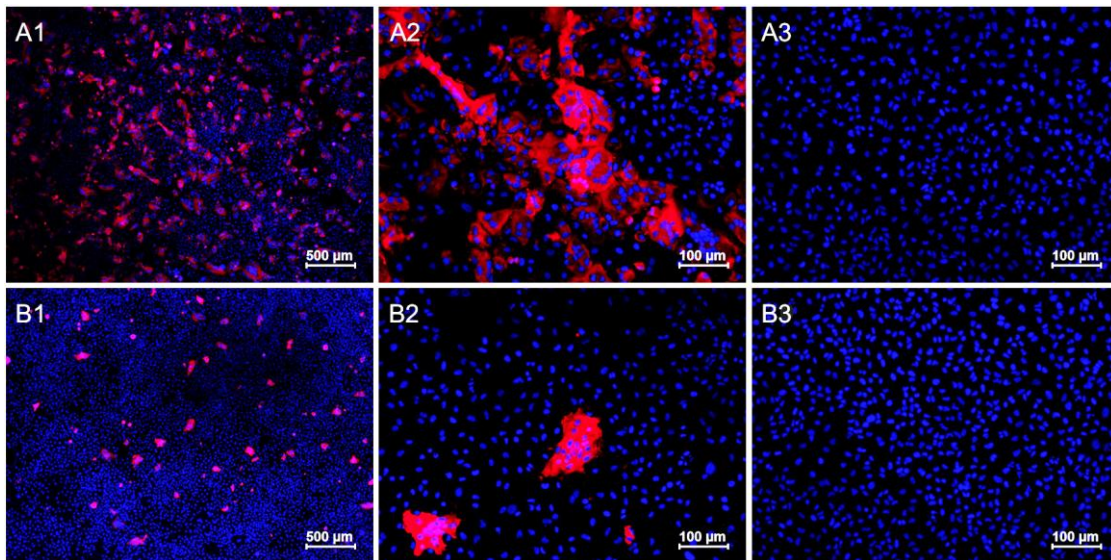


Abbildung 4-5: Immunfluoreszenzanalyse von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, die mit HCoV-229E infiziert (A1, A2) oder IFN- β -behandelt und infiziert (B1, B2) wurden. Die Vorbehandlung mit IFN- β erfolgte für 16 h bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 bei 33°C infiziert, nach 48 hpi fixiert und permeabilisiert. Unbehandelte (A3) und IFN- β -behandelte (B3) nicht infizierte Kontrollen wurden analog mitgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Infizierte Zellen wurden mit einem HCoV-229E-N-Protein-spezifischen Primärantikörper nachgewiesen. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor 594 F(ab')₂ Fragment *goat- α -mouse*- IgG (rot) verwendet.

In unbehandelten Zellen konnten über den gesamten Zellrasen verteilt gegen das virale N-Protein angefärbte Zellen (Abbildung 4-5A1, Abbildung 4-5A2) detektiert werden. Analog zu den Beobachtungen in MRC-5-Zellen konnten nach einer Vorbehandlung mit IFN- β (Abbildung 4-5B1, Abbildung 4-5B2) wenige vereinzelte positiv gegen das N-Protein angefärbte Zellen allerdings mit mehreren Zellkernen erfasst werden.

4.1.3 Replikationseffizienz von HCoV-229E in makrophagenähnlichen Zellen

Makrophagen spielen eine Rolle in der adaptiven Immunantwort und werden durch die Detektion von Pathogenen aktiviert. Anschließend tragen sie unter anderem durch die Freisetzung von Zytokinen oder Phagozytose zur Immunantwort bei. Die humane Monozyten-Zelllinie THP-1 zeichnet sich durch die Fähigkeit der Differenzierung zu makrophagenähnlichen Zellen aus. Die Differenzierung der THP-1-Zellen kann durch verschiedene Substanzen ausgelöst werden. Für die vorliegende Arbeit wurde die Differenzierung durch die Zugabe von 50 nM PMA für 24 h bei 37 °C induziert (THP1(M0)-Zellen). Die finale Polarisierung zu THP1(M1)-Zellen und THP1(M2)-Zellen erfolgte durch die anschließende Zugabe von je 10 ng/ml IFN- γ und LPS bzw. je 20 ng/ml IL-4 und IL-13. Die detaillierte Vorgehensweise kann Kapitel 3.1.2 entnommen werden. Der Phänotyp der drei Zelltypen wurde mikroskopisch in Abbildung 4-6 mittels Phasenkontrast und Färbung nach Pappenheim (Kapitel 3.1.2) dargestellt. Zusätzlich sind in Abbildung 4-6C0 bis Abbildung 4-6C2 HCoV-229E-infizierte differenzierte Zellen abgebildet, welche mit einem HCoV-229E-N-Protein-spezifischem Antikörper angefärbt wurden.

Ergebnisse

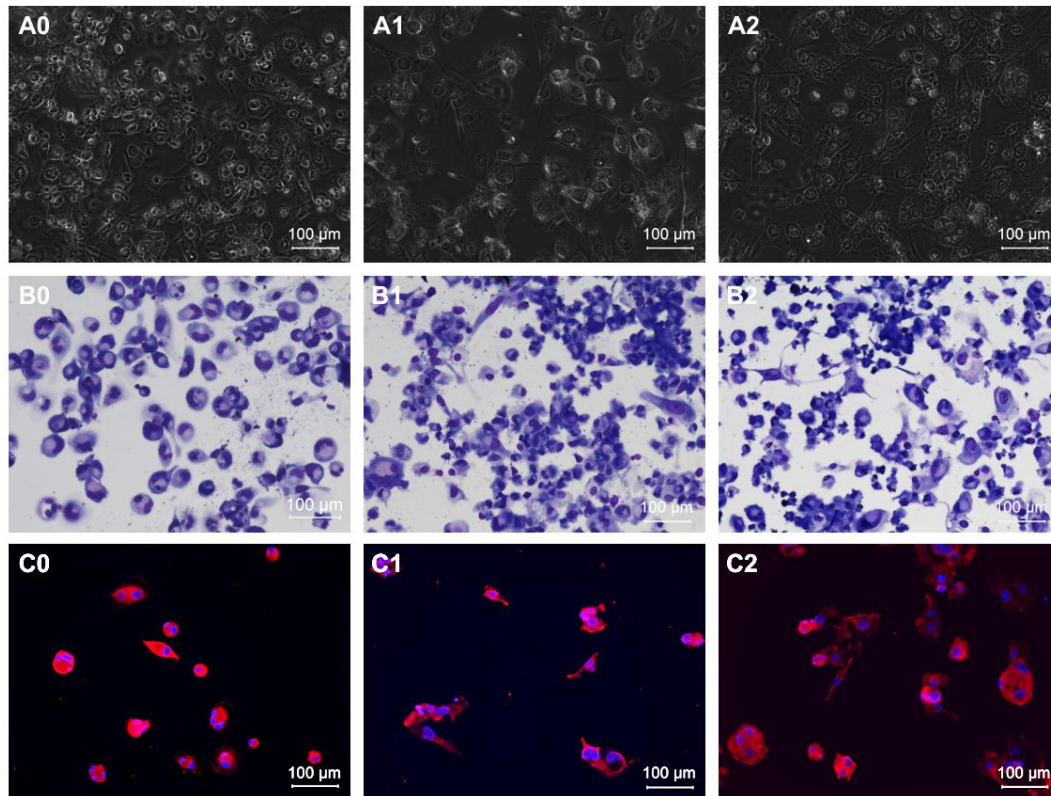


Abbildung 4-6: Mikroskopische Aufnahmen differenzierter makrophagenähnlicher Zellen im Phasenkontrast (A), nach Pappenheim-Färbung (B) und 48 hpi mit HCoV-229E (C). Monozytäre Suspensionszellen wurden in adhärenente THP1(M0)-Zellen (A0, B0, C0), THP1(M1)-Zellen (A1, B1, C1) und THP1(M2)-Zellen (A2, B2, C2) differenziert. Die differenzierten Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert (C), nach 48 hpi fixiert und permeabilisiert. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Infizierte Zellen wurden mit einem HCoV-229E-N-Protein-spezifischen Primärantikörper nachgewiesen. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor 594 F(ab')₂ Fragment *goat- α -mouse*- IgG (rot) verwendet.

Die THP-1-Suspensionszellen mit kugelförmiger Struktur wurden durch die Inkubation mit PMA zu adhärenenten makrophagenähnlichen Zellen differenziert. Diese erschienen rund bis oval mit vereinzelt Ausläufern (Abbildung 4-6A0, Abbildung 4-6B0). Nach Zugabe von IFN- γ und LPS wiesen THP1(M1)-Zellen (Abbildung 4-6A1, Abbildung 4-6B1) eine gestreckte Zellform auf. Längere Ausläufer waren in THP1(M2)-Zellen (Abbildung 4-6A2, Abbildung 4-6B2) zu erkennen. Nach der Infektion mit HCoV-229E konnten N-Protein-positive Zellen mikroskopisch detektiert werden (Abbildung 4-6C0 bis Abbildung 4-6C2). Die zugehörigen Virustiter wurden mittels Plaque-Assay in Huh-7-Zellen (Kapitel 3.3.2) ermittelt. Zusätzlich wurde die Replikation von HCoV-229E-MacD-Mutanten 48 hpi erfasst und in Abbildung 4-7 dargestellt.

Ergebnisse

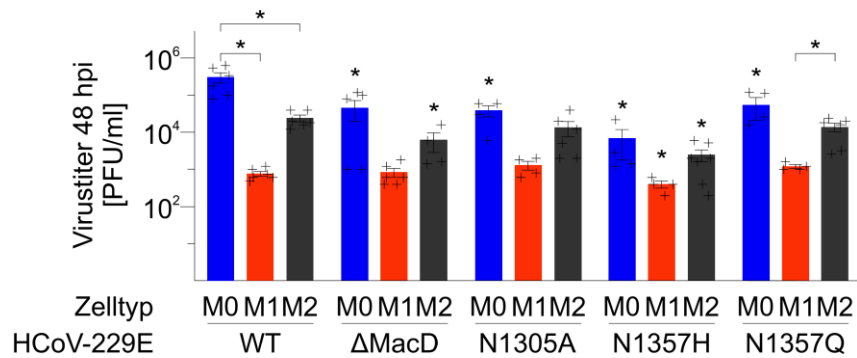


Abbildung 4-7: Virustiter von mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten infizierten differenzierten makrophagenähnlichen Zellen. Die Virustiter [PFU/ml] wurden 48 hpi mittels Plaque-Assay in Huh-7-Zellen bestimmt. Die Infektion von THP1(M0)-Zellen (blau), THP1(M1)-Zellen (rot) und THP1(M2)-Zellen (schwarz) erfolgte mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H oder HCoV-229E_N1357Q. Dargestellt sind vier unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM). Statistische Signifikanzen wurden mittels t-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$). Der Vergleich erfolgte innerhalb des jeweiligen Zellsubtyps nach Infektion mit HCoV-229E und der MacD-Mutante bzw. zwischen den unterschiedlichen Zellsubtypen bei Infektion mit dem gleichen Virus.

Die Virustiter waren in HCoV-229E-infizierten THP1(M1)- und THP1(M2)-Zellen signifikant geringer als in THP1(M0)-Zellen. In THP1(M1)-Zellen wurden die geringsten Virustiter detektiert. Dieses Verhältnis konnte auch in mit HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten Zellen beobachtet werden. Die Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357Q zeigten den höchsten Virustiter in THP1(M0)-Zellen und den niedrigsten Virustiter in THP1(M1)-Zellen. Auffällig ist, dass die Virustiter von THP1(M0)-Zellen bei allen MacD-Mutanten im Vergleich mit HCoV-229E signifikant verringert sind, während die Virustiter in THP1(M1)-Zellen weniger als eine log-Stufe voneinander abweichen. In THP1(M2)-Zellen wurden reduzierte Virustiter im Vergleich mit HCoV-229E, insbesondere für HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1357H nachgewiesen.

4.2 Transkriptomanalyse von humanen PARPs

Da die Rolle der viralen MacD im Zusammenhang mit der Immunantwort nicht eindeutig geklärt ist, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Dabei wurde zunächst die Regulation der 17 humanen PARP-Gene, als Gegenspieler der De-ADP-Ribosylierung, analysiert. MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden mit IFN-β für 16 h bei 37 °C vor der Infektion mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten behandelt. Makrophagenähnliche Zellen wurden mit HCoV-229E infiziert. Die Infektion erfolgte, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Das Virusinokulum wurde 1 hpi durch frisches Vollmedium ersetzt. Nach weiteren 47 h erfolgte die RNA-Isolation mittels Trizol für RT-qPCR-Analysen bzw. unter Verwendung des RNeasy Kits der Firma Qiagen für die Next-Generation-Sequenzierung. Anhand der Transkriptomanalyse sollte ein Überblick über die Genregulation durch die IFN-β-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion erlangt werden.

Ergebnisse

4.2.1 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung in MRC-5-Zellen

Ein bereits vorhandener Microarray-Datensatz, welcher in Kooperation mit Dr. Jochen Wilhelm erzeugt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem ersten Schritt mit dem Fokus auf der mRNA-Expression der 17 humanen PARPs neu analysiert. Die Ergebnisse der Analyse sind dem Anhang zu entnehmen (Anhang Abbildung 7-5, Abbildung 7-6, Abbildung 7-7). In diesem Kapitel soll der erzeugte NGS-Datensatz näher betrachtet werden, welcher in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Marek Bartkuhn analysiert wurde. Im Anhang ist der verwendete R Code für die Analyse hinterlegt. Ein Überblick der Genregulation in MRC-5-Zellen ist in Abbildung 4-8 dargestellt.

Die in Abbildung 4-8A als Heatmap dargestellten 2697 Gene wurden in mindestens einer der Proben differentiell exprimiert ($-\log_{10}(\text{p-Wert}) \geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ bzw. ≤ -2). Eindeutig zu erkennen ist, dass die Anzahl signifikant regulierter Gene in MRC-5-Zellen, sowohl abhängig von der Virusmenge (MOI 0,1 oder 3,0) als auch von einer IFN- β -Vorbehandlung variiert. Die größte Übereinstimmung konnte nach HCoV-229E-Infektion unbehandelter MRC-5-Zellen für die beiden verwendeten MOIs beobachtet werden. Ein ähnliches Expressionsprofil wurde ebenfalls für Proben nach der Infektion mit HCoV-229E_N1305A bei einer MOI von 3,0 erfasst. Bei einer Infektion mit höherer MOI wurden zusätzliche Gene differentiell reguliert. In HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen wurden rund 1000 weitere Gene nachgewiesen. Ein ähnliches Verhältnis konnte auch in HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben beobachtet werden, obwohl die Gesamtanzahl geringer als in HCoV-229E-infizierten Zellen war. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- β führte zu deutlich weniger differentiell regulierten Genen. Insbesondere bei einer Infektion mit HCoV-229E_N1305A (MOI 0,1) wurden kaum Gene differentiell exprimiert. Diese Unterschiede für vermehrt exprimierte Gene wurden in Abbildung 4-8B und Abbildung 4-8C hervorgehoben.

Die Übereinstimmung aller vermehrt exprimierten Gene wurde unabhängig (Abbildung 4-8B) bzw. abhängig (Abbildung 4-8C) von einer IFN- β -Behandlung als Venn-Diagramme dargestellt. Auffällig ist, dass 386 Gene in allen analysierten Proben unabhängig von dem verwendeten Virus bzw. der MOI detektiert wurden. Eine veränderte Genexpression wurde in IFN- β -behandelten Proben beobachtet. Dabei konnten sieben probenübergreifend vermehrt exprimierte Gene detektiert werden. Dazu zählen C-X-C Motiv-Chemokin-Liganden (CXCL2, CXCL3, CXCL8), IL6, DDIT3 (engl. *DNA-Damage-Inducible Transcript 3*), HSPA6 (engl. *Heat Shock Protein Family Member 6*) und HERPUD1 (engl. *Homocysteine Inducible ER Protein with Ubiquitin Like Domain 1*). Während ausschließlich diese Gene in behandelten HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen bei einer MOI von 0,1 detektiert wurden, konnten bei einer MOI von 3,0 mehr als 400 weitere Gene nachgewiesen werden.

Ergebnisse

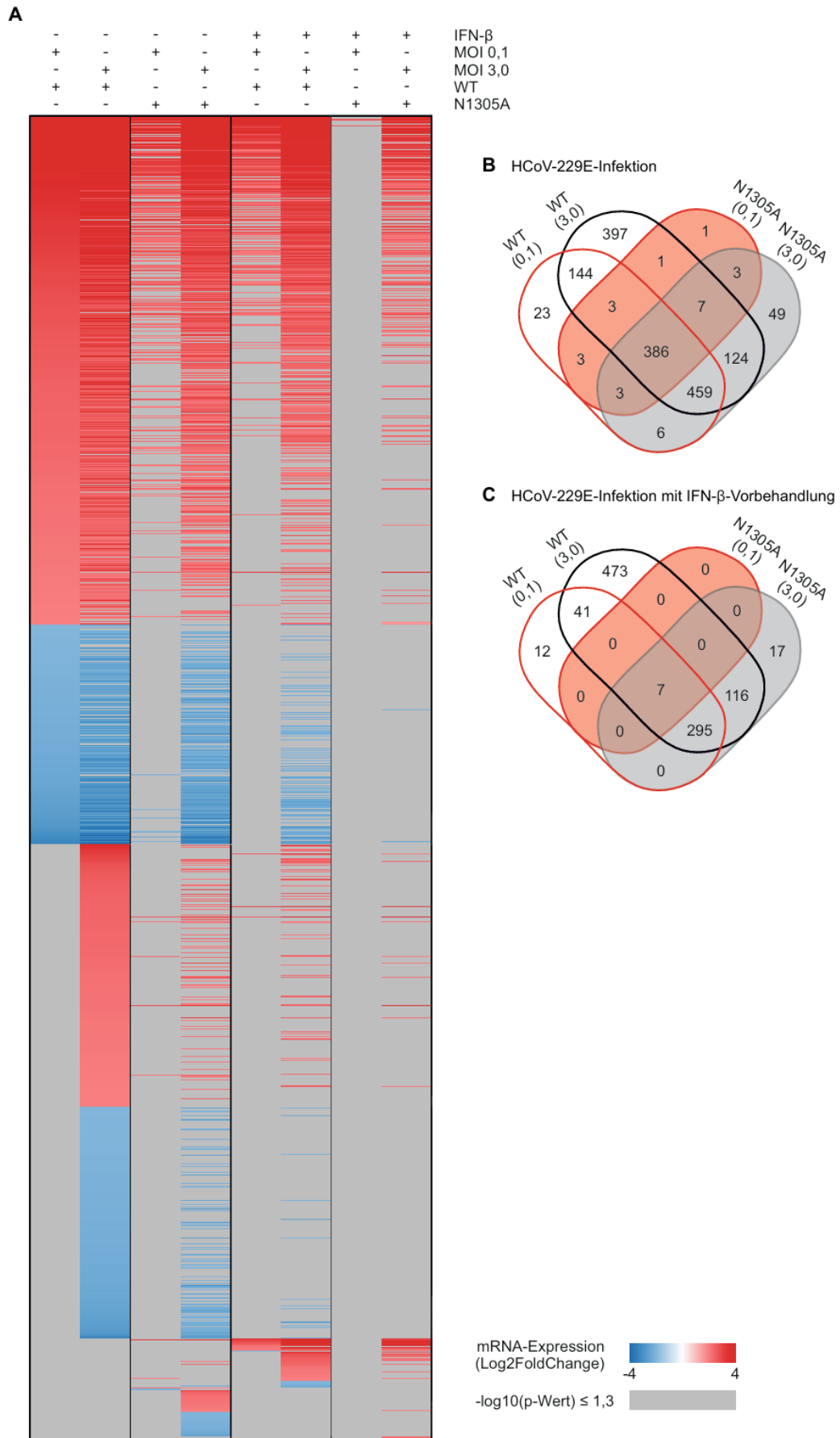


Abbildung 4-8: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen. Die Zellen wurden 16 h mit IFN- β vorbehandelt

Ergebnisse

und/oder anschließend mit HCoV-229E (WT) oder HCoV-229E_N1305A mit einer MOI von 0,1 bzw. 3,0 bei 33 °C infiziert. Mittels Next-Generation-Sequenzierung wurde die Genexpression 48 hpi analysiert. Als Heatmap (A) dargestellt wurden regulierte Gene ($-\log_{10}(\text{p-Wert}) \geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ bzw. ≤ -2) in unbehandelten oder IFN- β -vorbehandelten infizierten Zellen. Nicht signifikant regulierte Gene sind grau gekennzeichnet. Jeweils ein Venn-Diagramm wurde für die Übereinstimmung vermehrt exprimierter Gene ($-\log_{10}(\text{p-Wert}) \geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$) in den unbehandelten (B) oder IFN- β -behandelten (C) infizierten Proben abgebildet.

Infektion mit HCoV-229E

Die detailliertere Analyse umfasste die 17 humanen PARPs. Die Ergebnisse sind als Vulkanplots dargestellt. Die ausgewählten Gene wurden bei signifikant differentieller Expression farblich hervorgehoben. Eine verringerte Expression wurde in Blau dargestellt, während vermehrt exprimierte PARPs rot gekennzeichnet wurden. Die Vergleiche erfolgten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β gegenüber der nicht infizierten Kontrolle jeweils paarweise. Alle Vulkanplots enthalten differentiell regulierte Gene unabhängig von den ermittelten $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ -Werten.

Die Auswertung des NGS-Datensatzes zeigte eine vermehrte Expression durch die Infektion mit HCoV-229E bei einer MOI von 0,1 von 2554 signifikant hochregulierten Genen. Zu diesen zählen beispielsweise PARP7, PARP5a, PARP13S und PARP8. Parallel dazu wurden 2093 signifikant verringert exprimierte Gene, wie PARP3 in infizierten MRC-5-Zellen, detektiert (Abbildung 4-9A). Durch die Vorbehandlung mit IFN- β ohne anschließende Infektion wurden neun mRNAs verringert und 25 mRNAs vermehrt detektiert. Allerdings konnte keine signifikante Regulation für PARP-mRNAs beobachtet werden (Abbildung 4-9B).

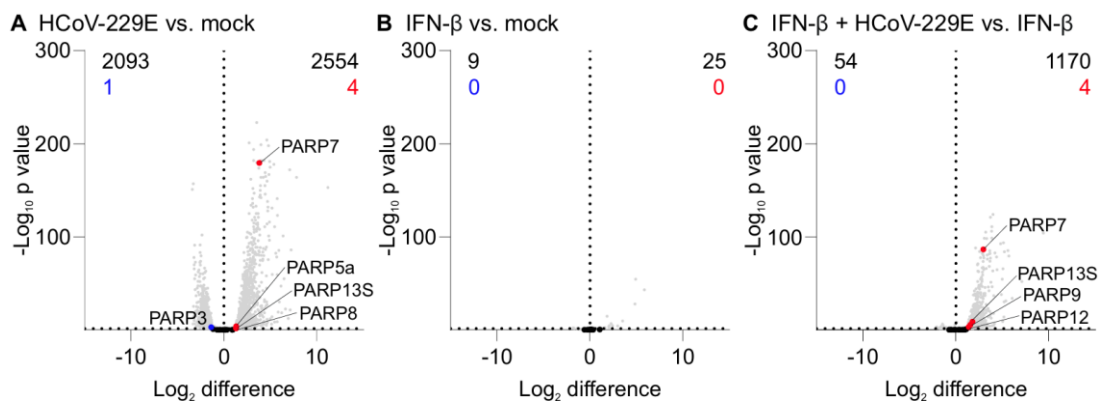


Abbildung 4-9: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E (MOI 0,1). Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Die Infektion vorbehandelter MRC-5-Zellen zeigte 1170 signifikant hochregulierte bzw. 54 signifikant herunterregulierte Gene. Eine gesteigerte Expression wurde dabei für PARP7, PARP13S, PARP9

Ergebnisse

und PARP12 erfasst (Abbildung 4-9C). Die mRNA-Expression aller 17 humanen PARPs wurde analog mittels RT-qPCR (Kapitel 3.4.5) ermittelt und in Abbildung 4-10 dargestellt. Die Datenanalyse mit R umfasste die Berechnung der Expression anhand der ermittelten Ct-Werte, die Identifizierung von Ausreißern mittels IQR und die Berechnung statistischer Signifikanzen mittels zweifaktorieller ANOVA und Tukey post-hoc Test nach logarithmischer Datentransformation. Ein Auszug aus dem dafür verwendeten Code ist im Anhang beigefügt. Der Einfluss der Datentransformation ist im Anhang Abbildung 7-8 aufgezeigt.

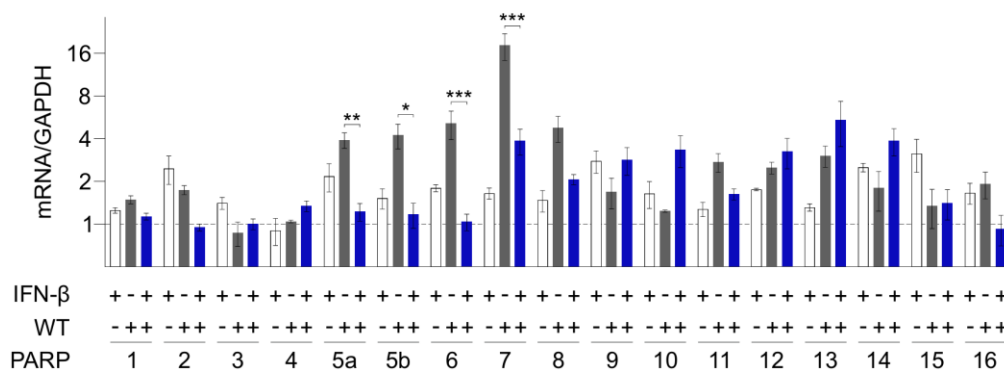


Abbildung 4-10: Analyse der Genexpression mittels RT-qPCR in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E. Die Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. 48 hpi wurde die RNA isoliert und analysiert. Dargestellt sind nach Identifizierung von Ausreißern mittels Interquartilrange mindestens drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM). Mittels Tukey post-hoc Test wurden statistisch signifikante Unterschiede ermittelt (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,005, ***p ≤ 0,0005). Unterschiede in Bezug auf unbehandelte nicht infizierte (mock) Proben wurden nicht dargestellt. Die Expression der PARPs in den Kontrollproben (mock) ist durch eine Gerade gekennzeichnet.

Auffällig ist, dass die Expression einiger PARPs in IFN-β-vorbehandelten oder HCoV-229E-infizierten Proben erhöht ist. Anhand dieser Analyse können PARPs in zwei Gruppen klassifiziert werden – IFN-β-induzierte (PARP2, PARP9, PARP10, PARP14, PARP15) bzw. infektionsspezifisch differentiell exprimierte PARPs (PARP5a, PARP5b, PARP6, PARP7, PARP8, PARP11, PARP12, PARP13, PARP16). Für PARP1, PARP3 und PARP4 konnten keine aussagekräftigen Regulationen durch IFN-β oder HCoV-229E detektiert werden. Ein signifikanter Anstieg für den Vergleich von infizierten und IFN-β-behandelten infizierten MRC-5-Zellen wurde für PARP5a, PARP5b, PARP6 und PARP7 detektiert. Dabei wurde PARP7 in infizierten MRC-5-Zellen am stärksten differentiell exprimiert.

Zusätzlich erfolgte die NGS-Analyse von MRC-5-Zellen, die mit einer MOI von 3,0 infiziert wurden. Ziel war es, die Auswirkungen einer Infektion mit einer niedrigen bzw. höheren Virusmenge auf die Genexpression zu vergleichen. Die Ergebnisse für unbehandelte und IFN-β-vorbehandelte HCoV-229E-infizierte MRC-5-Zellen sind Abbildung 4-11 zu entnehmen.

Ergebnisse

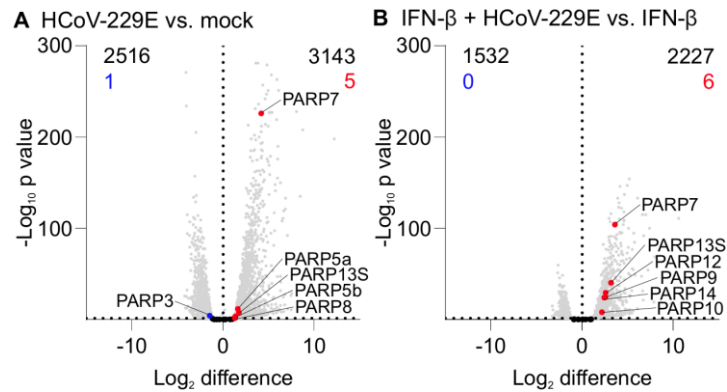


Abbildung 4-11: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion (MOI 3,0). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte bei 37 °C für 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 3,0 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der HCoV-229E-Infektion im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Proben (A) und der Vergleich mit IFN-β-behandelten Zellen mit anschließender Infektion zu vorbehandelten nicht infizierten Zellen (B) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In infizierten Zellen wurden 3143 Gene signifikant vermehrt exprimiert. Dazu zählen PARP7, PARP5a, PARP13S, PARP5b und PARP8. Parallel dazu wurden PARP3 und weitere 2516 Gene signifikant verringert detektiert. Eine Inkubation der Zellen mit IFN-β mit anschließender Infektion führte zu 2227 vermehrt exprimierten Genen. Eine gesteigerte Genexpression wurde für PARP7, PARP13S, PARP12, PARP9, PARP14 und PARP10 beobachtet. Eine Verringerung der Expression konnte für 1532 Gene detektiert werden.

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Der Hauptfokus in diesem Unterkapitel soll auf einer MacD-Mutante (HCoV-229E_N1305A) liegen. Die Position N1305, welche Teil der aktiven Seite der Appr-1^α-Phosphatase ist, spielt eine Rolle bei der Katalyse und Substratbindung [Putics *et al.*, 2005]. Außerdem weist die Substitution zu Alanin eine signifikant verringerte De-ADP-Ribosylierungsaktivität auf [Hartmann, 2023]. Die Auswirkung auf die Genexpression während einer Infektion wurden mit nicht infizierten Zellen verglichen. Die zugehörigen Analysen sind Abbildung 4-12 zu entnehmen. Der Vergleich von HCoV-229E_N1305A mit HCoV-229E-infizierten Zellen ist im Anhang Abbildung 7-9 hinterlegt.

Ergebnisse

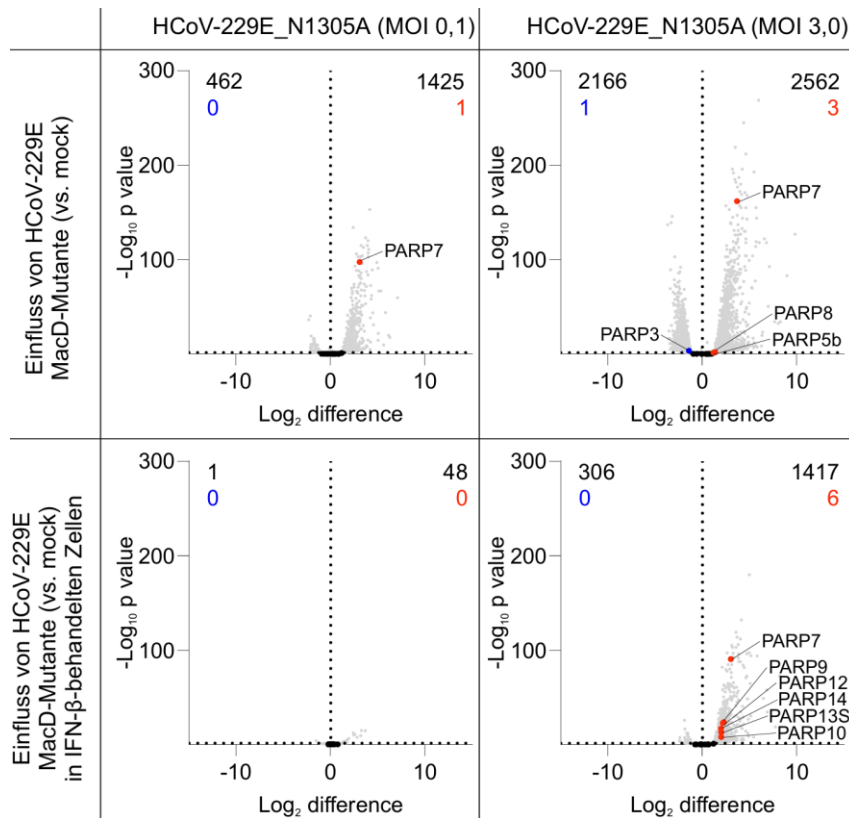


Abbildung 4-12: Regulation der Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 (links) bzw. 3,0 (rechts). Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs bei der Infektion mit HCoV-229E_N1305A. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die IFN- β -Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten MRC-5-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Nach der HCoV-229E_N1305A-Infektion (MOI 0,1) wurden 462 Gene signifikant herunter- und 1425 mRNAs signifikant hochreguliert. Dabei wurde PARP7 im Vergleich mit nicht infizierten Zellen vermehrt exprimiert. Bei einer höheren MOI von 3,0 wurden zusätzlich PARP8 und PARP5b vermehrt bzw. PARP3 verringert exprimiert. Insgesamt wurden 2562 mRNAs signifikant vermehrt und 2166 mRNAs signifikant verringert detektiert. Nach Behandlung mit IFN- β vor der Infektion mit HCoV-229E_N1305A (MOI 0,1) konnte keine Regulation von PARPs detektiert werden. Insgesamt ergaben sich 48 signifikant vermehrt exprimierte Gene und eine verringert exprimierte mRNA. Im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Proben konnte eine signifikant verringerte Expression von PARP7, PARP13S und PARP9 in IFN- β -behandelten und HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen (MOI 0,1) detektiert werden (Anhang Abbildung 7-9). Eine höhere MOI von 3,0 führte in diesem Versuchsansatz zu einer vermehrten Expression von PARP7, PARP9, PARP12, PARP14, PARP13S und PARP10, sowie weiteren 1411 Genen (Abbildung 4-12). Parallel dazu wurden 306 Gene signifikant verringert exprimiert. Die Expression von PARP7, dem am stärksten differentiell exprimierten PARPs, wurde für HCoV-229E WT und ausgewählten MacD-Mutanten mittels RT-qPCR validiert (Abbildung 4-13).

Ergebnisse

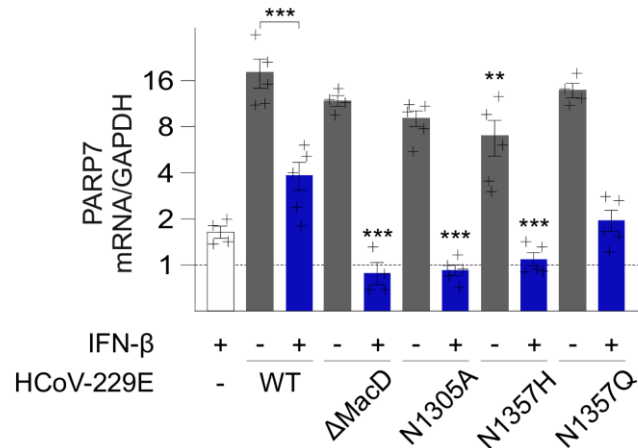


Abbildung 4-13: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7 in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion. Infiziert wurde mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA-Isolation wurde 48 hpi durchgeführt. Dargestellt sind nach Ausreißeridentifizierung mittels Interquartilrange mindestens vier unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test ermittelt (**p ≤ 0,005, ***p ≤ 0,0005). Aufgetragen sind die Vergleiche unbehandelter und IFN-β-behandelter Proben nach Infektion mit dem jeweiligen Virus, sowie die Vergleiche der einzelnen MacD-Mutanten zu HCoV-229E. Die Expression in unbehandelten nicht infizierten (mock) Proben ist durch eine Gerade gekennzeichnet.

Eine vermehrte mRNA-Expression von PARP7 (Abbildung 4-13) konnte für HCoV-229E sowie alle getesteten MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357Q) 48 hpi detektiert werden. Die Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen war am stärksten. Eine signifikant geringere Überexpression wurde für Zellen, welche mit HCoV-229E_N1357H infiziert wurden, im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen detektiert. Eine Vorbehandlung mit IFN-β der HCoV-229E-infizierten Zellen führte zu einer signifikant verringerten PARP7-Expression. Für alle Mutanten konnte eine nicht signifikante Verringerung durch die IFN-β-Zugabe erfasst werden. Im Vergleich mit behandelten HCoV-229E-infizierten Proben war die Expression in behandelten HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1305A- und HCoV-229E_N1357H-infizierten Zellen jedoch signifikant verringert. Eine verringerte Expression um etwa 2-fold (nicht signifikant) wurde für HCoV-229E_N1357Q im Vergleich mit vorbehandelten HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen beobachtet.

4.2.2 Differentielle Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN-β-Vorbehandlung

A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten infiziert. Zusätzlich wurden die Zellen mit IFN-β für 16 h vor der Infektion behandelt. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Das Virusinokulum wurde 1 hpi durch frisches Vollmedium ersetzt. 48 hpi wurde die RNA für RT-qPCR-Analysen mittels Trizol bzw. unter Verwendung des RNeasy Kits für die Next-Generation-Sequenzierung isoliert. Eine Übersicht der differentiellen Genregulation ist in Abbildung 4-14 dargestellt.

Ergebnisse

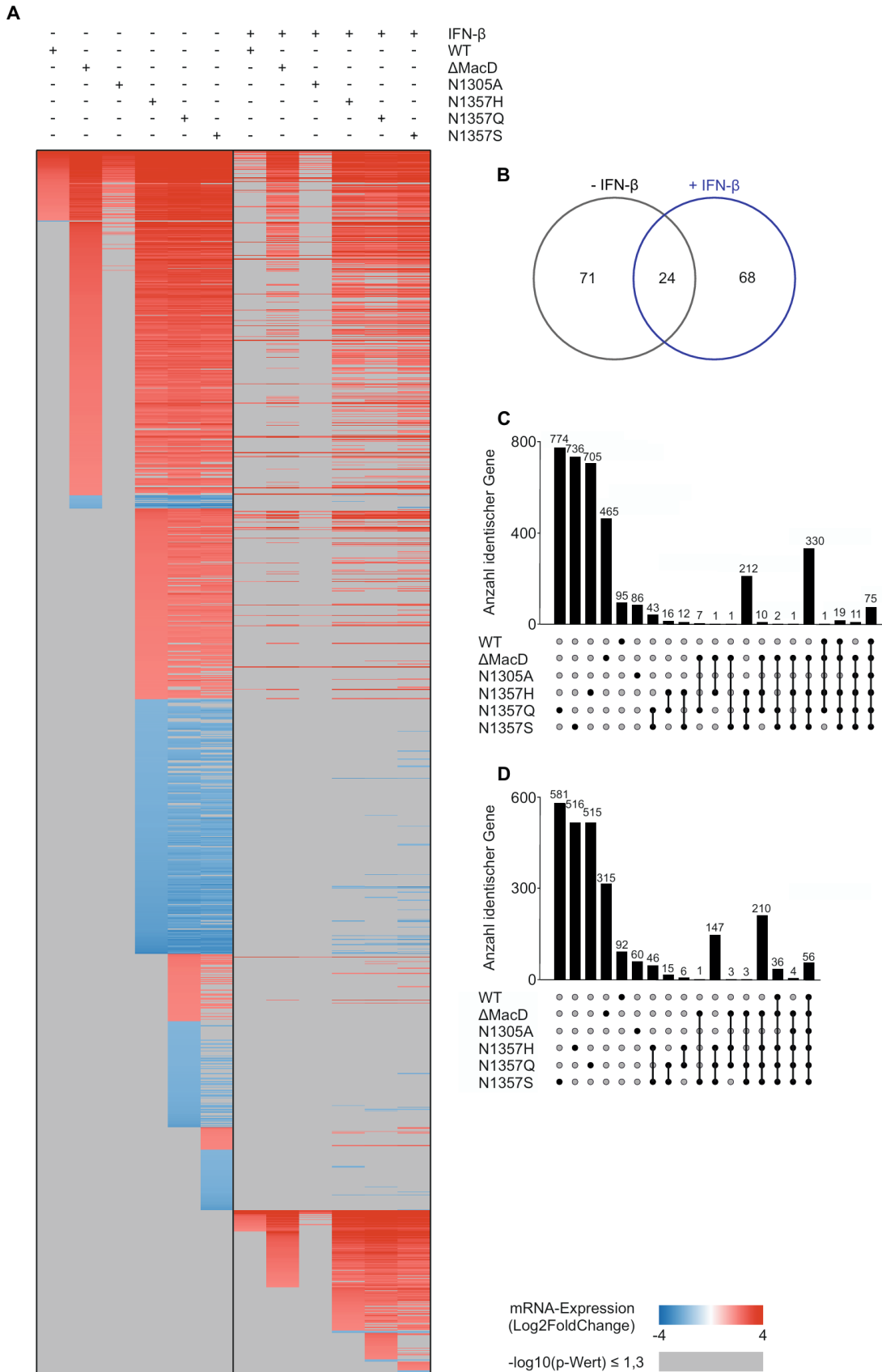


Abbildung 4-14: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Die Zellen wurden 16 h mit IFN- β vorbehandelt und/oder mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert. Mittels Next-Generation-Sequenzierung wurde die

Ergebnisse

Genexpression 48 hpi analysiert und ausgewählte Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ bzw. ≤ -2) als Heatmap (A) abgebildet. Eine Übereinstimmung vermehrt exprimierter Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$) in HCoV-229E-infizierten Proben abhängig von einer IFN- β -Vorbehandlung ist als Venn-Diagramm (B) dargestellt. Nach der Infektion mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten verstärkt exprimierte Gene wurden verglichen. Dargestellt sind Übereinstimmungen in nicht behandelten (C) bzw. IFN- β -behandelten (D) A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen als UpSet-Diagramm.

In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnten 1654 signifikant differentiell regulierte Gene in mindestens einer der behandelten und/oder infizierten Proben detektiert werden. In der in Abbildung 4-14A dargestellten Heatmap lassen sich Unterschiede in der Genexpression der verschiedenen Proben erkennen. Während in unbehandelten HCoV-229E-infizierten Zellen 95 Gene vermehrt exprimiert wurden, konnten in behandelten Proben 24 übereinstimmende und weitere 68 vermehrt exprimierte Gene identifiziert werden (Abbildung 4-14B). In unbehandelten Proben wurden zwei Gene verringert exprimiert, während in vorbehandelten Proben keine Verringerung detektiert werden konnte. Der Vergleich mit MacD-Mutanten-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zeigte mehr differentiell regulierte Gene mit Ausnahme von unbehandelten und behandelten HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben (Abbildung 4-14A). Die MacD-Mutanten können anhand der Genexpression in drei Gruppen eingeteilt werden. Während in HCoV-229E- bzw. HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen eine geringe Anzahl an Genen (97 bzw. 86) signifikant reguliert wurden, konnten in HCoV-229E_ΔMacD-infizierten Proben 465 Gene verstärkt und 18 Gene verringert detektiert werden. Im Vergleich damit resultierte eine Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S zu mehr signifikant vermehrt (≥ 700) und verringert (≥ 290) exprimierten Genen. Obwohl weniger Gene reguliert wurden, konnten die Unterschiede zwischen den verwendeten MacD-Mutanten nach einer IFN- β -Vorbehandlung ebenfalls beobachtet werden. Insbesondere in HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- oder HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen wurden weitere vor allem vermehrt exprimierte Gene nachgewiesen.

Bei der Gegenüberstellung vermehrt exprimierter Gene in mit HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten Zellen konnten in unbehandelten Zellen 86 Gene (Abbildung 4-14C) und in IFN- β -behandelten Proben 60 Gene (Abbildung 4-14D) in allen Proben detektiert werden. Die meisten dieser Gene, 75 in unbehandelten und 56 in behandelten, wurden ebenfalls in HCoV-229E-infizierten Proben detektiert. Übereinstimmende Gene wurden darüber hinaus in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen erfasst, die mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert wurden. Während in unbehandelten Proben 212 identische Gene verstärkt exprimiert wurden, konnten in behandelten Zellen 147 identische Gene nachgewiesen werden. Eine höhere Anzahl übereinstimmender Gene wurde durch die Gruppierung von HCoV-229E_N1357 Punktmutations- und der MacD-Deletionsmutante erzielt. 542 Gene wurden in unbehandelten Zellen und 357 Gene in behandelten Zellen vermehrt exprimiert. Eine detailliertere Analyse einzelner Gene erfolgte in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β , jeweils paarweise. Die Gegenüberstellung erfolgte für infizierte und nicht infizierte Proben, sowie mit HCoV-229E-MacD-Mutanten und mit HCoV-229E infizierten Proben, jeweils ohne bzw. mit IFN- β -Behandlung.

Ergebnisse

Infektion mit HCoV-229E

Der NGS-Datensatz wurde analog den Daten für MRC-5-Zellen analysiert. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Vulkanplots (Abbildung 4-15).

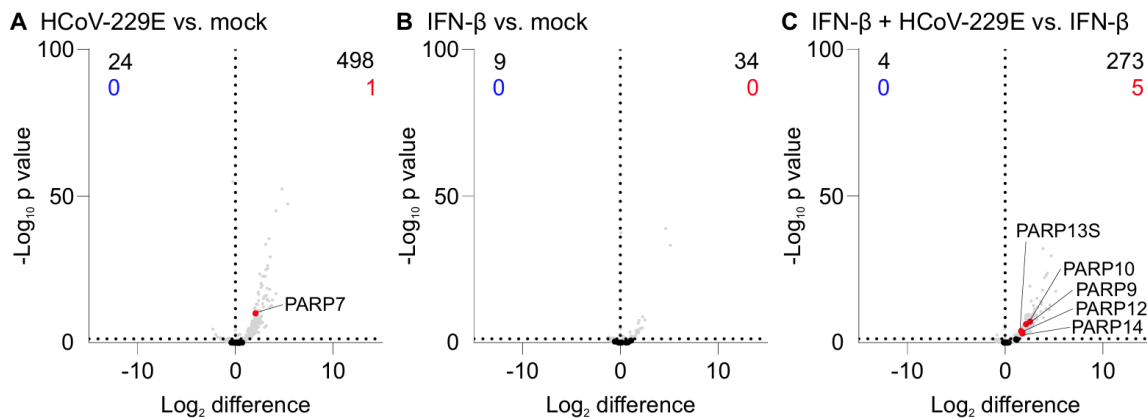


Abbildung 4-15: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde im Vergleich mit nicht infizierten Zellen eine gesteigerte PARP7-Expression detektiert. Darüber hinaus wurden weitere 497 Gene signifikant vermehrt und 24 Gene verringert exprimiert. Nach einer Behandlung der Zellen mit IFN- β konnten 34 vermehrt bzw. 9 verringert exprimierte mRNAs detektiert werden. Eine signifikante Regulation von PARPs wurde allerdings nicht beobachtet, ähnlich wie bereits zuvor in MRC-5-Zellen. Eine Infektion vorbehandelter Zellen zeigte eine gesteigerte mRNA-Expression von PARP10, PARP9, PARP13S, PARP12, PARP14 und weiteren 268 Genen. Gleichzeitig wurden vier signifikant verringert exprimierte Gene detektiert. Eine gesteigerte Expression von PARP9, PARP12 und PARP13S in IFN- β -behandelten und infizierten Proben konnte sowohl in MRC-5-Zellen als auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen beobachtet werden.

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Mittels Next-Generation-Sequenzierung wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach Infektion mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357S, HCoV-229E_N1357Q) analysiert. Nachfolgend wird Bezug auf HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (Abbildung 4-16) genommen.

Ergebnisse

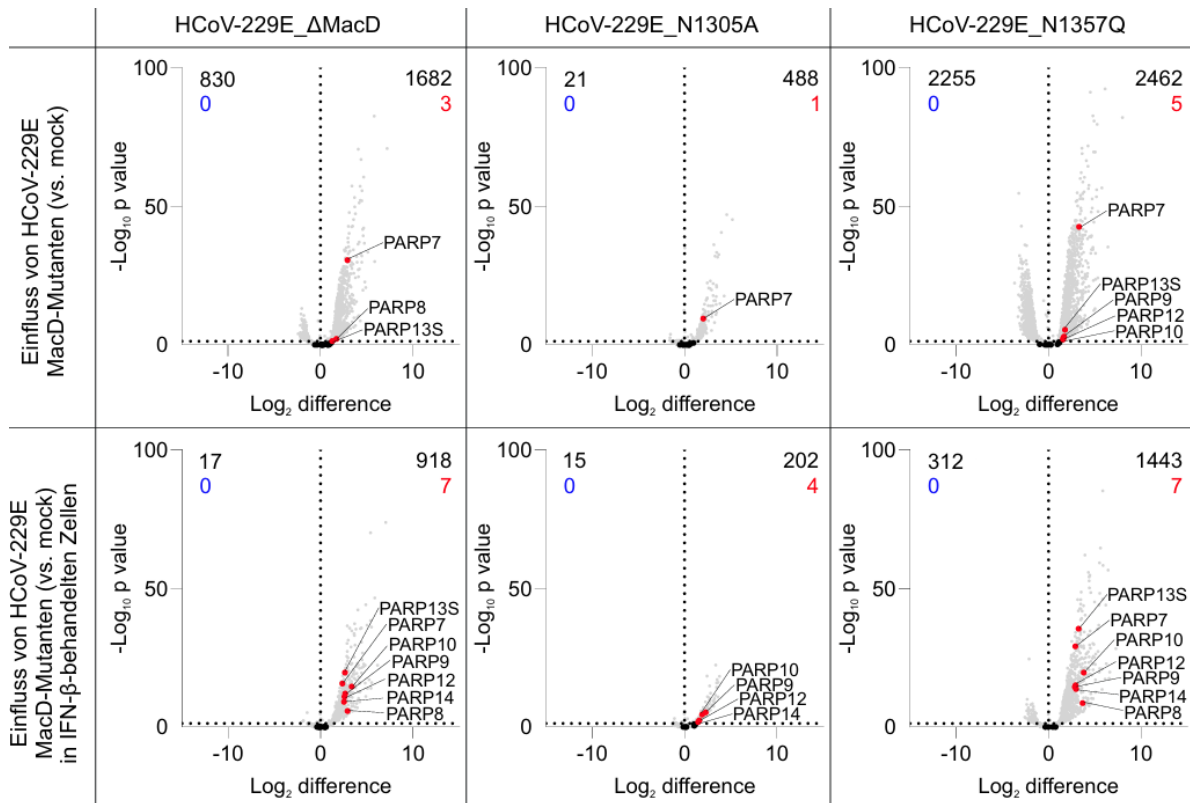


Abbildung 4-16: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357Q). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion in Bezug auf nicht infizierte Zellen (oben) und die Regulation durch die IFN-β-Zugabe (unten) im Vergleich mit nicht infizierten (mock) A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Die Infektionen mit den drei MacD-Mutanten zeigten übereinstimmend eine verstärkte mRNA-Expression von PARP7, welche mittels RT-qPCR validiert werden konnte (Abbildung 4-17). Allerdings wurde in behandelten HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben keine signifikant erhöhte PARP7-Expression mittels NGS detektiert. Die RT-qPCR-Daten zeigten eine gesteigerte Expression von PARP7 in allen infizierten Proben unabhängig von der Vorbehandlung mit IFN-β. Mittels t-Test konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen nicht behandelten und IFN-β-behandelten Zellen festgestellt werden.

Ergebnisse

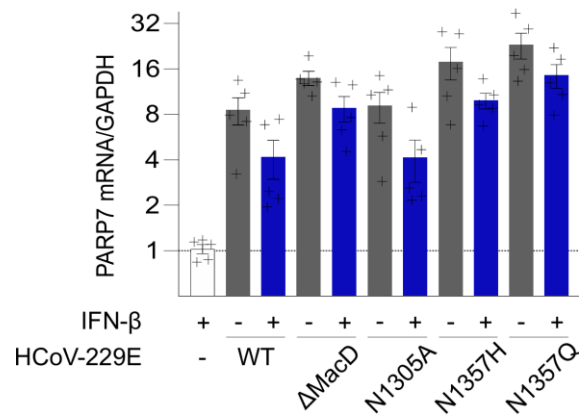


Abbildung 4-17: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA-Isolation wurde 48 hpi durchgeführt. Dargestellt sind fünf unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM).

Mittels NGS wurde zusätzlich eine gesteigerte Expression von PARP8 und PARP13S für die Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD bzw. PARP13S, PARP9, PARP12 und PARP10 für HCoV-229E_N1357Q ermittelt. Auffällig ist, dass die Gesamtanzahl signifikant regulierter Gene in HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen am geringsten (21 verringert und 488 vermehrt exprimiert) und in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen am größten (2255 verringert und 2462 vermehrt exprimiert) ist. In mit IFN-β-vorbehandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden in allen Proben weniger differentiell regulierte Gene erfasst, wobei ein ähnliches Verhältnis differentiell regulierter Gene im Vergleich der MacD-Mutanten gezeigt werden konnte. Die Infektion mit der MacD-Deletionsmutante zeigte eine vermehrte Expression von PARP13S, PARP7, PARP10, PARP9, PARP12, PARP14, PARP8 und weiteren 911 Genen. Einige dieser PARPs, wie PARP10, PARP9, PARP12 und PARP14 wurden verstärkt bei der Infektion mit HCoV-229E_N1305A detektiert. Insgesamt wurden 202 Gene vermehrt exprimiert. Vorbehandelte und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen zeigten eine erhöhte Expression von 1443 Genen. Dazu zählen unter anderem PARP13S, PARP7, PARP10, PARP12, PARP9, PARP14 und PARP8. Verglichen mit HCoV-229E-infizierten Zellen (Anhang Abbildung 7-10) konnte für HCoV-229E_ΔMacD in vorbehandelten Proben PARP8 vermehrt und für HCoV-229E_N1357Q eine signifikante Regulation von PARP8, PARP7 und PARP13S detektiert werden. PARP13S und PARP7 wurden allerdings auch in unbehandelten HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen signifikant vermehrt exprimiert.

Im Vergleich mit MRC-5-Zellen wurden in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen weniger Genregulationen erfasst. Lediglich die vermehrte PARP7-Expression konnte in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN-β zeigte übereinstimmend eine vermehrte Expression von PARP13S, PARP9 und PARP12 (Abbildung 4-9, Abbildung 4-15). Für HCoV-229E_N1305A, welche in beiden Zelllinien verwendet wurde, konnte eine gesteigerte PARP7-Expression in infizierten Zellen mittels NGS detektiert werden. Allerdings wurden in IFN-β-behandelten und infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mehr Gene, darunter auch PARPs, signifikant verstärkt exprimiert (Abbildung 4-12, Abbildung 4-16).

Ergebnisse

4.2.3 Differentielle Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen während einer HCoV-229E-Infektion

Monozyten und Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei der Erkennung und Bekämpfung von Infektionen insbesondere durch die Freisetzung antiviraler Zytokine und Chemokine. Ihre Aktivierung erfolgt direkt durch die Virusaufnahme oder über rezeptorvermittelte Mechanismen. Im Anschluss tragen die Zellen zur Entzündungsreaktion bei und unterstützen die Aktivierung der adaptiven Immunantwort [Desforgues *et al.*, 2007, Funk *et al.*, 2012].

Die Expression von PARPs wurde analog zu den beschriebenen Zelltypen in differenzierten THP-1-Zellen analysiert. Dabei wurden in den drei Subtypen nach Infektion mit HCoV-229E jeweils mehr als 9000 Gene differentiell exprimiert. Signifikant regulierte Gene sind in Abbildung 4-18 grau gekennzeichnet und die Anzahl am oberen Abbildungsrand hinterlegt. Zusätzlich wurden regulierte PARPs farblich hervorgehoben.

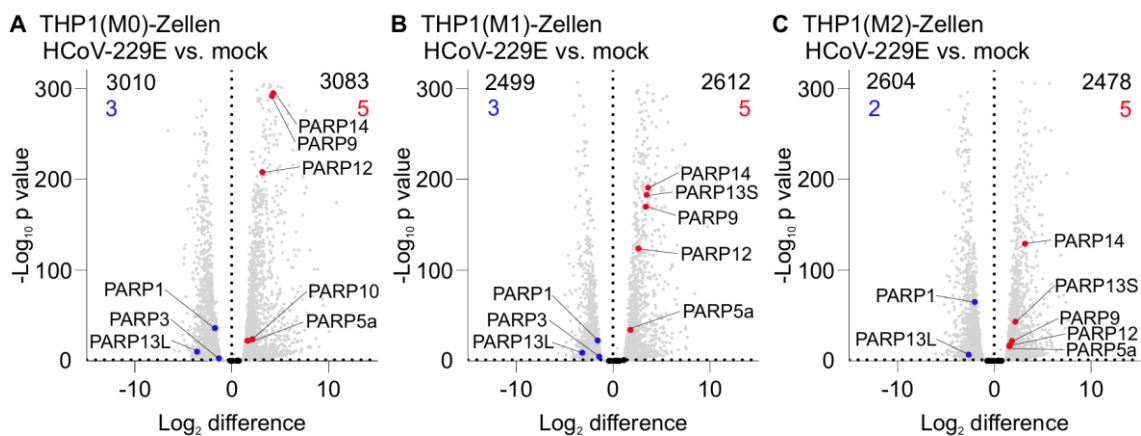


Abbildung 4-18: Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion. Die Differenzierung erfolgte in THP1(M0)-Zellen (A), THP1(M1)-Zellen (B) und THP1(M2)-Zellen (C). Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in den verschiedenen Subtypen im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Proben abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Nach der HCoV-229E-Infektion von THP1(M0)-Zellen wurden 3010 Gene vermindert und 3083 Gene vermehrt exprimiert. PARP1, PARP3 und PARP13L wurden dabei verringert, PARP14, PARP9, PARP12, PARP10 und PARP5a vermehrt detektiert. Während in THP1(M1)-Zellen ebenfalls PARP1, PARP3 und PARP13L und weitere 2496 Gene verringert exprimiert wurden, konnten Abweichungen der vermehrt exprimierten mRNAs beobachtet werden. Insgesamt wurden 2612 Gene, darunter PARP14, PARP13S, PARP9, PARP12 und PARP5a vermehrt exprimiert. In THP1(M2)-Zellen zeigten sich nach der Infektion mit HCoV-229E 2604 signifikant verringert bzw. 2478 verstärkt exprimierte Gene. Dabei wurden PARP1 und PARP13L verringert und PARP14, PARP13S, PARP9, PARP12 und PARP5a vermehrt detektiert. Im Vergleich mit MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden in infizierten Proben unterschiedliche PARPs vermehrt bzw.

Ergebnisse

verringert exprimiert. Der Vergleich infizierter makrophagenähnlichen Zellen mit IFN- β -vorbehandelten und infizierten MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zeigte eine Übereinstimmung mehrerer vermehrt exprimierter PARPs (Abbildung 4-9, Abbildung 4-15, Abbildung 4-18).

Der Nachweis ausgewählter PARPs erfolgte zusätzlich mittels RT-qPCR und ist in Abbildung 4-19A dargestellt. Eine vermehrte Expression wurde für PARP7, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13 und PARP14 in allen makrophagenähnlichen Zellen detektiert, wobei die schwächste Expression in THP1(M1)-Zellen erfolgte. Mit Ausnahme von PARP10 konnte die höchste Expression dieser PARPs in THP1(M0)-Zellen detektiert werden. Der Vergleich mit nicht infizierten Proben zeigte signifikant erhöhte Expression der ausgewählten PARPs mit Ausnahme von PARP7 in THP1(M2)-Zellen. Darüber hinaus wurde die Expression von PARP7 nach der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H oder HCoV-229E_N1357Q analysiert (Abbildung 4-19B). Die Expression war in THP1(M0)-Zellen am höchsten, während PARP7 in THP1(M1)- und THP1(M2)-Zellen ähnliche Expressionslevel erreichte.

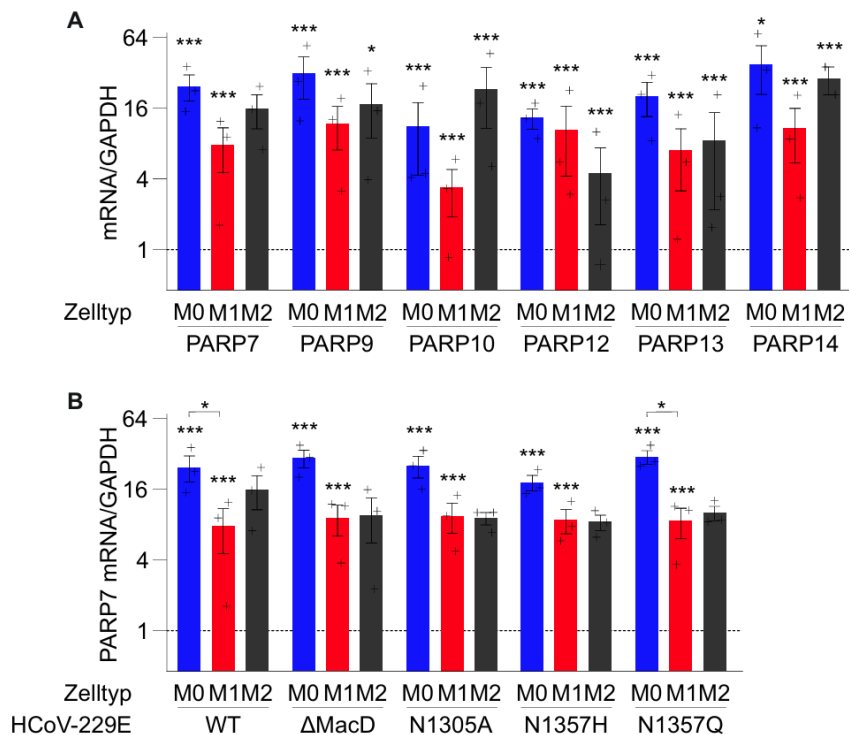


Abbildung 4-19: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von PARP7, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13 und PARP14 in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer Infektion mit HCoV-229E (A) und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H oder HCoV-229E_N1357Q) (B). Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. 48 hpi wurde die RNA-Isolation durchgeführt. Dargestellt sind drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert \pm SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Proben bzw. zwischen den Subtypen nach Infektion mit dem gleichen Virus ermittelt (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$).

Für THP1(M2)-Zellen konnte nach der Infektion mit HCoV-229E WT oder den MacD-Mutanten eine Steigerung der PARP7-Expression (nicht signifikant) detektiert werden. Auffällig ist, dass

Ergebnisse

HCoV-229E-infizierte THP1(M2)-Zellen eine höhere PARP7-Expression aufweisen als mit MacD-Mutanten infizierte Zellen. Um die zelltypunabhängige HCoV-229E-induzierte PARP7-Expression weiter zu untersuchen, wurden ausgewählte mit PARP7 im Zusammenhang stehende Gene bzw. Signalwege analysiert.

4.3 Transkriptomanalyse von PARP7-assoziierten Genen

In einer weiteren Analyse des NGS-Datensatzes wurde die Genregulation von mit PARP7, jenem PARP mit der stärksten Expression während der HCoV-229E-Infektion, im Zusammenhang stehenden (antiviralen) Signalwegen (Abbildung 1-3) analysiert. Die in dieser Arbeit näher betrachteten Gene sind TBK1, FRA1, RIG-I, MDA5, MAVS, p50, p65, IRF1, IRF3, IRF7, NEMO, IKK α , IKK β , IKK ϵ , IKK κ , DTX3L, IFNAR1, IFNAR2, IFNLR1 und Interferone (α , β , λ). Die Regulation dieser Gene wurde analog für den Microarray-Datensatz analysiert. Die zugehörigen Vulkanplots sind dem Anhang (Abbildung 7-11, Abbildung 7-12) zu entnehmen.

4.3.1 Differentielle Genexpression in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung in MRC-5-Zellen

Nachfolgend liegt der Fokus auf dem generierten NGS-Datensatz. Die statistische Auswertung erfolgte äquivalent der Genexpressionsanalyse von PARPs für alle Zelltypen.

Infektion mit HCoV-229E

Die mit PARP7 im Zusammenhang betrachteten Gene sind für MRC-5-Zellen abhängig von der Infektion mit HCoV-229E und/oder der Behandlung mit IFN- β in Abbildung 4-20 dargestellt.



Abbildung 4-20: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine IFN- β -Behandlung erfolgte bei 37 °C für 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Ergebnisse

Die Auswertung des Datensatzes zeigte eine vermehrte Expression während der HCoV-229E-Infektion von p50, TBK1 und MDA5. Parallel dazu wurde eine verringerte Expression für IRF3 und IKBKE (IKKε) im Vergleich mit nicht infizierten Zellen detektiert. Nach der Behandlung mit IFN-β erfolgte keine Regulation der PARP7-assoziierten Gene. Eine Infektion von vorbehandelten MRC-5-Zellen führte zu einer vermehrten Expression von MDA5, p50, RIG-I, IFNB1, IRF7 und DTX3L. Wird die Anzahl signifikant regulierter Gene der jeweiligen Proben verglichen, ist die stärkste Regulation in HCoV-229E-infizierten Zellen mit über 4600 Genen erkennbar. Die vermehrte Expression einiger der ausgewählten Gene konnte in HCoV-229E-infizierten Zellen unabhängig von der IFN-β-Vorbehandlung detektiert werden. Zusätzlich wurde der Versuchsansatz mit einer MOI von 3,0 durchgeführt, um die Auswirkung einer stärkeren Virusinfektion zu analysieren. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-21 dargestellt.

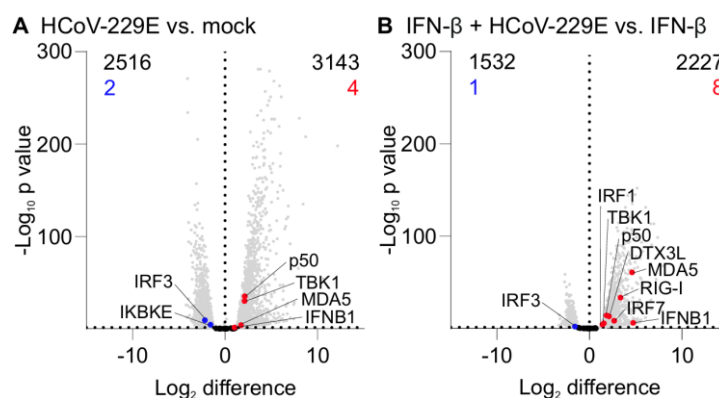


Abbildung 4-21: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion (MOI 3,0). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte bei 37 °C für 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 3,0 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A) und der Vergleich IFN-β-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (B) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In mit einer MOI von 3,0 infizierten MRC-5-Zellen wurde im Vergleich mit einer geringeren MOI von 0,1 eine verstärkte Genregulation erfasst. In HCoV-229E-infizierten Zellen wurden 2516 Gene verringert (z. Bsp.: IRF3, IKBKE) und 3143 Gene vermehrt (z. Bsp.: p50, TBK1, MDA5, IFNB1) exprimiert. Nach einer vorherigen IFN-β-Behandlung konnten IRF3 und weitere 1531 Gene verringert detektiert werden. Parallel dazu wurden 2227 Gene, darunter MDA5, RIG-I, p50, DTX3L, IRF7, IFNB1, TBK1 und IRF1 vermehrt exprimiert.

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Die Expression der ausgewählten mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Gene wurde analog für HCoV-229E_N1305A-infizierte MRC-5-Zellen analysiert (Abbildung 4-22).

Ergebnisse

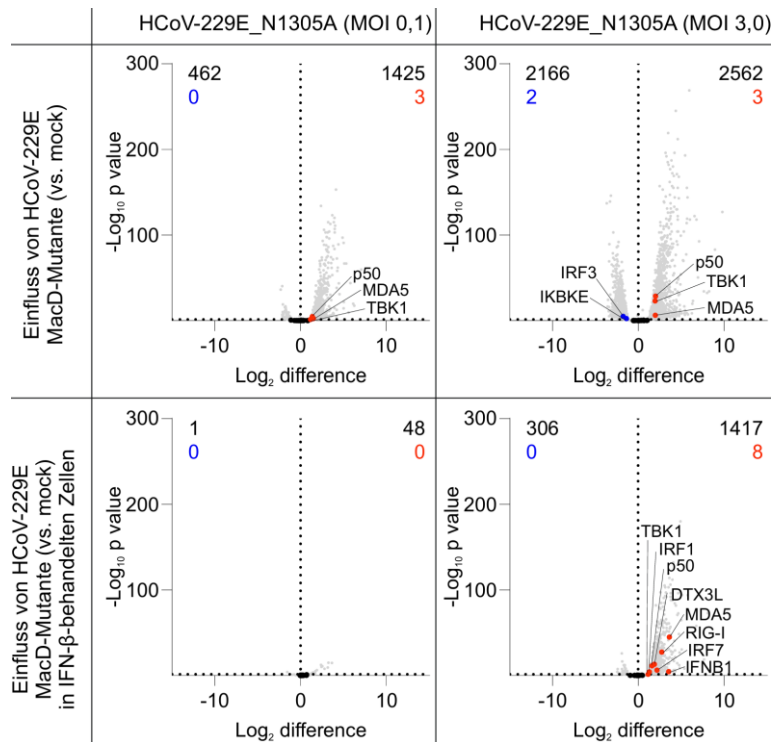


Abbildung 4-22: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte bei 37 °C für 16 h vor der Infektion. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind PARP7-assoziierte Gene für die Infektion mit HCoV-229E_N1305A bei einer MOI von 0,1 (links) bzw. 3,0 (rechts) bei 33 °C. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) bzw. die Regulation durch die IFN- β -Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten (mock) MRC-5-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Im Vergleich mit nicht infizierten Zellen wurde während der HCoV-229E_N1305A-Infektion bei einer MOI von 0,1 eine gesteigerte Expression von p50, MDA5 und TBK1 detektiert. In vorbehandelten infizierten Zellen wurden 49 regulierte Gene und keine Expression der ausgewählten Gene im Vergleich mit nicht behandelten infizierten Zellen erfasst. Die Infektion mit einer höheren Virusmenge (MOI 3,0) führte zu einer verringerten Expression von IRF3 und IKBKE. Parallel dazu wurden (analog zur geringeren Virusmenge) p50, TBK1 und MDA5 vermehrt detektiert. In IFN- β -vorbehandelten Zellen wurde eine vermehrte Genexpression von MDA5, RIG-I, p50, DTX3L, IRF7, IRF1, IFNB1 und TBK1 ermittelt. Bei einer Infektion mit einer MOI von 3,0 fällt auf, dass sowohl in unbehandelten als auch in behandelten Zellen eine erhöhte Genregulation stattfindet.

Ausgewählte Gene wurden mittels RT-qPCR für MRC-5-Zellen nach der Infektion mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357Q) validiert (Abbildung 4-23).

Ergebnisse

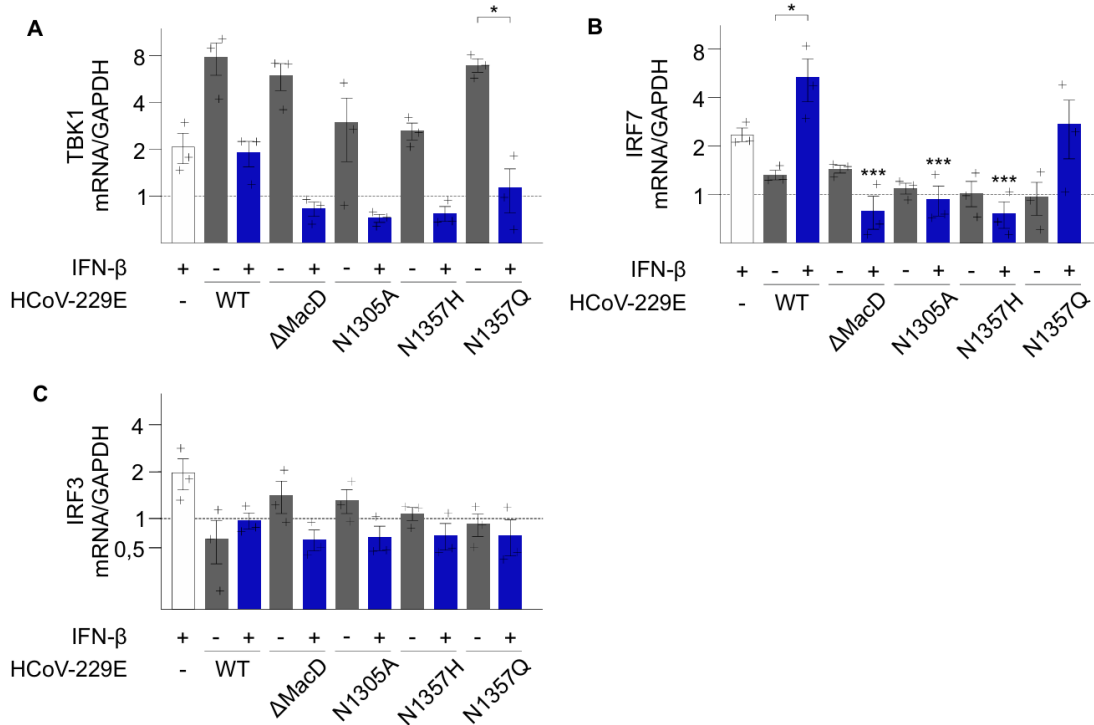


Abbildung 4-23: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von TBK1 (A), IRF7 (B) und IRF3 (C) in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q). Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA-Isolation wurde 48 hpi durchgeführt. Dargestellt sind drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test ermittelt (*p ≤ 0,05, ***p ≤ 0,0005). Der Vergleich erfolgte zwischen unbehandelten und behandelten Zellen bzw. zwischen HCoV-229E (WT) und den jeweiligen HCoV-229E-MacD-Mutanten.

Für die beschriebenen MacD-Mutanten wurde die Expression von TBK1, IRF3 und IRF7 analysiert. Dabei zeigte sich ein Expressionsanstieg von TBK1 (Abbildung 4-23A) in infizierten Proben, wobei der niedrigste Anstieg bei einer Infektion mit HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357H detektiert wurde. Nach einer vorherigen IFN-β-Behandlung wurde eine 2-fach vermehrte TBK1-Expression in HCoV-229E-infizierten Zellen gemessen. Diese war allerdings geringer als in unbehandelten HCoV-229E-infizierten Proben. Eine Infektion mit einer der MacD-Mutanten nach der IFN-β-Behandlung zeigte keine bzw. für HCoV-229E_N1357Q eine geringe erhöhte Expression von TBK1. Verglichen mit HCoV-229E wurde eine verringerte Expression insbesondere in HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1305A- und HCoV-229E_N1357H-infizierten Zellen ermittelt.

Für die IRF7-Expression (Abbildung 4-23B) konnte mittels RT-qPCR nach der Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E_ΔMacD eine um 1,5-fach erhöhte Expression detektiert werden. Alle anderen verwendeten MacD-Mutanten zeigten eine Expression ähnlich nicht infizierter MRC-5-Zellen. Eine zusätzliche IFN-β-Vorbehandlung resultierte in einer vermehrten IRF7-Expression in HCoV-229E-infizierten (ca. 5-fach) bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierten (ca. 3-fach) MRC-5-Zellen. Verglichen mit HCoV-229E zeigten die MacD-Mutanten HCoV-229E_ΔMacD,

Ergebnisse

HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357H eine signifikant geringere Expression, ähnlich unbehandelter nicht infizierter Proben.

Während eine Vorbehandlung mit IFN- β zu einem 2-fachen Anstieg der IRF3-Expression führte, konnte in HCoV-229E-infizierten Zellen sowohl mit als auch ohne IFN- β -Behandlung eine geringere Expression detektiert werden (Abbildung 4-23C). Eine 1,5-fache Zunahme der IRF3-Expression erfolgte in HCoV-229E_ΔMacD- oder HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen. Für HCoV-229E_N1357H- und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Proben ließ sich eine Expression feststellen, die ähnlich mit der in unbehandelten nicht infizierten MRC-5-Zellen war. Die geringste Expression wurde durchschnittlich in infizierten und mit IFN- β behandelten Proben detektiert. Die statistische Auswertung ergab keine signifikanten Unterschiede. Eine Regulation um etwa 2-fach wurde für TBK1, IRF3 und IRF7 nach einer IFN- β -Behandlung in nicht infizierten MRC-5-Zellen erfasst.

4.3.2 Differentielle Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion

Der Einfluss der HCoV-229E-Infektion (MOI 0,1 bei 33 °C) von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β analysiert.

Infektion mit HCoV-229E

Bei signifikanter Regulation wurden TBK1, FRA1, RIG-I, MDA5, MAVS, p50, p65, IRF1, IRF3, IRF7, NEMO, IKK α , IKK β , IKK ϵ , IKK κ , DTX3L, IFNAR1, IFNAR2, IFNLR1 und IFN- α Subtypen, IFN- β , IFN- λ Subtypen in Abbildung 4-24 farblich hervorgehoben.

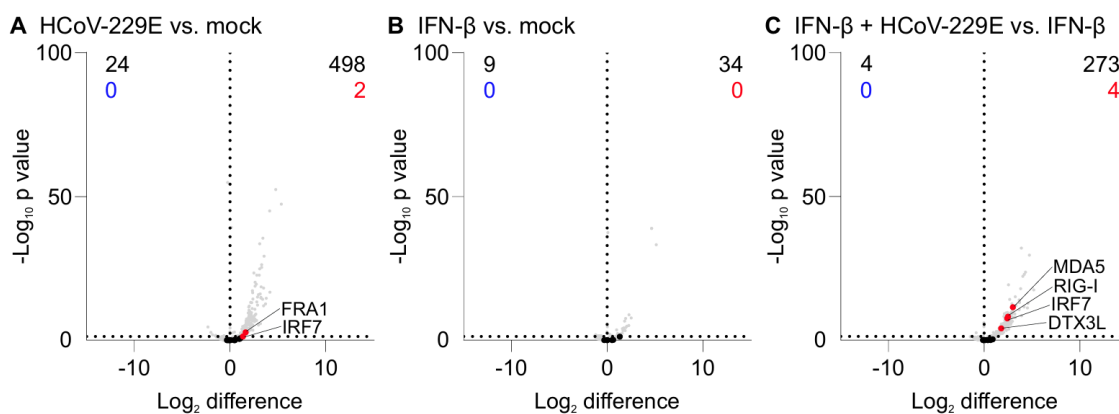


Abbildung 4-24: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h (37 °C) vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 (33 °C). Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbinungsrand vermerkt.

Ergebnisse

Infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen exprimierten 498 Gene, wie z. Bsp. FRA1 und IRF7 vermehrt, während 24 Gene signifikant verringert exprimiert wurden. Durch eine zusätzliche Vorbehandlung mit IFN- β wurden MDA5, RIG-I, IRF7, DTX3L und weitere 269 mRNAs vermehrt detektiert. Übereinstimmend mit MRC-5-Zellen wurde nach der Zugabe von IFN- β ohne anschließende HCoV-229E-Infektion keines der ausgewählten Gene signifikant reguliert. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden neun mRNAs vermindert bzw. 34 Gene vermehrt erfasst. Die in HCoV-229E-infizierten Proben differentiell exprimierten Gene unterscheiden sich zwischen den beiden Zelltypen. Lediglich in vorbehandelten und infizierten Proben konnten jeweils MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L detektiert werden (Abbildung 4-20, Abbildung 4-24).

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Neben der Infektion mit HCoV-229E wurden die A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q infiziert. Die Analyse der Genexpression ist Abbildung 4-25 zu entnehmen.

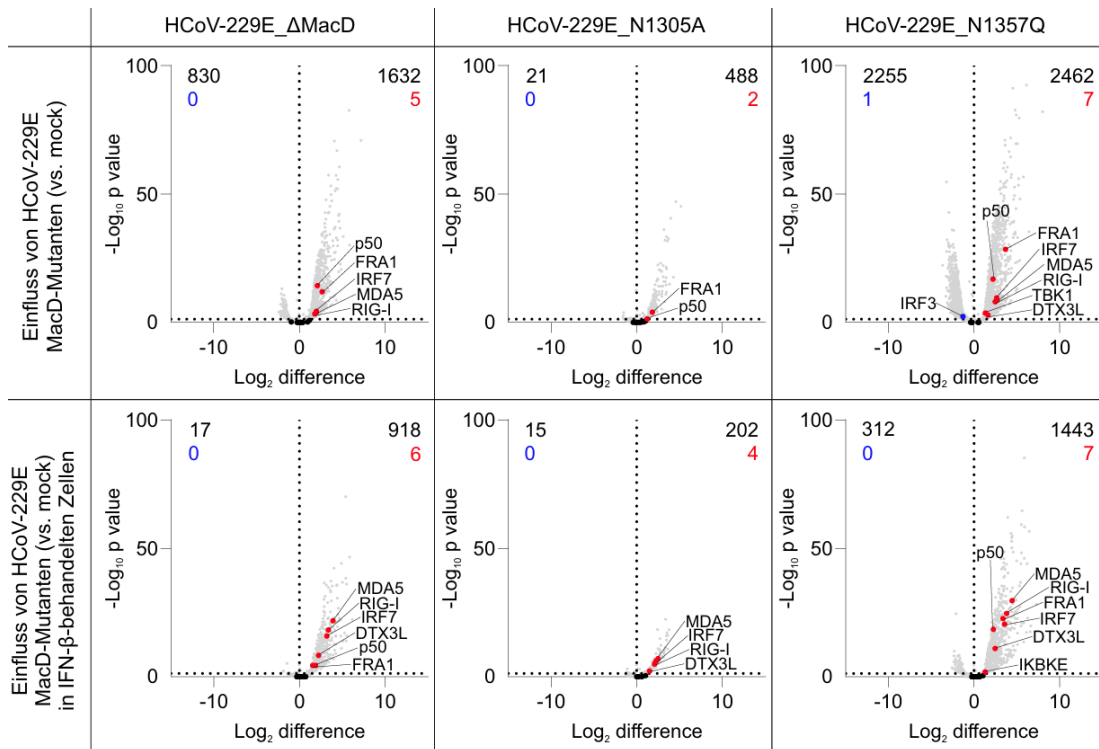


Abbildung 4-25: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte bei 37 °C für 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt ist die Regulation PARP7-assoziiierter Gene nach der Infektion mit HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die IFN- β -Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten (mock) A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In HCoV-229E_ Δ MacD-infizierten Zellen wurde eine gesteigerte Expression von 1632 Genen, darunter p50, FRA1, IRF7, MDA5 und RIG-I detektiert. Parallel dazu wurden 830 Gene verringert

Ergebnisse

nachgewiesen. IFN- β -behandelte und infizierte Zellen wiesen eine ähnliche Genregulation im Vergleich mit unbehandelten HCoV-229E_ Δ MacD-infizierten Proben auf, wobei die Anzahl vermehrt detektierter Gene (918) bzw. verringert exprimierter Gene (17) deutlich geringer war. Zusätzlich zu den in infizierten Zellen vermehrt detektierten Genen wurde DTX3L signifikant erhöht. Für A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit HCoV-229E_N1305A infiziert wurden, konnten 21 verringert und 488 vermehrt exprimierte Gene erfasst werden. Dabei wurden FRA1 und p50 verstärkt detektiert. In vorbehandelten Zellen wurden MDA5, IRF7, RIG-I und DTX3L vermehrt exprimiert. Im Gegensatz zu MRC-5-Zellen (Abbildung 4-22) konnte sowohl in unbehandelten als auch in IFN- β -behandelten Proben eine signifikant gesteigerte Expression ausgewählter Gene detektiert werden. Von den in Abbildung 4-25 dargestellten MacD-Mutanten zeigte HCoV-229E_N1357Q die stärkste Genregulation. Dabei wurden 2462 Gene vermehrt bzw. 2255 Gene, wie IRF3 vermindert exprimiert. Eine erhöhte Detektion erfolgte für FRA1, p50, IRF7, MDA5, RIG-I, TBK1 und DTX3L. In IFN- β -vorbehandelten Zellen wurde anstelle von TBK1 IKBKE (IKK ϵ) vermehrt detektiert. Generell wurden weniger Gene signifikant (312 verringert bzw. 1443 vermehrt) reguliert. Im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen wurden signifikante Unterschiede in der Genregulation für HCoV-229E_N1357Q erfasst (Anhang Abbildung 7-13). Die Expression von TBK1, IRF3 und IRF7 wurde parallel mittels RT-qPCR analysiert (Abbildung 4-26).

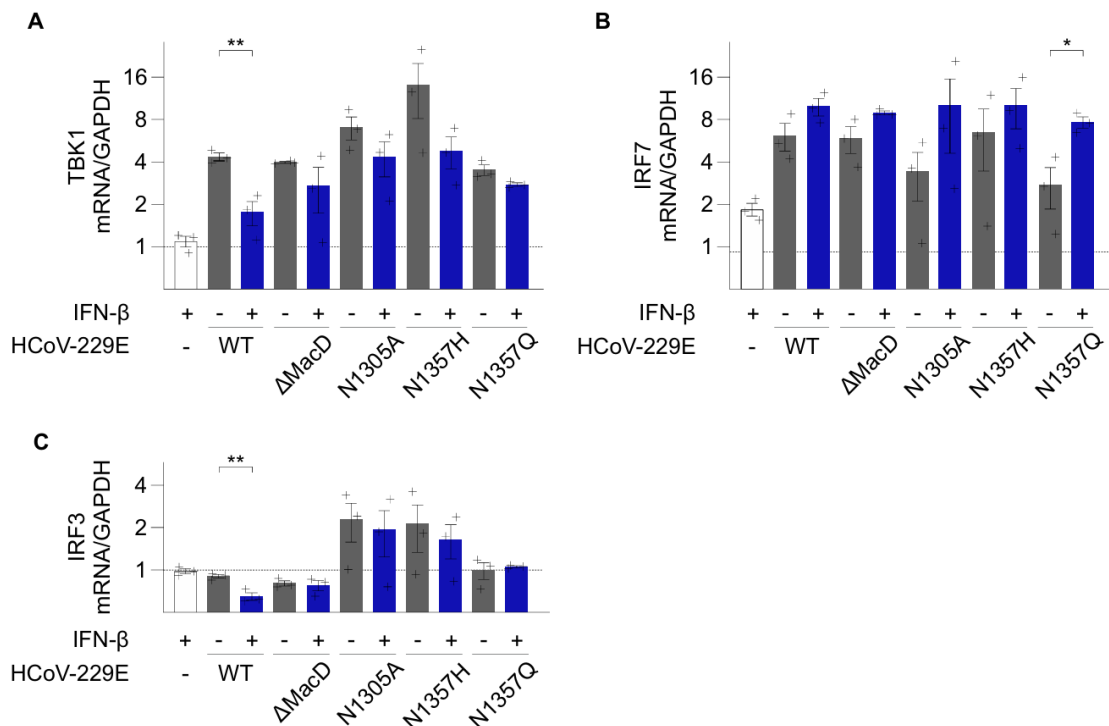


Abbildung 4-26: Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR von TBK1 (A), IRF7 (B) und IRF3 (C) in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q). Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA-Isolation wurde 48 hpi durchgeführt. Dargestellt sind drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert \pm SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels zweifaktorieller ANOVA mit anschließendem Tukey post-hoc Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$). Der Vergleich erfolgte zwischen unbehandelten und behandelten Zellen bzw. zwischen HCoV-229E und den jeweiligen MacD-Mutanten.

Ergebnisse

Eine vermehrte Expression wurde für TBK1 (Abbildung 4-26A) und IRF7 (Abbildung 4-26B) in infizierten Proben detektiert. In vorbehandelten Zellen wurde eine höhere IRF7-Expression als in unbehandelten Zellen ermittelt. Für TBK1 erfolgte eine höhere Expression in unbehandelten infizierten Zellen. Eine den Kontrollproben ähnliche IRF3-Expression (Abbildung 4-26C) konnte IFN- β -unabhängig für HCoV-229E-, HCoV-229E_ΔMacD- und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Proben detektiert werden. Eine bis zu 2-fach gesteigerte Expression wurde unabhängig von einer IFN- β -Behandlung in HCoV-229E_N1305A- bzw. HCoV-229E_N1357H-infizierten Zellen erfasst.

4.3.3 Differentielle Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen während einer HCoV-229E-Infektion

Die Genexpressionsanalyse von differenzierten THP-1-Zellen (Abbildung 4-27) zeigte eine signifikante Regulation von etwa 5000 bis 6000 Genen. Dies ist vergleichbar mit der Expression in MRC-5-Zellen (Abbildung 4-20).

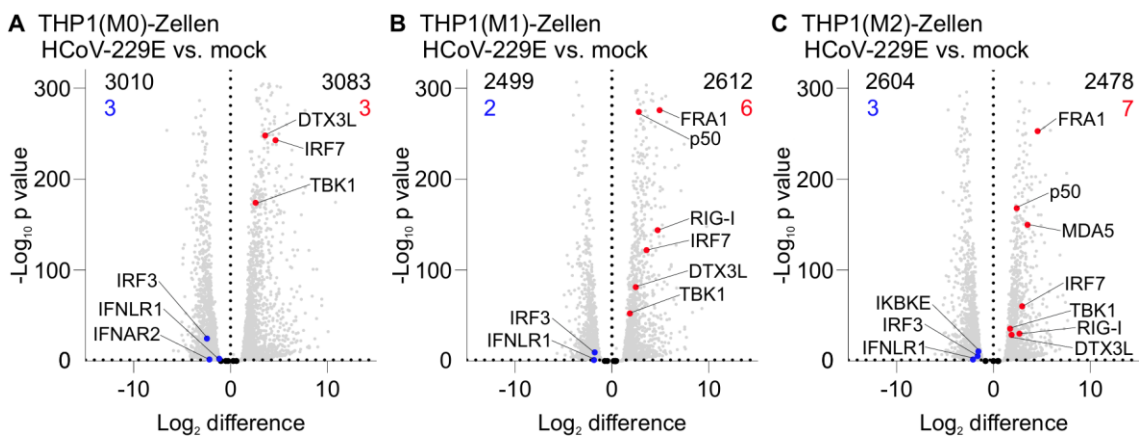


Abbildung 4-27: Genexpression in makrophagenähnlichen Zellen in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion. Die Differenzierung erfolgte in THP1(M0)-Zellen (A), THP1(M1)-Zellen (B) und THP1(M2)-Zellen (C). Anschließend wurden die Zellen mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten Gene, deren Zusammenhang mit PARP7 näher analysiert wurde. In den Vulkanplots ist der Einfluss der HCoV-229E-Infektion in den verschiedenen Subtypen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Für THP1(M0)-Zellen wurden 3010 Gene verringert und 3083 Gene vermehrt detektiert. Zu den differentiell weniger stark exprimierten Genen zählen IRF3, sowie die für die Rezeptoren IFNLR1 und IFNAR2 kodierenden Gene. Eine vermehrte Expression wurde für DTX3L, IRF7 und TBK1 ermittelt. THP1(M1)-Zellen zeigten eine vermehrte Expression von FRA1, p50, RIG-I, IRF7, DTX3L, TBK1 und weiteren 2606 Genen. Gleichzeitig wurden IRF3 und IFNLR1, sowie weitere 2497 Gene verringert detektiert. In THP1(M2)-Zellen wurden mehr Gene signifikant verringert (2604) als vermehrt (2478) exprimiert. Eine Verringerung wurde für IKBKE (IKK ϵ), IRF3 und IFNLR1 ermittelt. FRA1, p50, MDA5, IRF7, TBK1, RIG-I und DTX3L wurden vermehrt detektiert. Der Vergleich der drei Subtypen zeigte eine übereinstimmende vermehrte Genexpression von DTX3L, IRF7 und TBK1, während IRF3 und IFNLR1 verringert exprimiert wurden. Verglichen mit der Genexpression

Ergebnisse

in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden partielle Übereinstimmungen der Regulation einzelner Gene beobachtet (Kapitel 5.2.2).

4.4 Proteinregulation während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung

Basierend auf den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse wurden ausgewählte Proteine analysiert, die im Zusammenhang mit der viralen MacD oder PARP7-assoziierten Signalwegen stehen (Kapitel 1.8). Ziel war es, die Auswirkungen der Genregulation auf Proteinebene zu überprüfen. Zusätzlich wurden vereinzelt Proteinmodifikationen, wie ADP-Ribosylierungen, detektiert.

4.4.1 Proteinregulation in MRC-5-Zellen während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung

In einer ersten Analyse wurde je ein Vertreter der IFN- β -spezifisch (PARP9) bzw. infektionsspezifisch (PARP7) vermehrt exprimierten PARPs auf Proteinebene näher betrachtet. Dafür wurde Gesamtprotein aus MRC-5-Zellen isoliert (Kapitel 3.5.1), die unbehandelt, IFN- β -behandelt, HCoV-229E-infiziert oder behandelt und infiziert wurden. Repräsentativ sind nachfolgend je ein Blot für die fluoreszenzbasierte Detektion von PARP7 bzw. PARP9 dargestellt (Abbildung 4-28).

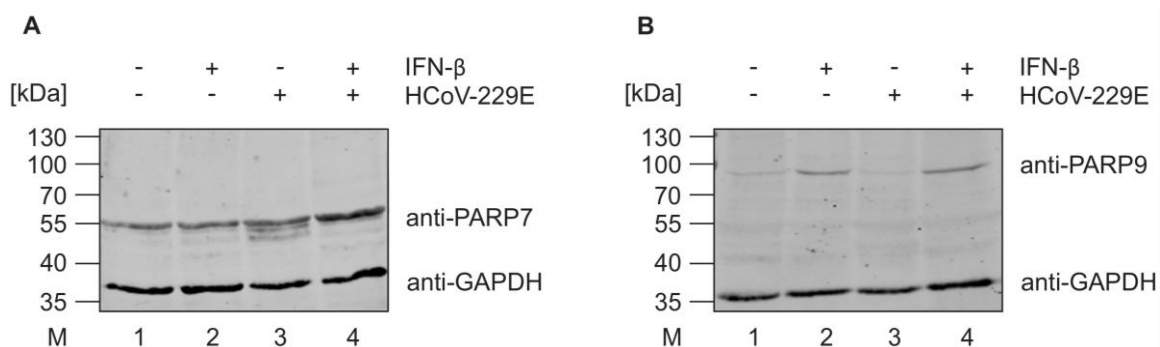


Abbildung 4-28: Proteinanalyse von PARP7 und PARP9 in MRC-5-Zellisolaten. Die Zellen wurden IFN- β -vorbehandelt (16 h, 37 °C) und/oder mit HCoV-229E infiziert. Als Kontrolle dienten nicht behandelte und nicht infizierte MRC-5-Zellen. 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert und anhand ihrer Größe aufgetrennt. Als Kontrolle wurde GAPDH mitgeführt. Die Detektion erfolgte unter Verwendung spezifischer Antikörper für PARP7 (A) und PARP9 (B) in Kombination mit fluoreszenzbasierten Sekundärantikörpern (IRDye 800CM anti-mouse bzw. anti-rabbit).

Für PARP7 konnte ein minimal verstärktes Signal für IFN- β -vorbehandelte infizierte MRC-5-Zellen detektiert werden. In infizierten Zellen wurden zusätzliche Banden bei einer Größe von 45 bis 55 kDa erfasst. Eine Zunahme von PARP9 wurde in nicht infizierten und infizierten Zellen nach einer Vorbehandlung mit IFN- β gezeigt. In infizierten und unbehandelten nicht infizierten Proben konnte kaum ein Signal für PARP9 detektiert werden. Die Proteinmenge von PARP9 wurde mittels HRP-konjugierter Antikörper quantifiziert (Abbildung 4-29B). Repräsentativ ist ein Blot, der für die

Ergebnisse

Quantifizierung verwendet wurde, in Abbildung 4-29A dargestellt. Als Kontrolle und für die Normalisierung wurde Beta-Aktin verwendet.

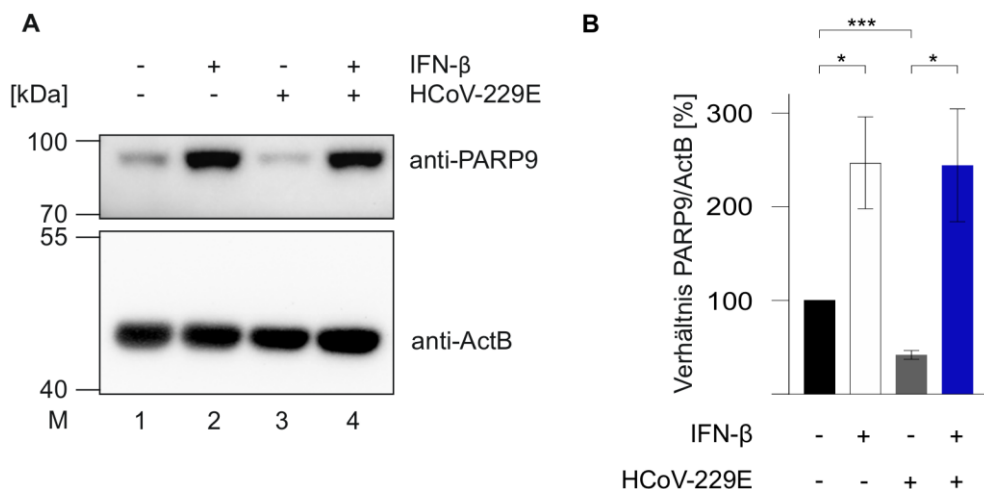


Abbildung 4-29: Proteinanalyse und Quantifizierung von PARP9 in MRC-5-Zelllysaten.

Die Zellen wurden IFN- β -vorbehandelt und/oder HCoV-229E-infiziert. 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert, anhand ihrer Größe aufgetrennt und mittels PARP9-spezifischem Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde Beta-Aktin mitgeführt. Die Detektion erfolgte mittels HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse Immunglobulin HRP pAK). Ein repräsentativer Blot für PARP9 (A) diente der Quantifizierung (B) von drei unabhängigen Versuchsansätzen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test ermittelt (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,0005$). Der Vergleich erfolgte zwischen unbehandelten und IFN- β -behandelten Proben, HCoV-229E-infizierten behandelten oder unbehandelten, sowie infizierten und nicht infizierten Proben.

Das stärkste Signal für PARP9 wurde in IFN- β -behandelten MRC-5-Zellen unabhängig von einer anschließenden HCoV-229E-Infektion detektiert. Für die Quantifizierung von drei unabhängig durchgeführten Versuchsansätzen wurde das Verhältnis von PARP9 und Beta-Aktin ermittelt. Unbehandelte nicht infizierte Zellen wurden auf 100 % normalisiert. Signifikante Unterschiede konnten mittels t-Test für IFN- β -behandelte oder HCoV-229E-infizierte MRC-5-Zellen verglichen mit unbehandelten nicht infizierten Zellen ermittelt werden. Zusätzlich wurde etwa fünffach mehr PARP9-Signal in behandelten und infizierten Zellen als in unbehandelten infizierten MRC-5-Zellen detektiert.

Um einen möglichen Zusammenhang von ausgewählten Proteinen welche an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind (Abbildung 1-3) und PARPs zu prüfen, wurde die Detektion für ADP-ribosylierte Proteine, HCoV-229E-N-Protein, TBK1, IRF3 unter Verwendung von HRP-konjugierten Sekundärantikörper durchgeführt. Ein repräsentativer Blot ist in Abbildung 4-30 dargestellt. Jeweils 100 μ g Gesamtprotein wurden auf einem 9 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

Ergebnisse

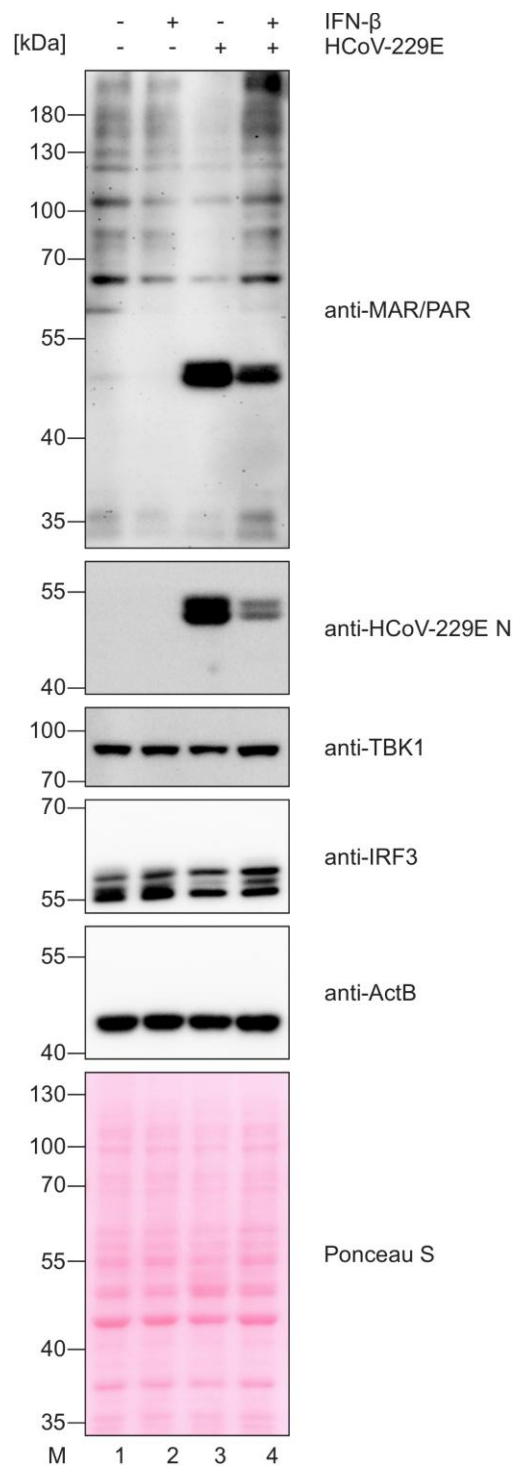


Abbildung 4-30: Proteinregulation in MRC-5-Zellen während der HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN- β . Die Zellen wurden mit IFN- β vorbehandelt (16 h) und/oder HCoV-229E-infiziert (MOI 0,1 bei 33 °C). 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert und 100 μ g Protein auf einem 9 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Als Kontrolle wurde Beta-Aktin mitgeführt. Die Detektion von ADP-ribosylierten Proteinen, HCoV-229E N-Protein, TBK1 und IRF3 erfolgte mittels HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse Immunglobulin HRP pAK).

Beta-Aktin konnte als Kontrollprotein in allen Proben mit etwa gleicher Intensität detektiert werden. MARylierte und/oder PARYlierte Proteine wurden über die gesamte Lauffront mit einem PAR-/MAR-spezifischem Antikörper detektiert. Dabei zeigte sich das schwächste Signal in infizierten Proben.

Ergebnisse

HCoV-229E-infizierte Proben wiesen ein Signal bei einer Größe von etwa 50 kDa auf, welches in IFN- β -behandelten HCoV-229E-infizierten Zellen schwächer war. Ähnliche Signale wurden für das HCoV-229E N-Protein detektiert.

Darüber hinaus wurde IRF3 und TBK1 detektiert. Für IRF3 konnten drei Signale (55-60 kDa) detektiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um nicht-phosphoryliertes, hyper- und hypophosphoryliertes IRF3 [Robitaille *et al.*, 2016] handelt. In nicht infizierten Proben konnten diese Signale mit ähnlicher Intensität erfasst werden. Infizierte MRC-5-Zellen zeigten die stärksten Signale für die kleinste (nicht-phosphoryliert) und die größte (hyperphosphoryliert) der drei Proteingrößen. Das mittlere Signal (hypophosphoryliert) wurde dabei kaum detektiert. Mit IFN- β vorbehandelte infizierte Proben zeigten ebenfalls für das kleinste bzw. das größte Signal die stärkste Intensität. Die mittlere Proteingröße wies im Vergleich mit der unbehandelten infizierten Probe eine stärkere Signalintensität auf. TBK1 konnte in allen Proben unabhängig von einer Vorbehandlung oder Infektion nachgewiesen werden. Die zugehörige Quantifizierung ist Abbildung 4-31 zu entnehmen.

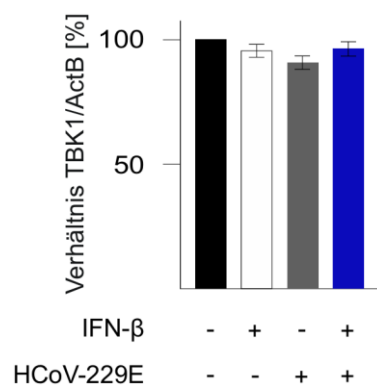


Abbildung 4-31: Quantifizierung von TBK1 in MRC-5-Zellysaten. Die Zellen wurden mit IFN- β vorbehandelt und/oder HCoV-229E-infiziert. 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert, anhand ihrer Größe aufgetrennt und mit einem TBK1-spezifischen Antikörper detektiert. Als Kontrolle wurde Beta-Aktin mitgeführt. Die Detektion erfolgte mittels HRP-konjugierter Sekundärantikörper (anti-rabbit bzw. anti-mouse Immunglobulin HRP pAK). Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchsansätzen. Mittels t-Test konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede erfasst werden.

Die Quantifizierung zeigte, dass im Vergleich mit unbehandelten nicht infizierten Zellen in infizierten Proben etwa ein Fünftel und in IFN- β -behandelten Proben etwa ein Zehntel weniger Protein detektiert werden konnte. Dabei konnte jedoch kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.4.2 Proteinregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung

Aus A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen isoliertes Gesamtprotein (100 μ g) wurde auf HCoV-229E N-Protein, MARYlierte und PARYlierte Proteine, PARP9, TBK1, IRF3, FRA1 und Beta-Aktin mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4-32). Die Zellen wurden 16 h IFN- β -vorbehandelt und/oder mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten infiziert. ADP-ribosylierte Proteine konnten in allen Proben über die gesamte Lauffront detektiert werden. Während infizierte Proben ein spezifisches Signal bei

Ergebnisse

einer Größe von ca. 50 kDa aufwiesen, konnte in IFN- β -behandelten infizierten Proben dieses Signal kaum bzw. nicht detektiert werden. Zuvor wurde in MRC-5-Zellen ebenfalls ein geringeres Signal in infizierten und IFN- β -vorbehandelten Proben beobachtet (Abbildung 4-30). Die stärkste Signalintensität konnte in den HCoV-229E_ Δ MacD- und HCoV-229E_N1357Q-infizierten Proben erfasst werden. Nach einer vorherigen IFN- β -Zugabe wurde in jenen Proben ein schwaches Signal detektiert. Die schwächsten bzw. kaum Signale wurden in behandelten HCoV-229E und HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben ermittelt. Keine Detektion erfolgte in nicht infizierten Proben. Eine weitere Bande zeigte sich bei einer Größe von ca. 70 kDa. Diese ist unabhängig von einer IFN- β -Vorbehandlung in nicht infizierten Proben stärker als in infizierten Proben. Schwächere Signale wurden für Proteine mit einer Größe von ca. 120, 140 und 180 kDa in allen Proben detektiert.

Das virale N-Protein wurde in unbehandelten infizierten Proben bei einer Größe von ca. 50 kDa detektiert. Das stärkste Signal wurde für HCoV-229E_ Δ MacD und HCoV-229E_N1357Q verzeichnet. In IFN- β -behandelten und infizierten Proben wurde kaum ein Signal detektiert. Allerdings sind die Signale in den HCoV-229E WT- oder MacD-Mutanten-infizierten Proben insbesondere in unbehandelten Proben vergleichbar mit denen der ADP-ribosylierten Proteine bei einer Größe von ca. 50 kDa.

Basierend auf den vorangegangenen Genexpressionsanalysen wurden die Proteinlevel von PARP9, FRA1, TBK1 und IRF3 analysiert. Eine deutlich stärkere Signalintensität wurde für PARP9 in IFN- β -behandelten im Vergleich mit nicht behandelten Proben detektiert. Die stärksten Signale wurden in mit HCoV-229E-MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357Q) infizierten Proben beobachtet. IFN- β -behandelte nicht infizierte und HCoV-229E-infizierte Proben wiesen etwa die gleiche Signalintensität auf. Ein schwächeres Signal wurde in allen unbehandelten Proben detektiert.

Für FRA1 konnte das stärkste Signal in IFN- β -behandelten Zellen detektiert werden. Eine ähnliche Signalintensität wurde in unbehandelten nicht infizierten Zellen nachgewiesen. Unbehandelte infizierte Zellen wiesen eine schwächere Signalintensität auf. Das geringste Signal wurde für HCoV-229E_ Δ MacD- bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierte Proben detektiert.

TBK1 konnte in allen Proben detektiert werden. Die stärkste Signalintensität wiesen IFN- β -behandelten Proben auf, welche mit einer der drei verwendeten MacD-Mutanten infiziert wurden. Das schwächste Signal wurde in unbehandelten HCoV-229E-infizierten Proben detektiert. Analog zu MRC-5-Zellen konnte keine signifikante Änderung durch IFN- β oder HCoV-229E beobachtet werden.

Der verwendete IRF3-Antikörper detektierte sowohl nicht-phosphoryliertes als auch hyper- und hypophosphoryliertes IRF3 [Robitaille *et al.*, 2016]. Für unbehandelte und nicht infizierte Proben konnte das stärkste Signal für hypophosphoryliertes IRF3 (mittlere Bande) detektiert werden. In HCoV-229E-infizierten Proben konnte eine Verringerung dieses Signals weitgehend unabhängig von der IFN- β -Vorbehandlung nachgewiesen werden. Unbehandelte Proben, welche mit

Ergebnisse

HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden zeigten hingegen ein stärkeres Signal für hyperphosphoryliertes IRF3 (oberste Bande). In IFN- β -behandelten Proben konnte im Allgemeinen ein schwächeres IRF3-Signal detektiert werden. In nicht infizierten vorbehandelten Proben wurde hypophosphoryliertes IRF3 am stärksten detektiert. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Beobachtungen in MRC-5-Zellen, in welchen in infizierten Proben weniger hypophosphoryliertes, als hyper- und nicht-phosphoryliertes (unterste Bande) IRF3 detektiert wurde. Während in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen für HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A ähnliche Signalintensitäten für nicht-phosphoryliertes, hypo- bzw. hyperphosphoryliertes IRF3 detektiert wurden, war in HCoV-229E_N1357Q vermehrt nicht-phosphoryliertes und hyperphosphoryliertes IRF3 detektierbar.

Ergebnisse

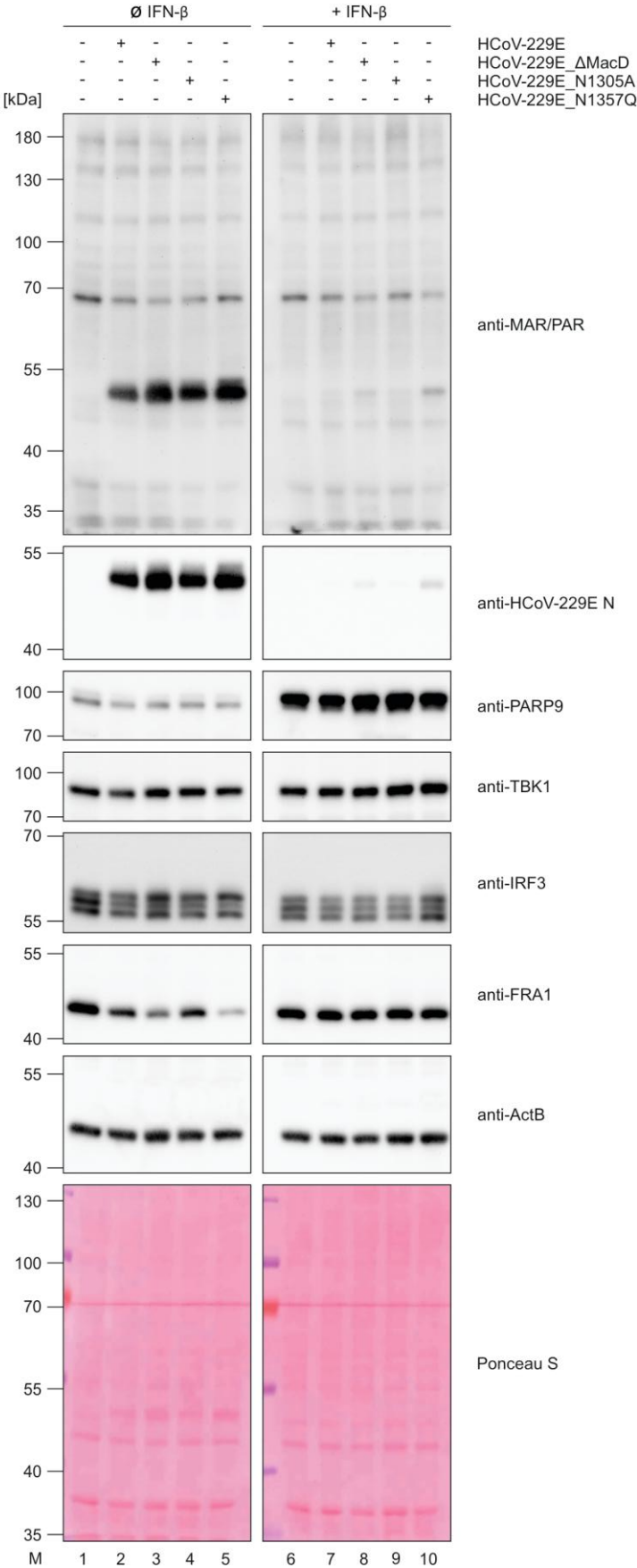


Abbildung 4-32: Proteinregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen während der Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN-β. Die Zellen wurden mit IFN-β vorbehandelt (16 h) und/oder HCoV-229E-infiziert (MOI

Ergebnisse

von 0,1 bei 33 °C). 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert. Für den Western Blot wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein auf einem 9 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte für ADP-ribosylierte Proteine, virales N-Protein, PARP9, FRA1, TBK1, IRF3 und Beta-Aktin unter Verwendung von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern.

4.5 Erzeugung von *Knockdown*- bzw. *Knockout*-Zellen

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle humaner PARPs, insbesondere von PARP7 im Zusammenhang mit der zellulären Immunantwort auf HCoV-229E WT und MacD-Mutanten, zu untersuchen. Dafür wurde versucht, die Expression von PARPs in verschiedenen Zelltypen zu verringern. Ein siRNA-basierter *Knockdown* (KD) sowie ein CRISPR/Cas9-basierter *Knockout* (KO) von PARP7 und/oder PARP9 führte zu unspezifischen Genexpressionsänderungen bzw. Wachstumsdefiziten in MRC-5-Zellen. In den nachfolgenden Kapiteln soll daher ausschließlich auf die Etablierung einer A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zelllinie eingegangen werden, bei welcher mittels CRISPR/Cas9-System lediglich ein PARP7-KD erzeugt werden konnte.

4.5.1 Validierung von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-*Knockdown*-Zellen

Die Herstellung einer PARP7-KD-Zelllinie (Kapitel 3.2) erfolgte in Kooperation mit dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie (Gießen). Jeweils drei sgRNAs (Anhang Abbildung 7-1) wurden generiert und separat transduziert. Im Anschluss erfolgte die Validierung mittels Sanger-Sequenzierung und auf Proteinebene mittels Western Blot (Abbildung 4-33). Letztere Analyse diente zur Charakterisierung der sgRNA, welche zur stärksten Verringerung des PARP7-Proteinlevels führte. Beta-Aktin wurde als Kontrolle mitgeführt. Die Sequenzierung diente zur Bestätigung einer eingefügten Leserasterverschiebung.

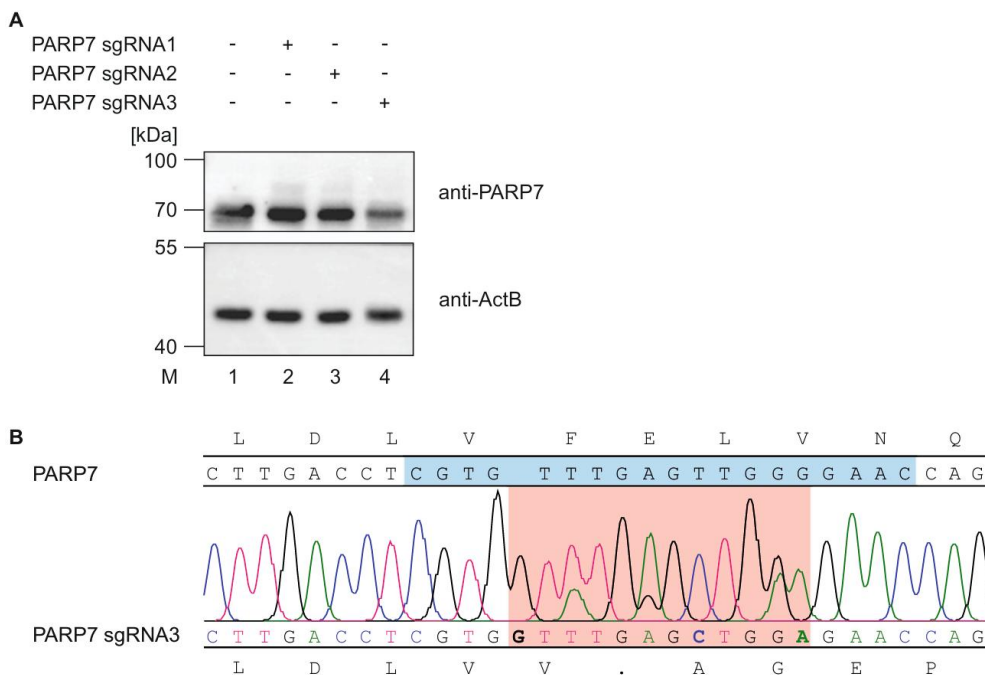


Abbildung 4-33: Validierung von PARP7-KD in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Zur Bestimmung der Proteinmenge (A) wurden jeweils 50 µg Gesamtprotein auf einem 9 % SDS-

Ergebnisse

PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von PARP7 (*rabbit Anti-PARP7 pAK*) und Beta-Aktin (*mouse beta Actin Antibody (C4)*) erfolgte mittels HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (anti-rabbit Immunglobulin HRP pAK bzw. anti-mouse Immunglobulin HRP pAK). Der Nachweis auf mRNA-Ebene nach Transduktion von PARP7 sgRNA3 erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung (B). Blau hinterlegt ist die verwendete sgRNA-Sequenz. Die Sequenzänderungen sind fett gedruckt und der zugehörige Bereich rot markiert.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des Antikörpers, der für die Detektion von PARP7 verwendet wurde, konnte keine Quantifizierung durchgeführt werden. Die Validierung von PARP7 sgRNA3 erfolgte deshalb auf mRNA-Ebene mittels Sanger-Sequenzierung. Dabei konnten Veränderungen der Zielsequenz identifiziert werden (Abbildung 4-33B), welche zu einer Leserasterverschiebung führten.

4.5.2 Wachstumsanalyse von HCoV-229E in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-PARP7-KD-Zellen

Zusätzlich zu den in Kapitel 4.1.2 dargestellten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mit IFN- β vorbehandelt und/oder mit HCoV-229E WT bzw. ausgewählten MacD-Mutanten infiziert. Die Replikationseffizienz von HCoV-229E 48 hpi wurde mittels Plaque-Assay in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung analysiert (Abbildung 4-34). HCoV-229E-infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wiesen einen Virustiter von 10^6 PFU/ml in unbehandelten bzw. 10^3 PFU/ml in IFN- β -behandelten Proben auf.

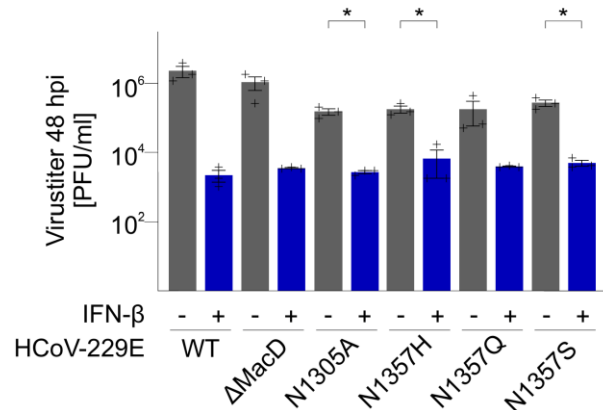


Abbildung 4-34: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD abhängig von einer vorherigen IFN- β -Behandlung. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden infiziert (grau) bzw. IFN- β -vorbehandelt (16 h) und infiziert (blau). Die Infektion erfolgte mit HCoV-229E, HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S jeweils mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Der Virustiter [PFU/ml] wurde mit Hilfe von Plaque-Assays in Huh-7-Zellen 48 hpi ermittelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchsansätzen (Mittelwert \pm SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test bestimmt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,005$). Der Vergleich erfolgte zwischen unbehandelten und IFN- β -behandelten mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten infizierten Zellen.

Mit HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wiesen Virustiter von 10^5 - 10^6 PFU/ml auf. Eine IFN- β -Vorbehandlung resultierte in geringeren Virustiter von

Ergebnisse

10³ PFU/ml. Signifikante Unterschiede durch die Behandlung wurden für HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S festgestellt. Im Vergleich mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (Abbildung 4-4B) sind die Virustiter etwas niedriger, weisen jedoch eine ähnliche Tendenz auf.

4.5.3 Differentielle Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer HCoV-229E-Infektion und/oder IFN-β-Vorbehandlung

Analog zu der Analyse von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, wurde die Genexpression von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD ausgewertet. Die Infektion erfolgte mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN-β für 16 h vor der Infektion. Es wurde eine MOI von 0,1 bei 33 °C verwendet. Das Virusinokulum wurde 1 hpi durch frisches Vollmedium ersetzt. 48 hpi wurde die RNA für die Next-Generation-Sequenzierung isoliert. Eine Übersicht der differentiellen Genregulation ist in Abbildung 4-35 dargestellt. Insgesamt wurden 2653 Gene signifikant vermehrt (Log2FoldChange ≥ 2) bzw. verringert (Log2FoldChange ≤ -2) exprimiert. Dabei konnten Unterschiede der Genregulation in den IFN-β-behandelten und nicht behandelten bzw. mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten infizierten Proben detektiert werden. In vorbehandelten Proben wurden weniger signifikant differentiell exprimierte Gene erfasst. Zusätzlich konnten Unterschiede zwischen mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD festgestellt werden. Die Heatmap in Abbildung 4-35A zeigt die größte Übereinstimmung der differentiell exprimierten Gene für HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S. Ein ähnliches Expressionsprofil wurde für HCoV-229E_ΔMacD-infizierte Proben detektiert. Für HCoV-229E_N1305A wurden weniger differentiell regulierte Gene beobachtet. Allerdings konnte insbesondere in IFN-β-behandelten Proben für HCoV-229E_N1305A die größte Übereinstimmung mit HCoV-229E nachgewiesen werden.

Etwa ein Fünftel der Gene (514) zeigte eine differentielle Expression in unbehandelten HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Davon wurden 421 Gene vermehrt exprimiert. In IFN-β-vorbehandelten Zellen wurden 122 dieser und 125 zusätzliche Gene vermehrt detektiert (Abbildung 4-35B). Übereinstimmungen hinsichtlich der Genregulation konnten auch für die verwendeten MacD-Mutanten nachgewiesen werden (Abbildung 4-35C, Abbildung 4-35D). Dabei wurden in unbehandelten Zellen 10 übereinstimmende Gene vermehrt exprimiert, während in vorbehandelten Proben 3 Gene detektiert wurden. Auffällig ist die Anzahl übereinstimmender vermehrt exprimierter Gene in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD, die mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert wurden. In unbehandelten Proben konnten 148 und in behandelten Zellen 121 übereinstimmende Gene detektiert werden. Lediglich 16 dieser Gene wurden unabhängig von der IFN-β-Behandlung erfasst.

Ergebnisse

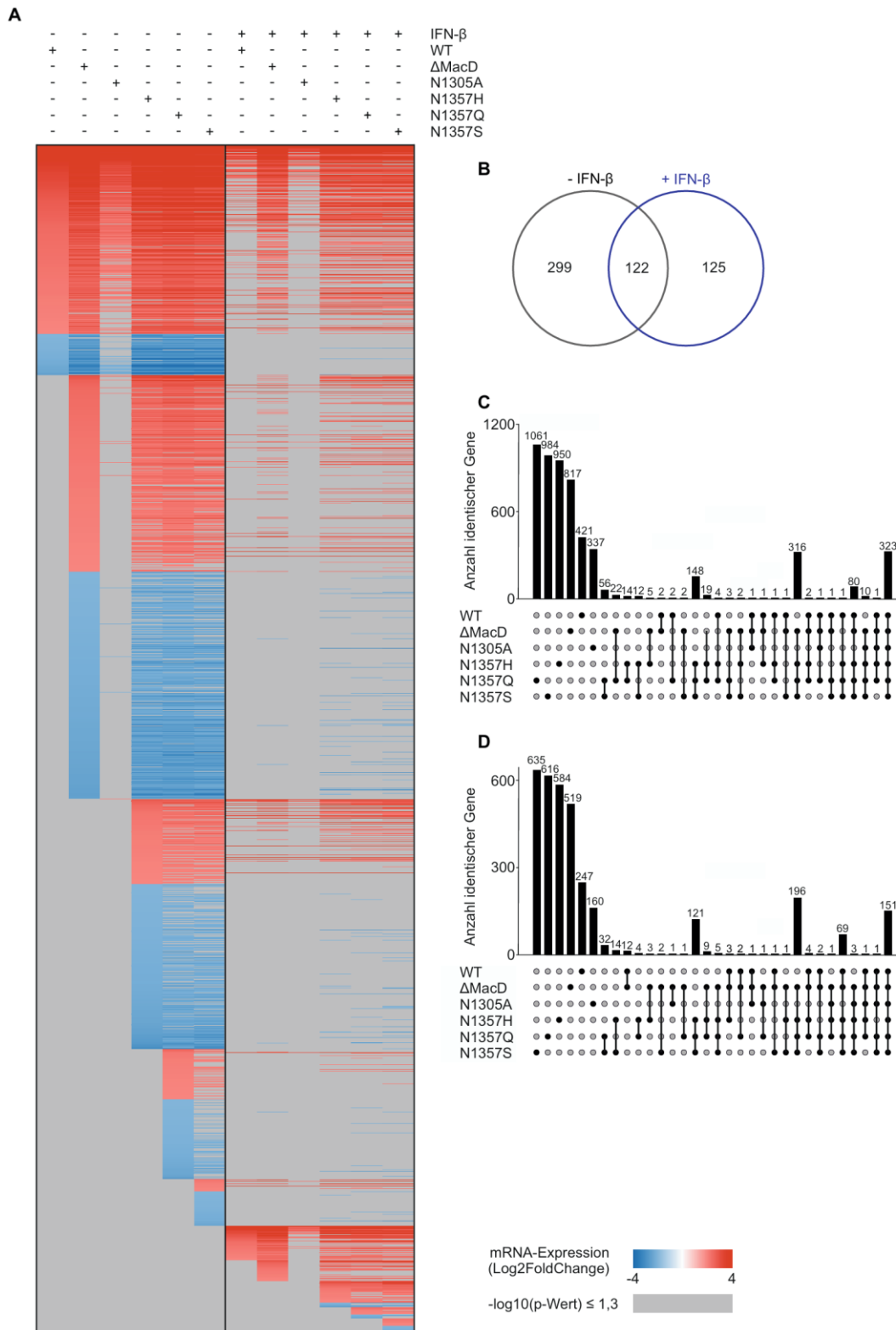


Abbildung 4-35: Genexpressionsanalyse von IFN- β -vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Die Zellen wurden 16 h mit IFN- β vorbehandelt und/oder mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert. Mittels Next-Generation-Sequenzierung wurde die Genexpression 48 hpi analysiert und ausgewählte Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und Log₂FoldChange ≥ 2 bzw. ≤ -2) als Heatmap (A) dargestellt. Nicht signifikant regulierte Gene sind grau gekennzeichnet. Eine Übereinstimmung vermehrt exprimierter Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und Log₂FoldChange ≥ 2) in HCoV-229E-infizierten Proben abhängig

Ergebnisse

von einer IFN- β -Vorbehandlung ist als Venn-Diagramm (B) abgebildet. Nach der Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten verstärkt exprimierte Gene wurden verglichen. Übereinstimmungen in nicht behandelten (C) bzw. IFN- β -behandelten (D) A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD sind als UpSet-Diagramm dargestellt.

4.5.3.1 Differentielle Genexpression von PARPs

Eine detailliertere Analyse 48 hpi der Datensätze der Next-Generation-Sequenzierung bzw. RT-qPCR ist in den nachfolgenden Kapiteln ausgeführt. Die Auswertung sollte Aufschluss über die Auswirkungen einer verringerten bzw. fehlerhaften PARP7-Genexpression auf andere PARPs und mit PARP7-assoziierte Gene geben.

Infektion mit HCoV-229E

Der NGS-Datensatz wurde analog den Daten für MRC-5-, A549^{CD13+/TMPRSS2+}- und differenzierten THP-1-Zellen analysiert. Die Darstellung erfolgte in Vulkanplots (Abbildung 4-36).

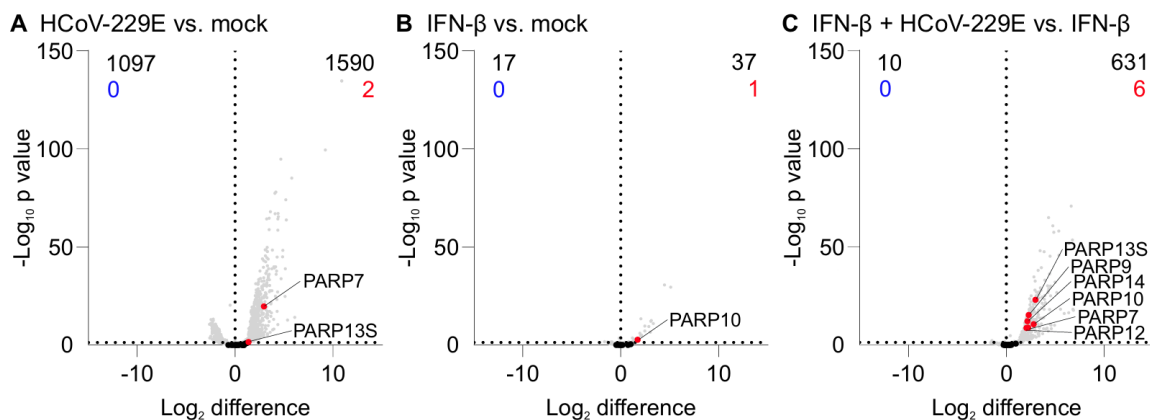


Abbildung 4-36: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind regulierte PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurde eine vermehrte Expression von PARP7 und PARP13S detektiert (Abbildung 4-36A). Darüber hinaus wurden weitere 1588 Gene vermehrt und 1097 verringert exprimiert. IFN- β -behandelte Zellen zeigten eine vermehrte PARP10-Expression (Abbildung 4-36B). Die HCoV-229E-Infektion vorbehandelter Zellen wies eine gesteigerte Regulation von 631 Genen, darunter PARP13S, PARP9, PARP14, PARP10, PARP7 und PARP12 auf (Abbildung 4-36C). Die Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene ist im Vergleich mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD (Abbildung 4-15) höher, wobei die Expression der PARPs ähnlich ist. Lediglich PARP13S wurde in infizierten Proben, PARP10 in IFN- β -behandelten und PARP7 in vorbehandelten und infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD zusätzlich detektiert.

Ergebnisse

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Mittels Next-Generation-Sequenzierung wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD nach Infektion mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357S, HCoV-229E_N1357Q) analysiert. Nachfolgend wurden die Ergebnisse für HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (Abbildung 4-37) dargestellt.

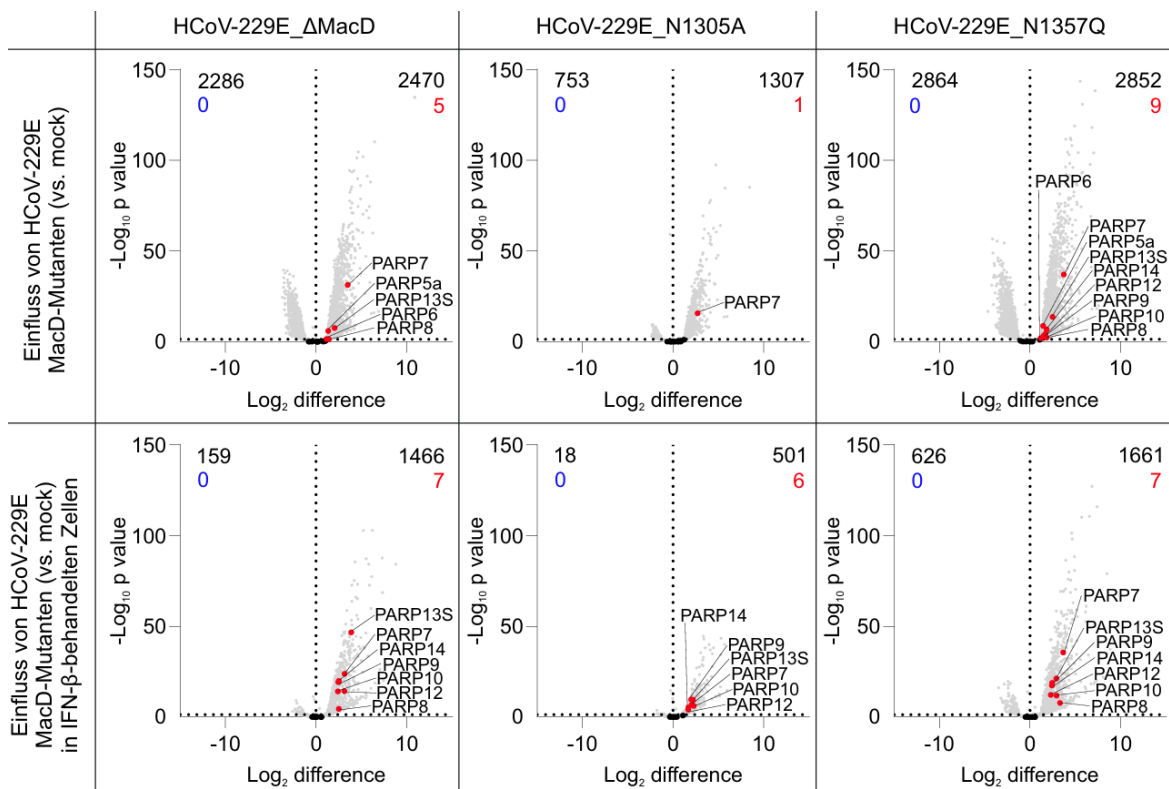


Abbildung 4-37: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die IFN-β-Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten (mock) A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter PARP-Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Die Infektionen mit den drei MacD-Mutanten zeigt deutliche Unterschiede auf. In unbehandelten Zellen, welche mit HCoV-229E_ΔMacD infiziert wurden, zeigt sich eine gesteigerte Expression von PARP7, PARP5a, PARP13S, PARP6 und PARP8. Insgesamt wurden jeweils mehr als 2200 Gene verringert und vermehrt exprimiert. Eine ähnliche Genregulation wurde in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Proben detektiert. Zusätzlich wurden PARP14, PARP12, PARP9 und PARP10 vermehrt nachgewiesen. Deutlich weniger Regulation wurde in Zellen detektiert, welche mit HCoV-229E_N1305A infiziert wurden. Neben 1306 vermehrt exprimierten Genen konnte ausschließlich PARP7 vermehrt detektiert werden. In vorbehandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden insbesondere in HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben eine Vielzahl von

Ergebnisse

PARP-mRNAs vermehrt detektiert. Dazu zählen PARP9, PARP13S, PARP7, PARP14, PARP10 und PARP12 und weitere 495 Gene. Diese PARPs wurden auch in HCoV-229E_ΔMacD- bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen vermehrt erfasst. Zusätzlich konnte in beiden Proben PARP8 vermehrt detektiert werden. Ein Vergleich mit (vorbehandelten) HCoV-229E-infizierten Zellen ist dem Anhang (Abbildung 7-14) zu entnehmen. Während in nicht behandelten Zellen keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden konnten, zeigte sich eine vermehrte Expression von PARP8 in HCoV-229E_ΔMacD-infizierten bzw. PARP8 und PARP7 in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Proben. Die Gesamtanzahl signifikant regulierter Gene, darunter auch PARPs, ist in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD höher als in Zellen ohne PARP7-KD (Abbildung 4-16).

Zusätzlich wurde RNA aus vorbehandelten und/oder infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mittels RT-qPCR und NGS insbesondere auf die PARP7-Expression gegenübergestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-38 dargestellt.

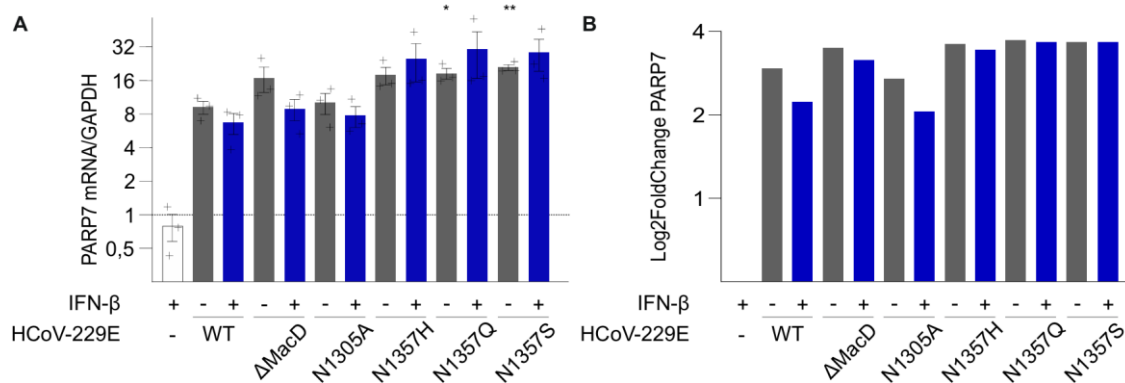


Abbildung 4-38: PARP7-Expression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung und der Infektion mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten. Eine IFN-β-Behandlung erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und mittels RT-qPCR (A) bzw. NGS (B) analysiert. Dargestellt sind jeweils drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM). Eine signifikante Expression in RT-qPCR-Daten wurden mittels t-Test ermittelt (*p ≤ 0,05, **p ≤ 0,005). Für den NGS-Datensatz wurden ausschließlich signifikante Log2FoldChange aufgetragen (-log₁₀(p-Wert) ≥ 1,3).

Mittels RT-qPCR (Abbildung 4-38A) wurde eine verringerte Expression von PARP7 in IFN-β-behandelten nicht infizierten Zellen ermittelt. In allen infizierten Proben wurde unabhängig von der Vorbehandlung mit IFN-β eine Zunahme der PARP7-Expression detektiert. Dabei zeigte die Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A eine geringere Expression von 6-16 *FoldChange* als in HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- und HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen (> 16 *FoldChange*). Zusätzlich wurde in Mutanten an Position N1357 in vorbehandelten Proben mehr PARP7 detektiert als in unbehandelten Proben. Weniger Expression wurde in vorbehandelten Zellen, welche mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A infiziert wurden, detektiert. Sowohl in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit und ohne PARP7-KD konnte eine erhöhte PARP7-Expression detektiert werden (Abbildung 4-17, Abbildung 4-38A). Aus dem NGS-Datensatz (Abbildung 4-38B) wurden ausschließlich signifikante PARP7-Regulationen aufgetragen. Eine signifikante differentielle Expression konnte für alle

Ergebnisse

infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD erfasst werden. Vorbehandelte Proben zeigten keine signifikante differentielle PARP7-Expression. Die Genexpression nach Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A wies Unterschiede nach der IFN-β-Behandlung auf. Die Expression ist in vorbehandelten Zellen geringer als in unbehandelten Zellen. HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- oder HCoV-229E_N1357S-infizierte Zellen zeigten ohne und mit IFN-β-Vorbehandlung vergleichbare PARP7-Expressionslevel mit einem *Log2FoldChange* von rund 4.

4.5.3.2 Differentielle Genexpression von PARP7-assoziierten Genen

Zusätzlich zu PARPs wurde die Genexpression von PARP7-assoziierten Genen analysiert. Eine signifikante Regulation von TBK1, FRA1, RIG-I, MDA5, MAVS, p50, p65, IRF1, IRF3, IRF7, NEMO, IKKα, IKKβ, IKKε, IKKκ, DTX3L, IFNAR1, IFNAR2, IFNLR1 und IFN-α Subtypen, IFN-β, IFN-λ Subtypen wurde in den nachfolgenden Vulkanplots farblich hervorgehoben. Diese Auswertung sollte Aufschluss über das Zusammenspiel von PARP7 und PARP7-assoziierten Genen, insbesondere bei einer durch PARP7-KD veränderten Expression, geben.

Infektion mit HCoV-229E

Der Einfluss der HCoV-229E-Infektion von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD auf die Genexpression von PARP7-assoziierten Genen wurde abhängig von einer IFN-β-Vorbehandlung analysiert. Zusätzlich wurde die Regulation durch die IFN-β-Stimulation detektiert. Die Analysen sind in Abbildung 4-39 dargestellt.

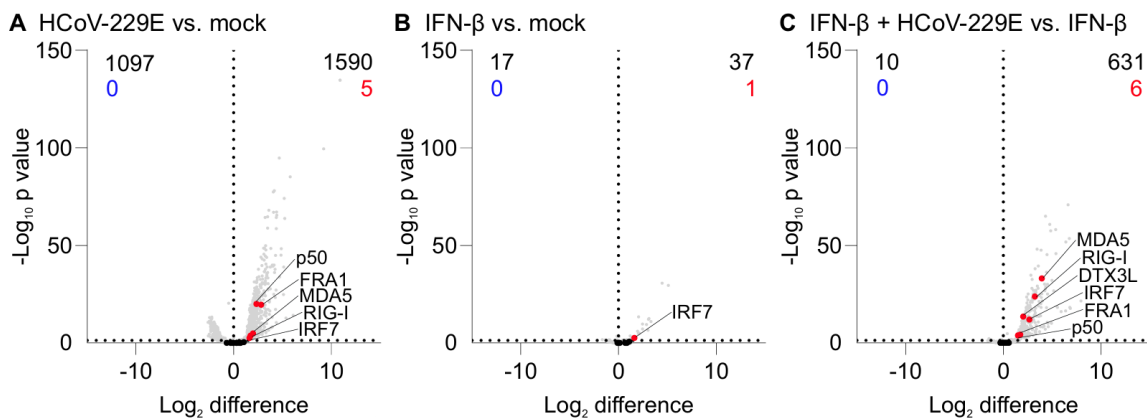


Abbildung 4-39: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiel regulierten PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN-β-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN-β-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Ergebnisse

Infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD zeigten eine vermehrte Expression von 1590 Genen, wie beispielsweise p50, FRA1, MDA5, RIG-I und IRF7. Parallel dazu wurden 1097 mRNAs geringer exprimiert. Vorbehandelte Zellen wiesen 17 verringert und 37 vermehrt exprimierte Gene auf. Von den ausgewählten Genen wurde IRF7 vermehrt detektiert. Nach der Infektion IFN- β -vorbehandelter Zellen wurden 10 Gene verringert und 631 Gene vermehrt detektiert. Dabei wurden MDA5, RIG-I, DTX3L, IRF7, FRA1 und p50 vermehrt nachgewiesen. Im Gegensatz zu A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD (Abbildung 4-24) wurden zusätzliche Gene vermehrt exprimiert.

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Neben HCoV-229E-infizierten Proben wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD auch nach der Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten (HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q) abhängig von einer IFN- β -Vorbehandlung ausgewertet. Die zugehörigen Vulkanplots sind in Abbildung 4-40 dargestellt.

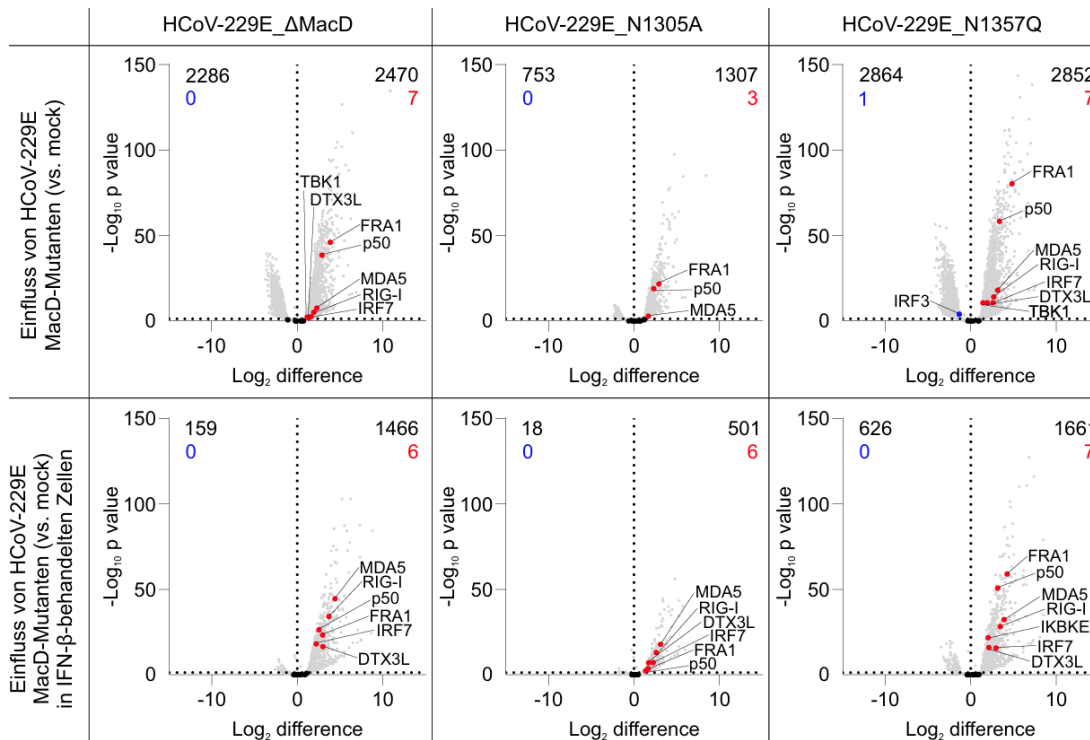


Abbildung 4-40: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind PARP7-assoziierte Gene für die Infektion mit HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die IFN- β -Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich IFN- β -behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Ergebnisse

In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD, welche mit HCoV-229E-MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q) infiziert wurden, konnten p50 und FRA1 in allen unbehandelten und IFN-β-behandelten Proben detektiert werden. In unbehandelten Proben wurde zusätzlich MDA5 in allen infizierten Proben vermehrt exprimiert. Die geringste Regulation wurde in HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen nachgewiesen. Rund 1300 Gene wurden vermehrt und 753 Gene verringert exprimiert. Im Vergleich damit zeigten Proben, welche mit HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1357Q infiziert wurden eine Regulation mehr als doppelt so vieler Gene. In beiden Proben wurden jeweils mehr als 2200 Gene vermehrt bzw. verringert detektiert. HCoV-229E_ΔMacD- bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen wiesen neben FRA1, p50 und MDA5, auch RIG-I, IRF7, TBK1 und DTX3L vermehrt auf. IRF3 wurde verringert in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen detektiert. Nach der Vorbehandlung der Zellen wurden weniger regulierte Gene erfasst. Behandelte und HCoV-229E_N1305A-infizierte Proben zeigten eine gesteigerte Expression von MDA5, RIG-I, DTX3L, IRF7, FRA1 und p50. Insgesamt wurden 501 Gene vermehrt bzw. 18 Gene verringert detektiert. Eine vermehrte Regulation von Genen wurde in den beiden anderen MacD-Mutanten beobachtet. Dabei wurden jeweils mehr als 1400 Gene vermehrt detektiert. Dazu zählten MDA5, RIG-I, p50, FRA1, IRF7 und DTX3L in HCoV-229E_ΔMacD-infizierten bzw. diese mRNAs und IKBKE in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen. Im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen wurden signifikante Unterschiede in der Genregulation für HCoV-229E_N1357Q-infizierte Proben erfasst (Anhang Abbildung 7-15). Eine vermehrte Expression der ausgewählten Gene wurde in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD im Vergleich mit Zellen ohne PARP7-KD (Abbildung 4-25) beobachtet.

4.5.4 Proteinregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-Knockdown

Um Abweichungen bzw. Übereinstimmungen auf Proteinebene zu analysieren, wurden die Level von ADP-ribosylierten Proteinen, viralem HCoV-229E-N-Protein, PARP9-, FRA1-, IRF3- und TBK1-Protein in Lysaten von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD detektiert (Abbildung 4-41). Zusätzlich wurde der Einfluss einer IFN-β-Vorbehandlung näher betrachtet. Als Kontrollprotein wurde Beta-Aktin in allen Proben nachgewiesen. ADP-ribosylierte Proteine wurden mit einem mono- und poly-ADP-Ribosylierung-spezifischen Antikörper detektiert. Die Signalintensität ist in IFN-β-vorbehandelten Zellen geringer als in unbehandelten Zellen. Auffällig sind wie auch in Zellen ohne PARP7-KD zwei Banden bei einer Größe von ca. 70 und 50 kDa. Das größere dieser beiden Proteine konnte in infiziertem und nicht infiziertem Probenmaterial detektiert werden, wobei die stärkste Signalintensität für HCoV-229E-infizierte Zellen ohne IFN-β-Vorbehandlung bzw. behandelte HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen detektiert wurde. Die ADP-Ribosylierung eines bzw. mehrerer Proteine bei 50 kDa konnte ausschließlich in infizierten Proben gezeigt werden. Behandelte Proben wiesen im Vergleich mit unbehandelten Proben ein schwächeres Signal auf. Diese Signale sind vergleichbar mit denen der Detektion des viralen N-Proteins.

Die Detektion von PARP9 zeigte kein Signal in unbehandelten infizierten und nicht infizierten Proben. In IFN-β-vorbehandelten nicht infizierten bzw. HCoV-229E-infizierten Zellen konnte ein Signal bei einer Größe von ca. 100 kDa erfasst werden. Ein stärkeres Signal wurde für IFN-β-

Ergebnisse

behandelte und mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q infizierten Proben detektiert. Die Signalintensität von vorbehandelten HCoV-229E-infizierten Proben war im Vergleich mit nicht infizierten Zellen etwas stärker. Im Allgemeinen kann festgehalten werden, dass das stärkste Signal für PARP9 in IFN-β-behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD detektiert wurde (Abbildung 4-32, Abbildung 4-41).

Darüber hinaus wurden FRA1-, TBK1- und IRF3-Proteinlevel analysiert. Ein Signal für FRA1 konnte bei einer Größe von etwa 42-45 kDa detektiert werden. Die stärkste Detektion erfolgte in vorbehandelten Proben unabhängig von einer nachfolgenden Infektion. Unbehandelte nicht infizierte Proben wiesen ein schwächeres Signal auf. Die geringste Signalintensität wurde in unbehandelten mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten Proben detektiert.

TBK1-Protein konnte in unbehandelten nicht infizierten bzw. HCoV-229E-infizierten Proben verglichen mit allen anderen Proben verringert detektiert werden. Allerdings ist die Signalintensität von Beta-Aktin in diesen beiden Proben ebenfalls etwas geringer. In behandelten Proben ist die Signalintensität stärker als in unbehandelten Proben. Ein ähnlicher Trend ließ sich auch für IRF3 erkennen. Im Vergleich mit behandelten Proben wurden geringere Signalintensitäten für nicht-phosphoryliertes IRF3 in unbehandelten Proben nachgewiesen. In IFN-β-vorbehandelten Zellen zeigte sich eine höhere Signalintensität für IRF3 im nicht-phosphorylierten Zustand, obwohl auch Signale für hypo- und hyperphosphoryliertes IRF3 detektiert werden konnten.

Verglichen mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD erschienen die Proteinlevel für TBK1 und FRA1 ähnlich. Im Gegensatz dazu wurde in Zellen ohne PARP7-KD im Allgemeinen weniger Signal für IRF3 detektiert, während Zellen mit PARP7-KD insbesondere in IFN-β-behandelten (infizierten) Proben mehr nicht-phosphoryliertes als hyper- bzw. hypophosphoryliertes IRF3 detektiert wurde (Abbildung 4-32, Abbildung 4-41).

Ergebnisse

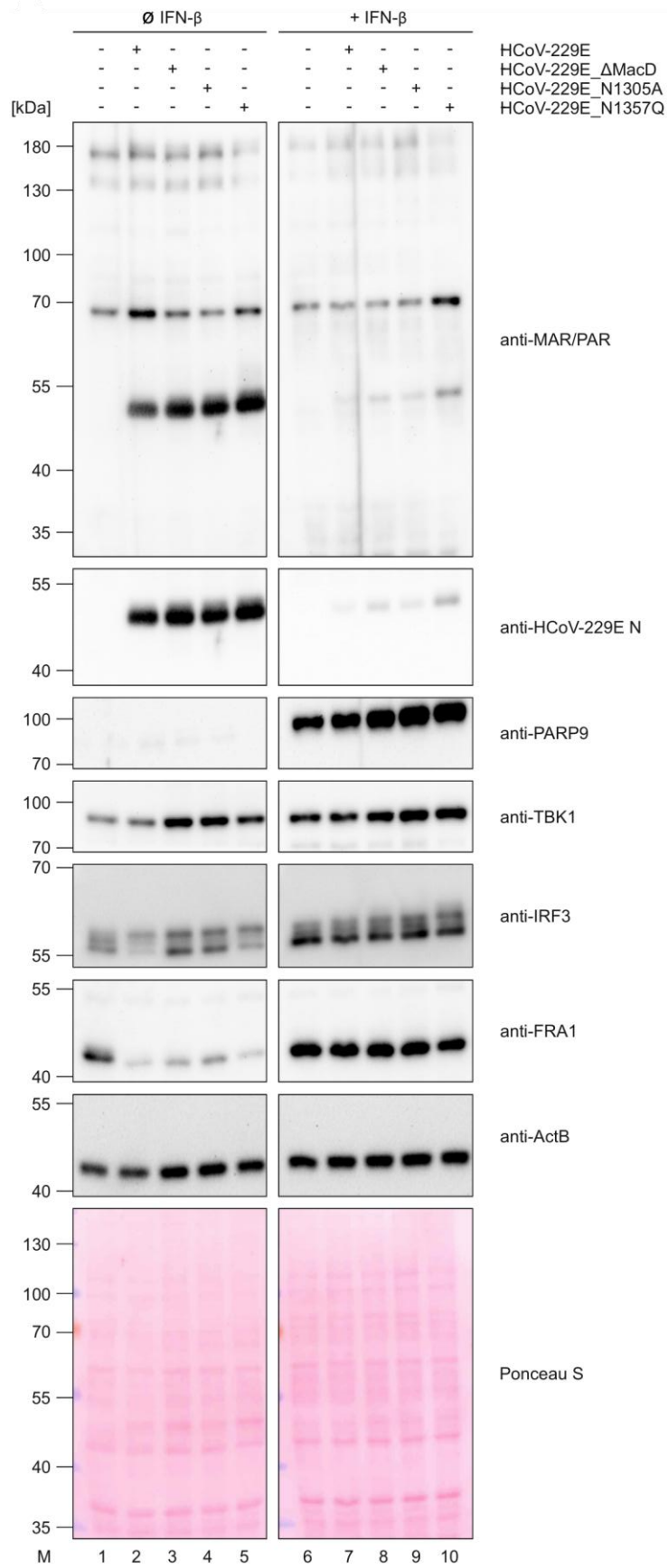


Abbildung 4-41: Proteinregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD während der Infektion mit HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit IFN-β. Die Zellen wurden mit IFN-β vorbehandelt (16 h) und/oder

Ergebnisse

HCoV-229E-infiziert (MOI 0,1). 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert. Für den Western Blot wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein auf einem 9 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte für ADP-ribosylierte Proteine, virales N-Protein, PARP9, TBK1, IRF3, FRA1 und Beta-Aktin unter Verwendung von HRP-konjugierten Sekundärantikörper.

Auf Proteinebene konnte unter anderem eine Veränderung der IRF3-Phosphorylierung abhängig von einem PARP7-KD und/oder einer IFN-β-Vorbehandlung nachgewiesen werden. Um deren Auswirkungen auf die IRF3-induzierte Immunantwort zu analysieren wurde die IFN-Freisetzung im Zellkulturüberstand gemessen.

4.6 Interferonfreisetzung in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder HCoV-229E-Infektion

Die IFN-β-Konzentration wurde in Zellkulturüberständen von IFN-β-vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (mit bzw. ohne PARP7-KD) 48 hpi analysiert, um mögliche Unterschiede in der IFN-vermittelten Immunantwort zu identifizieren. Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1 für HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S bei 33 °C. Die Freisetzung von IFN-β wurde mittels ELISA DuoSet detektiert (Kapitel 3.5.6). In MRC-5-Zellen konnte keine IFN-β-Freisetzung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich für A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD welche IFN-β-vorbehandelt und mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden, konnte IFN-β im Überstand nachgewiesen werden. In Abbildung 4-42A ist die IFN-β-Konzentration dargestellt.

Ergebnisse

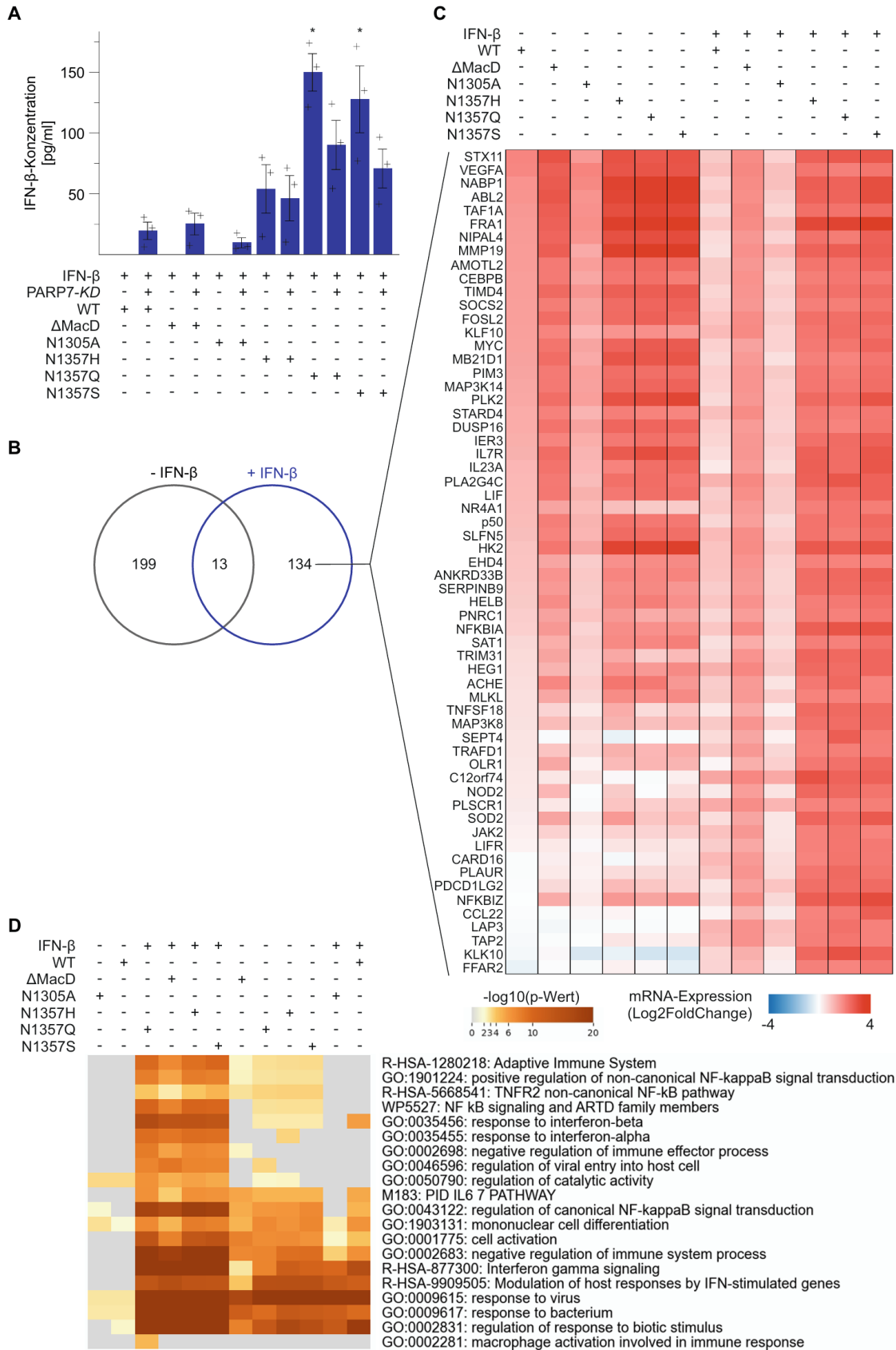


Abbildung 4-42: IFN-β-Freisetzung und Genexpressionsanalyse von IFN-β-vorbehandelten und HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Die A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD wurden 16 h mit IFN-β vorbehandelt und anschließend mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S)

Ergebnisse

mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C infiziert. Die IFN- β -Konzentration im Zellkulturüberstand wurde 48 hpi analysiert (A). Dargestellt sind drei unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert \pm SEM). Statistisch signifikante Unterschiede wurden mittels t-Test kalkuliert und für den Vergleich von mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nachgewiesen (* $p \leq 0,05$). Für das Venn-Diagramm (B) wurde die Anzahl vermehrt exprimierter ISGs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert wurden, ohne (grau) bzw. mit (blau) IFN- β -Behandlung verwendet, um Unterschiede der Genexpression zu analysieren (p -Wert $\geq 1,3$ und Log2FoldChange ≥ 2). Eine Übersicht der in IFN- β -behandelten und HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- oder HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen vermehrt exprimierten ISGs ist als Heatmap (C) dargestellt. Signalwege die in IFN- β -behandelten bzw. nicht behandelten infizierten Proben reguliert wurden sind als Heatmap (D) aufgeführt.

Auffällig ist, dass in Zellen mit PARP7-KD nach der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A eine IFN- β -Konzentration unter 30 pg/ml detektiert werden konnte, wobei in Zellen ohne PARP7-KD kein IFN- β nachgewiesen werden konnte. Nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S konnte in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit oder ohne PARP7-KD IFN- β im Überstand nachgewiesen werden. Die geringste Menge von etwa 50 pg/ml wurde nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H gemessen. Eine Konzentration von 125 bzw. 150 pg/ml wurde in vorbehandelten HCoV-229E_N1357S- bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen verzeichnet. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wiesen für diese Mutanten jeweils eine geringere IFN- β -Konzentration im Überstand auf.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (IFN- β -behandelten) Kontrollen näher betrachtet. Zunächst wurden vermehrt exprimierte ISGs identifiziert, die spezifisch für diese drei MacD-Mutanten sind (Abbildung 4-42B). In unbehandelten Zellen wurden 212 Gene, darunter 42 ISGs und in IFN- β -behandelten Zellen 147 Gene (64 ISGs) vermehrt exprimiert. Die Einordnung der Gene als ISGs erfolgte anhand anderer Studien [OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]. Alle Gene wiesen einen p -Wert $\geq 1,3$ und Log2FoldChange ≥ 2 auf. 61 ISGs und weitere 73 Gene wurden ausschließlich in vorbehandelten Zellen vermehrt exprimiert. In einer Heatmap (Abbildung 4-42C) wurde die Expression dieser ISGs anhand einer Farbkodierung unabhängig der zugehörigen p -Werte dargestellt. Ähnliche Expressionsmuster ließen sich für HCoV-229E und HCoV-229E_N1305A, sowie HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S erfassen. HCoV-229E_ΔMacD zeigte mehr Übereinstimmung mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S, als mit HCoV-229E oder HCoV-229E_N1305A. Für alle Infektionen wurde eine verringerte Expression nach IFN- β -Vorbehandlung beobachtet. Zusätzlich wurde eine Signalweg-Analyse durchgeführt. Dabei wurden verstärkt regulierte Gene (Log2FoldChange ≥ 2 , p -Wert $\geq 1,3$) als Input verwendet. Die innerhalb der analysierten Proben am stärksten abweichenden 20 Signalwege wurden in Abbildung 4-42D dargestellt. Die meisten dieser Signalwege, wie beispielsweise die Regulation des adaptiven Immunsystems (R-HSA-1280218) oder die Reaktion auf Zytokine (GO:0035456, GO:0035455, M183, R-HSA-877300, R-HSA-9909505) können mit der (antiviralen) Immunantwort assoziiert werden. Auffällig ist, dass die aufgelisteten Signalwege in IFN- β -vorbehandelten und mit

Ergebnisse

HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infizierten Proben reguliert wurden, während keine oder eine geringe Regulation in diesen Proben für die Aktivierung von Makrophagen als Teil der Immunantwort (GO:0002281) erfolgte. Nach der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S oder einer IFN-β-Behandlung mit anschließender HCoV-229E- oder HCoV-229E_N1305A-Infektion konnte eine geringere signifikante oder keine Signalwegregulation (z. Bsp.: R-HSA-1280218, GO:0035456, GO:0035455) erfasst werden. Unbehandelte mit HCoV-229E oder HCoV-229E_N1305A infizierte Proben wiesen die geringste Anzahl an regulierten Signalwegen auf. Interessanterweise wurde insbesondere in vorbehandelten und mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen der Signalweg WP5527 (*NF-κB signaling and ARTD family members*) am stärksten reguliert. Dieser wurde auch in unbehandelten Proben, welche mit den gleichen MacD-Mutanten infiziert wurden, und in IFN-β-behandelten HCoV-229E_ΔMacD-infizierten Zellen reguliert. Die Rolle der einzelnen PARPs innerhalb dieses Signalweges ist im Abbildung 5-1 dargestellt.

4.7 Analyse des PARP7-Inhibitors RBN-2397 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Um die Rolle von PARP7 insbesondere während der Infektion näher zu betrachten, wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit dem PARP7-Inhibitor RBN-2397 (PARP7i, Atamparib) inkubiert. Dieser Inhibitor bindet in der NAD⁺-Bindungstasche und blockiert dadurch die ADP-Ribosylierung für die NAD⁺ benötigt wird [Chambon *et al.*, 1963, Gozgit *et al.*, 2021]. Die eingesetzte Konzentration von 7,8 nM wurde mittels MTT-Assay für A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD (Anhang Abbildung 7-16) und basierend auf publizierten Daten [Gu *et al.*, 2023] festgelegt. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD wurden mit RBN-2397 24 h vor der Infektion behandelt. Im Anschluss wurden die Virustiter 48 hpi mittels Plaque-Assay für mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierte Zellen bestimmt (Abbildung 4-43).

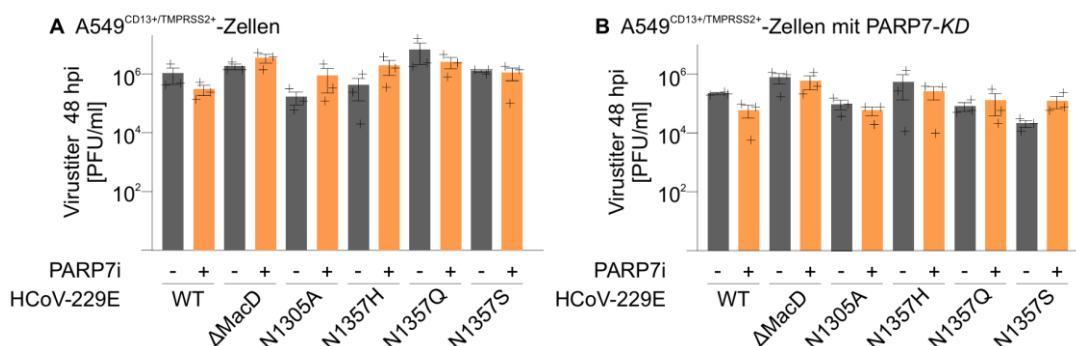


Abbildung 4-43: Replikation von HCoV-229E WT und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (A) und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD (B). Die Zellen wurden mit HCoV-229E WT oder MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) infiziert (grau) oder 24 h mit 7,8 nM PARP7i vorbehandelt und infiziert (orange). Der Zellkulturüberstand wurde 48 hpi auf Huh-7-Zellen titriert. Dargestellt sind drei

Ergebnisse

unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert \pm SEM). Mittels t-Test konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede ermittelt werden.

In beiden Zelllinien konnten keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung mit dem PARP7-Inhibitor beobachtet werden. Auffällig ist, dass die Virustiter in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD etwa eine log-Stufe geringer sind als in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Letztere zeigten ähnliche Virustiter wie RBN-2397-behandelte MRC-5-Zellen (Anhang Abbildung 7-17).

Mögliche Auswirkungen des PARP7-Inhibitors auf die Genexpression während der HCoV-229E-Infektion wurden in RBN-2397-behandelten und mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD mittels NGS analysiert. Dabei sollte überprüft werden, ob andere PARPs die Funktion von inhibiertem PARP7 übernehmen und/oder die Immunantwort reguliert wird. Die Expression von PARPs und die der zuvor beschriebenen PARP7-assoziierten Gene wurde näher betrachtet.

Infektion mit HCoV-229E

A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zeigten eine Regulation von 11 verringert bzw. 13 vermehrt exprimierten Genen in RBN-2397-behandelten Zellen (Abbildung 4-44B). Während infizierte Proben eine verstärkte Expression von PARP7 aufwiesen, wurde in vorbehandelten infizierten Zellen zusätzlich PARP10, PARP9 und PARP8 vermehrt detektiert. Insgesamt wurden 744 Gene vermehrt und 19 Gene verringert nachgewiesen (Abbildung 4-44C).

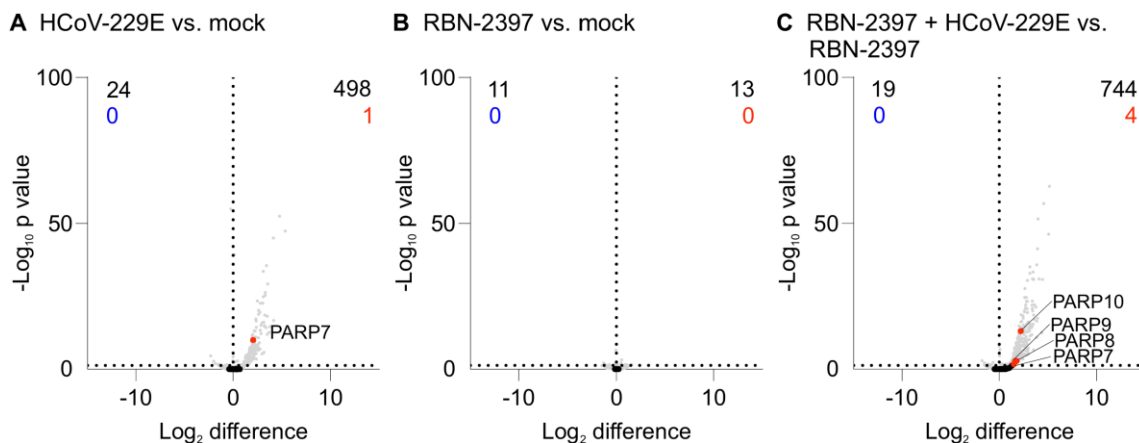


Abbildung 4-44: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die RBN-2397-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich RBN-2397-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD konnte keine Regulation von PARPs durch die RBN-2397-Behandlung festgestellt werden (Abbildung 4-45B). In infizierten Zellen mit PARP7-KD wurde eine größere Anzahl regulierter Gene detektiert. Während in HCoV-229E-infizierten Zellen

Ergebnisse

eine vermehrte Expression von PARP7 und PARP13S detektiert wurde (Abbildung 4-45A), konnte in vorbehandelten und infizierten Zellen zusätzlich eine gesteigerte PARP9-Expression beobachtet werden (Abbildung 4-45C).

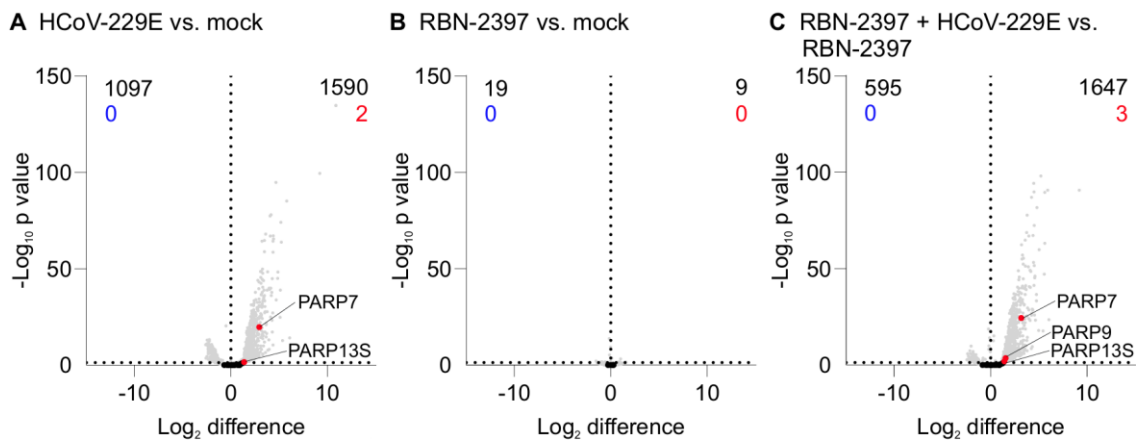


Abbildung 4-45: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die RBN-2397-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich RBN-2397-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Zusätzlich zu regulierten PARPs wurde außerdem die Regulation von PARP7-assoziierten Genen näher betrachtet, welche möglicherweise durch eine gehemmte PARP7-induzierter ADP-Ribosylierung beeinträchtigt sein könnten. Keine Regulation dieser Gene konnte in RBN-2397-behandelten nicht infizierten Zellen detektiert werden (Abbildung 4-46B). Nach einer zusätzlichen HCoV-229E-Infektion wurde eine gesteigerte Expression von MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L detektiert (Abbildung 4-46C). Eine gesteigerte FRA1- und IRF7-Expression konnte in unbehandelten HCoV-229E-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-46A).

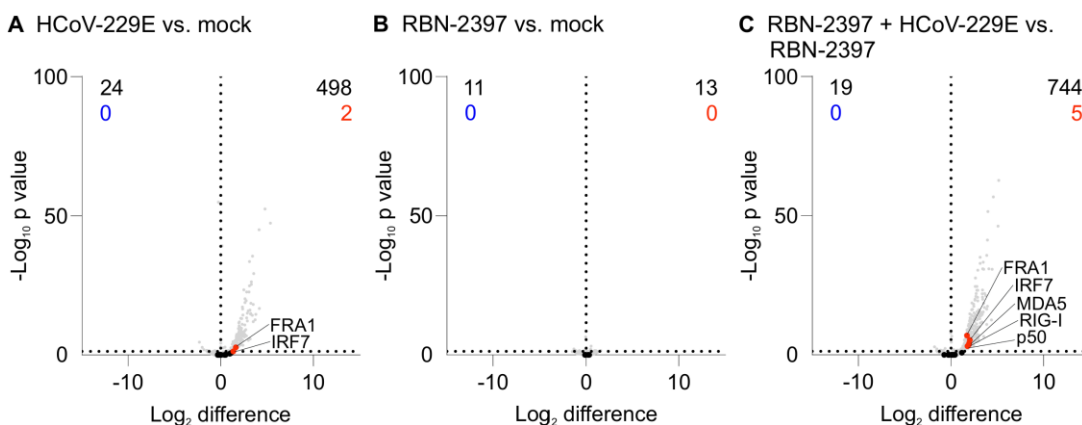


Abbildung 4-46: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Gene. In den

Ergebnisse

Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die RBN-2397-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich RBN-2397-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Die Analyse wurde analog für A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD durchgeführt. Dabei konnte ebenfalls keine Regulation der ausgewählten Gene nach der Vorbehandlung erfasst werden (Abbildung 4-47B). In RBN-2397-behandelten und HCoV-229E-infizierten Zellen konnte eine vermehrte Genexpression von FRA1, p50, MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L detektiert werden (Abbildung 4-47C).

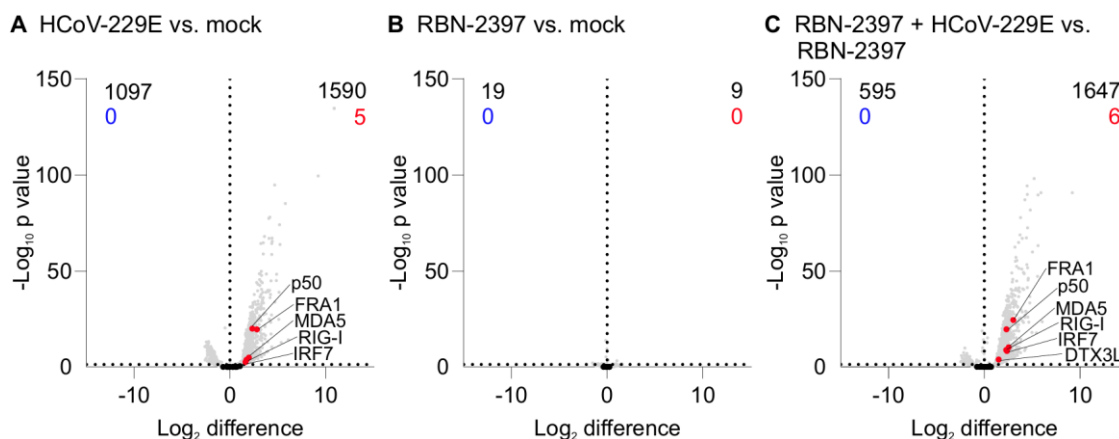


Abbildung 4-47: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E in unbehandelten Zellen verglichen mit nicht infizierten (mock) Proben (A), die Regulation durch die RBN-2397-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten (mock) Zellen (B) und der Vergleich RBN-2397-behandelter Zellen ohne bzw. mit anschließender Infektion (C) abgebildet. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Der Vergleich von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD zeigte eine Übereinstimmung vereinzelter Regulationen von PARPs und PARP7-assoziierten Genen. In Zellen mit PARP7-KD wurden zusätzliche Gene, insbesondere PARP7-assoziierte Gene, vermehrt exprimiert. Auffällig ist darüber hinaus, dass in RBN-2397-behandelten Proben weder PARPs noch PARP7-assoziierte Gene differentiell reguliert wurden.

Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten

Neben der Infektion mit HCoV-229E wurden außerdem Proben analysiert, welche mit HCoV-229E_{ΔMacD}, HCoV-229E_{N1305A} oder HCoV-229E_{N1357Q} infiziert wurden. Die Genexpressionsanalyse sollte weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiel der viralen MacD und PARP7 während der HCoV-229E-Infektion geben. Eine gesteigerte Genexpression konnte für PARP7, in vorbehandelten und nicht behandelten Zellen, welche mit HCoV-229E_{ΔMacD},

Ergebnisse

HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q infiziert wurden, detektiert werden (Abbildung 4-48).

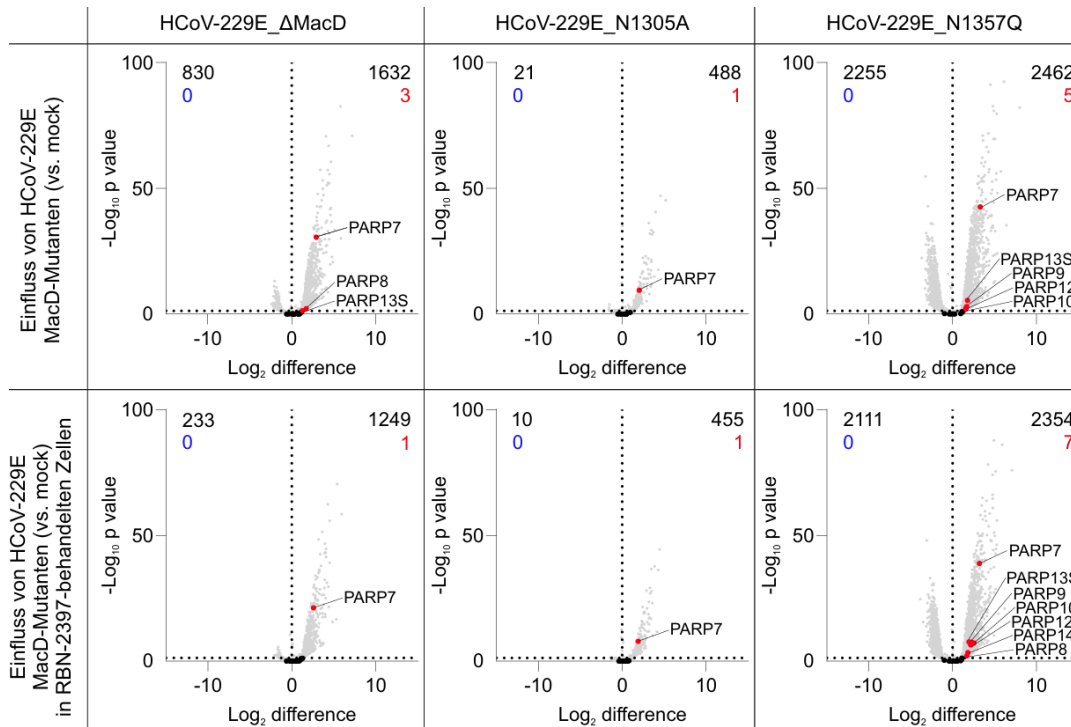


Abbildung 4-48: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die differentiell regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die RBN-2397-Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen exprimierten in vorbehandelten Zellen zusätzlich PARP13S, PARP9, PARP10, PARP12, PARP14 und PARP8. Diese wurden mit Ausnahme von PARP14 und PARP8 ebenfalls in infizierten nicht behandelten Proben detektiert. Der Vergleich mit HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ist dem Anhang zu entnehmen (Anhang Abbildung 7-18).

Eine vermehrte Expression konnte auch für PARP7-assoziierte Gene detektiert werden (Abbildung 4-49). In HCoV-229E_ΔMacD-infizierten Zellen wurde eine gesteigerte Expression von MDA5, RIG-I, IRF7, p50, FRA1 und DTX3L detektiert. Mit Ausnahme von DTX3L wurden diese Gene auch in unbehandelten infizierten Zellen vermehrt detektiert. MDA5, IRF7, RIG-I und DTX3L wurden vermehrt erfasst in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit HCoV-229E_N1305A infiziert wurden. In unbehandelten Zellen konnte FRA1 und p50 vermehrt detektiert werden. Während in RBN-2397-behandelten und HCoV-229E_ΔMacD- oder HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen insgesamt 1482 bzw. 465 Gene differentiell reguliert wurden, konnten in behandelten HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen 2111 vermehrt und 2354 verringert exprimierte Gene detektiert werden. Eine gesteigerte Expression wurde unter anderem für MDA5, RIG-I, FRA1, IRF7,

Ergebnisse

p50, DTX3L und IKBKE detektiert. In unbehandelten Zellen konnte eine vermehrte Expression von TBK1 statt IKBKE bzw. eine verringerte IRF3-Expression festgestellt werden.

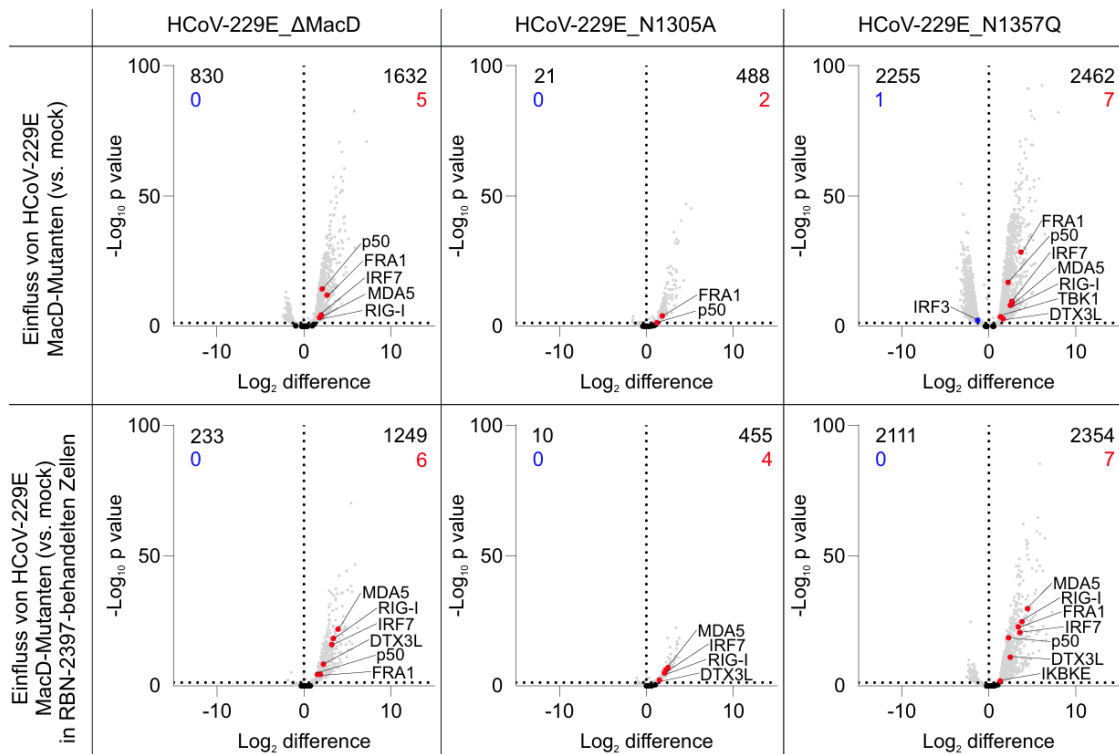


Abbildung 4-49: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Gene für die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die RBN-2397-Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbinungsrand vermerkt.

Der Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen zeigte eine signifikante Regulation in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Proben (Anhang Abbildung 7-19).

Die Expression von PARPs und PARP7-assoziierten Genen wurde in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD analysiert. Unvollständig oder fehlerhaft gebildetes PARP7 (Kapitel 4.5) könnte zusätzlich mit dem Inhibitor blockiert werden und eine stärkere Auswirkung auf die Genregulation bzw. Immunantwort zeigen. Um einen möglichen Zusammenhang mit der MacD zu zeigen, wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mit MacD-Mutanten infiziert und analysiert. In HCoV-229E_ΔMacD-infizierten und RBN-2397-behandelten Zellen wurde PARP7, PARP13S, PARP9, PARP8 und PARP5a vermehrt detektiert (Abbildung 4-50). Ohne Vorbehandlung wurde in jenen Zellen PARP7, PARP13S, PARP5a, PARP6 und PARP8 verstärkt nachgewiesen. In HCoV-229E_N1305A-infizierten behandelten und unbehandelten Proben wurde ausschließlich PARP7 vermehrt detektiert. Neben PARP7 wurden in HCoV-229E_N1357Q-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD PARP13S, PARP5a, PARP14, PARP12, PARP9, PARP10, PARP8 und PARP6 vermehrt exprimiert. Diese gesteigerte Expression wurde sowohl in

Ergebnisse

unbehandelten als auch in RBN-2397-vorbehandelten Zellen beobachtet. Das bedeutet, dass eine veränderte Expression von PARPs lediglich für unbehandelte bzw. behandelte HCoV-229E_ΔMacD-infizierte Proben detektiert wurde.

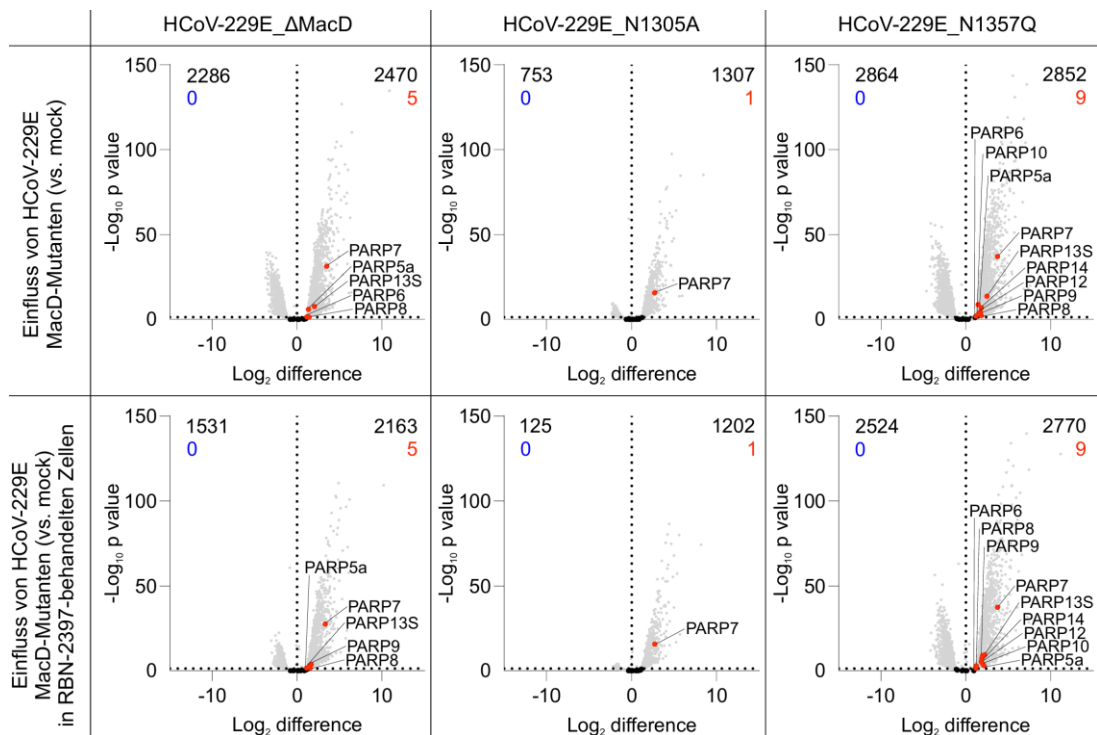


Abbildung 4-50: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die RBN-2397-Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Ein Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen kann dem Anhang (Abbildung 7-20) entnommen werden. Dabei konnten weder in unbehandelten noch in RBN-2397-behandelten Proben signifikante Expressionsveränderungen der 17 humanen PARPs detektiert werden.

Eine Regulation konnte für einige PARP7-assoziierte Gene detektiert werden (Abbildung 4-51). In vorbehandelten und HCoV-229E_ΔMacD-infizierten Proben konnte eine gesteigerte Expression von FRA1, p50, MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L detektiert werden. Unbehandelte Zellen wiesen zusätzlich eine gesteigerte TBK1-Expression auf. Mit HCoV-229E_N1305A infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD exprimierten vermehrt FRA1, p50, MDA5, IRF7 und RIG-I. In unbehandelten Proben wurden IRF7 und RIG-I nicht signifikant reguliert. Eine verringerte IRF3-Expression und eine vermehrte Genexpression von FRA1, p50, MDA5, RIG-I, IRF7, DTX3L und TBK1 wurde in behandelten HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen detektiert. Die gleiche Genregulation wurde auch in unbehandelten infizierten Zellen nachgewiesen. Eine im Vergleich mit

Ergebnisse

HCoV-229E signifikante Regulation konnte für FRA1 in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen festgestellt werden (Anhang Abbildung 7-21).

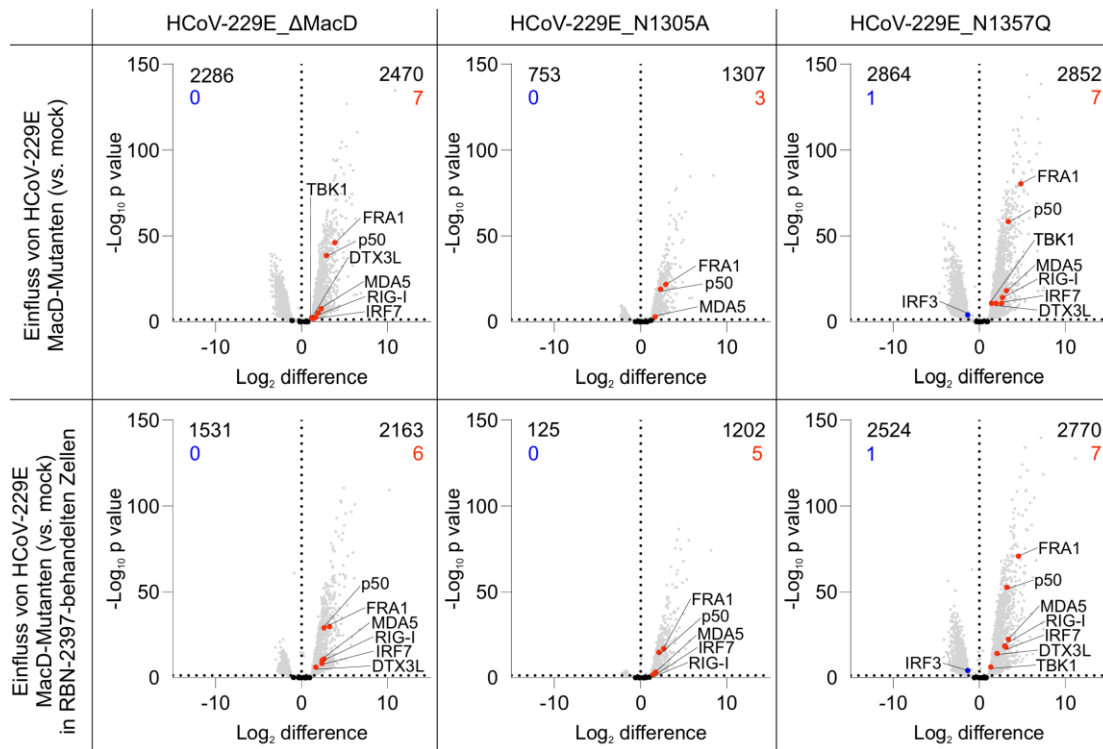


Abbildung 4-51: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h bei 37 °C vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Gene für die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die RBN-2397-Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit nicht infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Genregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD hinsichtlich der Anzahl regulierter Gene, insbesondere PARPs, erhöht ist. Zellübergreifend ähnlich ist hingegen die Expression von PARP7-assoziierten Genen (Abbildungen 4-44 bis Abbildung 4-51).

Für die A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD wurden anschließend ausgewählte Proteine bzw. deren ADP-Ribosylierung mittels Western Blot (Kapitel 3.5.4) analysiert (Abbildung 4-52). Ziel war es, die Auswirkungen auf die (PARP7-induzierte) ADP-Ribosylierung bzw. im Zusammenhang mit der Immunantwort stehende Proteine zu charakterisieren. In allen Proben wurde Beta-Aktin als Kontrollprotein erfasst. Für beide Zelllinien wurden ADP-ribosylierte Proteine über die gesamte Lauffront detektiert, wobei weniger Signale in Zellen mit PARP7-KD ermittelt wurden. Übereinstimmend wurden die stärksten Signalintensitäten bei etwa 70 bzw. 50 kDa detektiert. Während die Intensitäten der einzelnen (infizierten) Proben sich bei 50 kDa ähneln, waren jene für 70 kDa verschieden. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden die stärksten Signale für unbehandelte und HCoV-229E- bzw. HCoV-229E_N1357Q-infizierte Proben

Ergebnisse

erfasst. Ohne PARP7-KD zeigten sich die stärksten Intensitäten für nicht infizierte und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen. Im Vergleich sind diese Intensitäten allerdings schwächer als die stärksten in Zellen mit PARP7-KD. Das virale N-Protein zeigt Unterschiede in der Signalintensität in Zellen ohne PARP7-KD unabhängig von der RBN-2397-Behandlung nach der Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten.

Ein Signal für PARP9 wurde in Zellen mit PARP7-KD nicht bzw. kaum (in IFN- β -behandelten Zellen) detektiert, während in Zellen ohne PARP7-KD ein Signal in allen Proben detektiert werden konnte. Auch eine Veränderung des für FRA1 detektierten Signals wurde zwischen den beiden Zelllinien identifiziert. Übereinstimmend wurde das stärkste Signal in nicht infizierten behandelten und unbehandelten Zellen detektiert. Unterschiede konnten in der Signalintensität der infizierten Proben erfasst werden. Zellen mit PARP7-KD zeigten ein stärkeres Signal in RBN-2397-behandelten Proben. TBK1-Protein konnte in allen Proben detektiert werden. Die schwächsten Signalintensitäten wurden für unbehandelte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD ermittelt, die nicht infiziert bzw. mit HCoV-229E infiziert wurden. Allerdings ist auch die Signalintensität für Beta-Aktin in diesen Proben geringer. IRF3-Protein konnte ebenfalls in allen Proben detektiert werden. Auffällig ist, dass die Signalintensität in Zellen mit PARP7-KD aller Proben geringer ist als in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD. Die stärksten Signale für nicht-phosphoryliertes IRF3 wurden für unbehandelte und HCoV-229E_ΔMacD- bzw. HCoV-229E_N1305A-infizierte, behandelte nicht infizierte bzw. HCoV-229E_N1305A-infizierte Proben gemessen. Hyperphosphoryliertes IRF3 wurde insbesondere in unbehandelten HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q, sowie in allen behandelten und infizierten Proben detektiert.

Ergebnisse

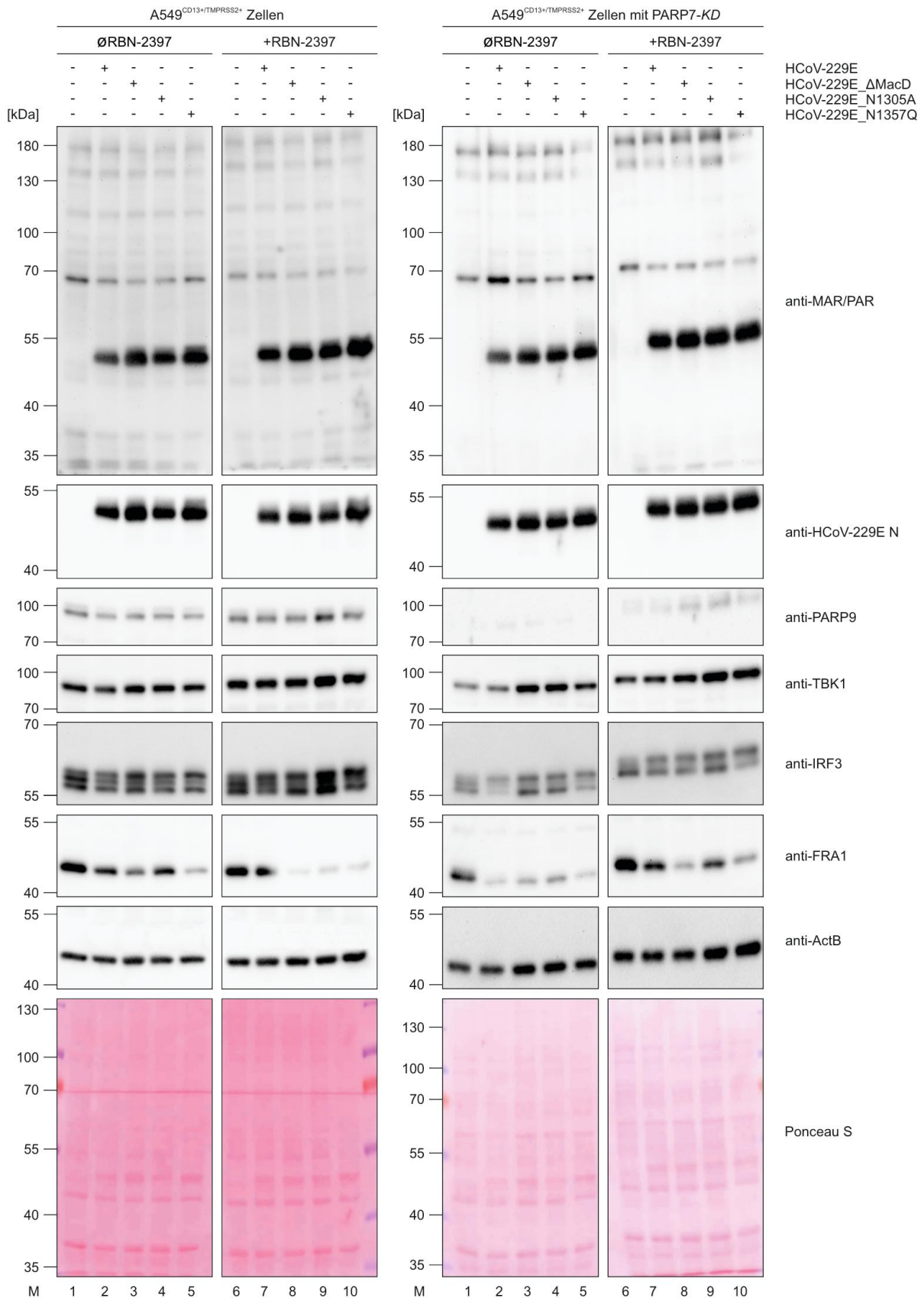


Abbildung 4-52: Proteinregulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD während der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in Abhängigkeit von einer Vorbehandlung mit RBN-2397. Die Zellen wurden mit RBN-2397 vorbehandelt (24 h) und/oder HCoV-229E-infiziert (MOI 0,1). 48 hpi wurde die Gesamtproteinmenge isoliert. Für

Ergebnisse

den Western Blot wurden jeweils 100 µg Gesamtprotein auf einem 9 % SDS-PAA-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte für ADP-ribosylierte Proteine, virales N-Protein, PARP9, TBK1, IRF3, FRA1 und Beta-Aktin unter Verwendung von HRP-konjugierten Sekundärantikörper.

Diskussion

5. Diskussion

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die Ergebnisse der Replikationseffizienz, die Genexpression und Proteinregulation in verschiedenen Zelltypen nach der Infektion mit HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten diskutiert. Außerdem wird der Einfluss einer IFN- β - und RBN-2397-Vorbehandlung auf die HCoV-229E-Infektion in MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ausgewertet. Darüber hinaus wird Bezug genommen auf die erzeugten PARP7-KD-Zellen.

5.1 Wachstumsanalyse von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten in unterschiedlichen Zelltypen

Anhand der Wachstumskinetik von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten konnte die Replikationseffizienz in verschiedenen Zelltypen verglichen werden. Verwendet wurden MRC-5-Zellen (Kapitel 4.1.1), A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (Kapitel 4.1.2) ohne bzw. mit PARP7-KD (Kapitel 4.5.2), differenzierte THP-1-Zellen (Kapitel 4.1.3) und Huh-7-Zellen (Anhang Abbildung 7-22). Bekannt ist, dass HCoV-229E an CD13 bindet und dadurch die Aufnahme in die Wirtszelle induziert. Humane embryonale Lungenfibroblasten (MRC-5-Zellen), Huh-7-Zellen und differenzierte THP-1-Zellen exprimieren CD13 auf der Zelloberfläche [Hunyadi *et al.*, 1993, Nomura *et al.*, 2004, Licon-Limón *et al.*, 2015, Andreu *et al.*, 2024]. In Übereinstimmung mit Lie *et al.* [Lie *et al.*, 2023] konnte mikroskopisch keine HCoV-229E-Infektion von A549-Zellen detektiert werden (Anhang Abbildung 7-4), da diese keinen CD13-Rezeptor besitzen. Es konnte bei der Virustiterbestimmung mittels Plaque-Assay kein infektiöses Virus im Überstand dieser Zellen nachgewiesen werden. Für die in dieser Arbeit dargestellten Daten wurden daher A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen verwendet.

5.1.1 Replikationseffizienz von HCoV-229E in MRC-5-Zellen

Viren weisen einen logarithmischen Replikationsverlauf auf. Zunächst erfolgt die Aufnahme des viralen Genoms in die Wirtszelle (Kapitel 1.4) und als Endergebnis werden Viruspartikel freigesetzt, welche zu einer Infektion benachbarter Zellen führen. Nach der Infektion der MRC-5-Zellen mit HCoV-229E konnte ein Anstieg der Anzahl infektiöser Viruspartikel detektiert werden. Der maximale Virustiter von 10^8 PFU/ml wurde 48 hpi erreicht (Abbildung 4-3A). Zu diesem Zeitpunkt konnte eine homogene Ausbreitung der Infektion über den gesamten Zellrasen mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Abbildung 4-2A1, Abbildung 4-2A2). Im Anschluss erfolgt ein Rückgang des Virustiters im Zellkulturüberstand. Die getesteten HCoV-229E-MacD-Mutanten erreichten 48 hpi geringere Virustiter von 10^5 - 10^7 PFU/ml (Abbildung 4-3B), was auf eine verringerte bzw. verzögerte Replikation hinweist. Ein direkter Zusammenhang zwischen der in einem *In-vitro*-Assay mit einem Testsubstrat bestimmten De-ADP-Ribosylierungsaktivität einer MacD-Variante und einem geringeren Titer von rekombinanten Viren, die dieselbe Mutation trugen, konnte dabei nicht durchgängig gezeigt werden. Während biochemisch eine signifikant verringerte De-ADP-

Diskussion

Ribosylierungsaktivität für rekombinant erzeugte Proteinvarianten MacD_N1305A, MacD_N1357H und MacD_N1357S detektiert wurde [Hartmann, 2023], konnten signifikant verringerte Virustiter für alle getesteten MacD-Mutanten mit Ausnahme von HCoV-229E_N1302A im Vergleich mit HCoV-229E erfasst werden (Abbildung 4-3B). Zusätzlich replizierte die HCoV-229E-MacD-Deletionsmutante (HCoV-229E_ΔMacD) zu vergleichbaren Virustitern wie die HCoV-229E_N1357Q-Mutante. Neben einer veränderten (Gesamt-) Enzymaktivität an einem Testsubstrat könnten demnach noch weitere Faktoren die Replikationseffizienz direkt oder indirekt beeinflusst haben. Mögliche Ursachen könnten eine leicht veränderte Faltung benachbarter nsp3-Domänen oder (bisher nicht erfasste) Änderungen der Substratspezifität bei einigen der eingeführten MacD-Mutationen sein. Um zu überprüfen, ob eine geringere Replikation der MacD-Mutanten zelltypabhängig stattfindet, wurde der Versuchsansatz in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen und differenzierten THP-1-Zellen in gleicher Weise durchgeführt.

5.1.2 Replikationseffizienz von HCoV-229E in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Die in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen erreichten Virustiter für HCoV-229E sind in Übereinstimmung mit der Literatur [Lie *et al.*, 2023], allerdings geringer als in MRC-5-Zellen. In HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte eine Syncytiumbildung beobachtet werden (Abbildung 4-5A1, Abbildung 4-5A2). Dabei fusionieren mehrere Zellen zu einer vergrößerten multinukleären Zelle. Dieser Mechanismus wurde auch für andere CoVs, wie SARS-CoV-2, beschrieben [Rajah *et al.*, 2022]. Für die verwendeten MacD-Mutanten konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit der Infektion mit HCoV-229E 48 hpi detektiert werden (Abbildung 4-4B). Ein möglicherweise bestehender Unterschied könnte jedoch aufgrund der im Vergleich mit anderen Zelltypen geringeren maximalen Virustiter unerkannt geblieben sein. Um dies weiter zu analysieren, könnte die Infektion beispielsweise mit einer niedrigeren MOI von 0,01 wiederholt werden. Für eine bessere Vergleichbarkeit der verschiedenen Zelltypen wurde durchgängig eine gleichbleibende MOI von 0,1 für die nachfolgenden Analysen verwendet.

5.1.3 Replikationseffizienz von HCoV-229E in makrophagenähnlichen Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein geeignetes Protokoll zur Differenzierung von THP-1-Zellen zu makrophagenähnlichen Zellen (M0, M1, M2) etabliert werden. Mikroskopisch lassen sich zwischen den verwendeten Subtypen morphologische Unterschiede erkennen (Abbildung 4-6). An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass die Bezeichnung der Subtypen keiner offiziell anerkannten Definition unterliegt und die verwendete Benennung auf Grundlage der Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Veronika Grau (Gießen) erfolgte. Außerdem konnte in dieser Kooperation festgestellt werden, dass sich THP-1-Zellen verschiedener Hersteller nach der Differenzierung morphologisch unterscheiden und proinflammatorische Zytokine in unterschiedlichem Umfang freisetzen (Daten nicht gezeigt).

Frühere Arbeiten zeigen, dass Monozyten und Makrophagen verschiedene Aufgaben während einer Virusinfektion übernehmen können. Nach einer Infektion mit CoVs (HCoV-229E, MERS-CoV,

Diskussion

SARS-CoV-2) erfolgt eine Aktivierung dieser Zellen [Merad & Martin, 2020]. Infektionen von Monozyten erfolgen ausschließlich innerhalb einer kurzen Zeitspanne während der Differenzierung zu Makrophagen [Desorges et al., 2007]. Daten von SARS-CoV-infizierten Patienten haben gezeigt, dass in Makrophagen und Monozyten keine effiziente Virusreplikation erfolgen kann, das heißt, nur wenige und teilweise auch nicht infektiöse Viruspartikel gebildet werden [Shao et al., 2006]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass PMA-behandelte THP-1-Zellen (entspricht THP1(M0)-Zellen) proinflammatorische Zytokine durch eine SARS-CoV-2-Infektion freisetzen [Vezzani et al., 2023]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Makrophagen nach abgeschlossener Differenzierung verwendet. Eine Zellaktivierung beispielsweise durch eine Infektion führt zur Freisetzung von Cytokinen (z. B. IL-6, IL-1 β , IFNs) bzw. zu einer Expression von Oberflächenrezeptoren. Makrophagen neutralisieren die Viruspartikel mittels Endozytose und polarisieren zu THP1(M1)-Zellen. Eine Differenzierung zu THP1(M2)-Zellen erfolgt zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion und trägt hauptsächlich zum Zell- bzw. Gewebeschutz bei [Atri et al., 2018, Forrester et al., 2018, Merad & Martin, 2020].

Die gemessenen Virustiter zeigten, dass die Replikation in THP1(M1)-Zellen am geringsten war (Abbildung 4-7). Mit Ausnahme von HCoV-229E_N1357H konnten für die Infektionen mit MacD-Mutanten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. In THP1(M1)-Zellen war die Replikation von HCoV-229E_N1357H am geringsten. Dies deutet darauf hin, dass dieser Subtyp für die Replikation von HCoV-229E und der getesteten MacD-Mutanten wenig permissiv ist. Die Ursache für die geringe Permissivität dieser Zellen ist gegenwärtig nicht klar. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression des CD13-Proteins, das als Rezeptor für die HCoV-229E-Infektion benötigt wird, während der Differenzierung zu Makrophagen ansteigt. Die anschließende Polarisation in die verschiedenen Makrophagen-Subtypen führt hingegen zu keiner signifikanten Veränderung der CD13-Expression [Mendoza-Coronel & Ortega, 2017, Forrester et al., 2018]. Man kann deshalb davon ausgehen, dass (grundsätzlich) eine HCoV-229E-Infektion der drei Subtypen möglich ist, was in dieser Arbeit für den Zeitpunkt 48 hpi für alle Subtypen mittels Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden konnte (Abbildung 4-6-C0 bis Abbildung 4-6C2).

Für THP1(M0)- und THP1(M2)-Zellen wurden höhere Virustiter nach Infektion mit HCoV-229E gemessen. Ein maximaler Virustiter von 10^5 PFU/ml wurde in HCoV-229E-infizierten THP1(M0)-Zellen erreicht. Die MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q) wiesen signifikant geringere Virustiter auf. Die höchsten Virustiter wurden in THP1(M2)-Zellen erreicht. Eine signifikante Verringerung der Virustiter wurde für HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1357H bestätigt. Die Ergebnisse zeigen, dass der Grad und Typ der Differenzierung dieser makrophagenähnlichen Zellsubtypen erhebliche Auswirkungen auf die Virusreplikation hat und dass die MacD die Virusreplikation in diesen Zellen unterstützt.

Zelltypabhängige Unterschiede zeigten sich auch hinsichtlich der Replikation von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten in anderen Zellen. Insbesondere in MRC-5-Zellen zeigten die getesteten HCoV-229E-MacD-Mutanten eine signifikant verringerte Replikationseffizienz. Im

Diskussion

Folgenden wurden Genexpressionsanalysen durchgeführt, um weitere Einblicke in mögliche Zusammenhänge zwischen der reduzierten Replikation der MacD-Mutanten (mit ihrer veränderten De-ADP-Ribosylierungsaktivität) und der zellulären Reaktion bzw. angeborenen Immunantwort auf eine Infektion mit diesen unterschiedlichen Viren zu gewinnen.

5.2 Transkriptomanalyse in verschiedenen Zelltypen

Der Verlauf einer Virusinfektion kann durch eine veränderte Genexpression und eine damit verbundene Immunantwort beeinflusst werden. Um potenziell relevante Gene zu identifizieren und einen Überblick über die Expression zu erhalten, wurde eine Transkriptomanalyse für MRC-5-, A549^{CD13+/TMPRSS2+}- und differenzierte THP-1-Zellen durchgeführt.

5.2.1 Genexpression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

In der Heatmap in Abbildung 4-8A wurden differentiell regulierte Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und $\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 2$ bzw. ≤ -2) unter anderem auch in infizierten MRC-5-Zellen erfasst. Änderungen der zellulären Genexpression wurden bestimmt für Zellen, die mit HCoV-229E oder HCoV-229E_N1305A mit einer MOI von 0,1 bzw. 3,0 infiziert worden waren. Bei HCoV-229E-infizierten Proben führte eine höhere MOI zur Regulation von ca. 1000 zusätzlichen Genen. Dies kann daraufhin deuten, dass im Rahmen der Immunantwort eine stärkere Aktivierung der Zelle stattfindet.

Bei Verwendung einer MacD-Mutante mit abgeschwächter De-ADP-Ribosylierungsaktivität wurden (insbesondere nach einer Infektion mit einer MOI von 0,1) deutlich weniger Gene vermehrt exprimiert. Der N1305-Rest ist vermutlich zentraler Teil des katalytischen Zentrums der MacD [Putics *et al.*, 2005, Egloff *et al.*, 2006]. Während bei einer Infektion mit einer niedrigen MOI etwa 400 Gene vermehrt exprimiert wurden, war die Anzahl verstärkt exprimierter Gene bei einer MOI von 3,0 dreifach höher (Abbildung 4-8). Die Gegenüberstellung von HCoV-229E-infizierten und HCoV-229E_N1305A-infizierten MRC-5-Zellen zeigte, dass von der MacD-Mutante deutlich mehr infektiöse Viruspartikel benötigt werden, um eine HCoV-229E-ähnliche Genexpression auszulösen. Neben der schwächer (de)regulierten Genexpression wurde auch eine geringere Replikation von HCoV-229E_N1305A beobachtet (Abbildung 4-3B). In anderen Studien wurde gezeigt, dass die korrespondierende Substitution *in vivo* zu einer verringerten Virulenz von SARS-CoV und MHV und dem Verlust der ADP-Ribose-1“-Phosphatase-Aktivität führt [Egloff *et al.*, 2006, Fehr *et al.*, 2016, Eriksson *et al.*, 2008]. Die Ergebnisse zeigen übereinstimmend, dass N1305 relevant für die Infektion mit Coronaviren ist. Dieses hoch konservierte Asparagin bildet eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Ribose-3“-Hydroxygruppe aus und dient somit der Bindung bzw. Positionierung der ADP-Ribose im aktiven Zentrum [Putics *et al.*, 2005]. Durch die Substitution zu Alanin können keine Wasserstoffbrücken ausgebildet werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Genregulation sowohl von der Virusmenge als auch von dem verwendeten Virus abhängig ist. Bei Verwendung einer MOI von 0,1 bzw. 3,0 sollte beachtet werden, dass die Ausbreitung der Infektion voneinander abweicht. Das bedeutet, dass bei einer

Diskussion

hohen MOI theoretisch eine vollständige Infektion direkt durch die Menge zugegebener Viruspartikel erfolgt, während bei einer geringen Virusmenge weitere Viruspartikel generiert und freigesetzt werden müssen, um eine vollständige Infektion der Zellkultur zu ermöglichen. Zusätzlich wird bei einer MOI von 3,0 eine Induktion von mehr Entzündungs- und Stressgenen erwartet, da theoretisch bereits zu Beginn des Experiments alle Zellen der Kultur infiziert worden sind. Bei einer verzögerten Infektion (MOI 0,1) kann eine IFN-induzierte Aktivierung benachbarter (zunächst noch uninfizierter) Zellen erfolgen, sodass dort unterschiedliche Signalwege und Gene reguliert werden (Kapitel 5.6). Für andere CoVs wurde gezeigt, dass die Genexpression und die damit in Verbindung stehenden Signalwege vom Verlauf der Infektion bzw. der verwendeten MOI abhängig sind [Sun *et al.*, 2020, Ding *et al.*, 2023].

5.2.2 Genexpression in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Ein Vergleich der Genregulation in unterschiedlichen Zelltypen nach einer HCoV-229E-Infektion zeigt, dass in MRC-5-Zellen 15-fach mehr Gene als in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen differentiell reguliert wurden (Abbildung 4-8A, Abbildung 4-14A). Besonders auffällig ist, dass die Anzahl an Genen bzw. ISGs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach der Infektion mit HCoV-229E und HCoV-229E_N1305A am niedrigsten, mit HCoV-229E_ΔMacD höher und mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S am höchsten war. Die MacD-Mutanten HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S wiesen geringe Abweichungen untereinander auf. Zur Darstellung der in allen MacD-Mutanten vermehrt exprimierten Gene wurde ein UpSet-Diagramm generiert (Abbildung 4-14C). In allen MacD-Mutanten wurden 11 identische Gene abhängig von der Infektion identifiziert. Auffällig ist, dass in Infektionen mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S übereinstimmend 212 Gene mit erhöhter Expression detektiert wurden. Für die Substitutionen dieses Asparagins zu Glutamin, Serin, Histidin, Alanin und Asparaginsäure wurde ein graduell zunehmender Verlust der De-ADP-Ribosylierungsaktivität an einem Testsubstrat *in vitro* gezeigt [Hartmann, 2023], obwohl N1357 vermutlich nicht unmittelbar am katalytischen Zentrum beteiligt ist. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass HCoV-229E_N1305A ähnlich wie HCoV-229E eine geringe Anzahl an Genen differentiell reguliert und möglicherweise die Immunantwort der Wirtszelle unterdrückt. Durch eine Deletion der gesamten MacD kommt es zu einer veränderten Regulation, sodass eine Vielzahl weiterer Gene differentiell exprimiert wird. Interessant ist, dass (im Vergleich mit einer Infektion mit der MacD-Deletionsmutante) bei einer Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S mehr als doppelt so viele Gene differentiell reguliert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass N1357 eine wichtige Rolle bei der Modulation der MacD-Funktion einnimmt, die den Verlauf der Infektion und möglicherweise auch den Umfang der Unterdrückung der angeborenen Immunantwort der Wirtszelle mitbestimmen könnte. Um die Auswirkungen von MacD-Mutationen auf die Genexpression coronavirusinfizierter Zellen detaillierter zu betrachten, wurde die Genexpression der 17 humanen PARPs, die durch ihre ADP-Ribosylierungsaktivität als Gegenspieler der viralen MacD und deren De-ADP-Ribosylierungsaktivität agieren könnten, im Rahmen von Infektionen mit HCoV-229E sowie davon abgeleiteten HCoV-229E-MacD-Mutanten in Zellkultur analysiert.

Diskussion

5.2.3 Expression von PARP mRNA in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion

Zelluläre PARPs katalysieren die ADP-Ribosylierung viraler und wirtszelleigener Proteine (Kapitel 1.7, Kapitel 1.8). Diese posttranslationale Modifikation kann durch die de-ADP-ribosylierende Aktivität der MacD umgekehrt werden (Kapitel 1.9). Um den Zusammenhang zwischen PARPs und der Aktivität der viralen MacD zu analysieren, wurden verschiedene Zelltypen auf die Expression von PARPs nach der Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten analysiert.

5.2.3.1 PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

Die Reanalyse hinsichtlich der PARP-Expression (Anhang Abbildung 7-5, Abbildung 7-6, Abbildung 7-7) des bereits vorhandenen Microarray-Datensatzes ermöglichte einen ersten Einblick in deregulierte zelluläre Gene bei Infektionen von MRC-5-Zellen mit HCoV-229E oder einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten. Sowohl RT-qPCR- (Abbildung 4-10) als auch NGS-Datensätze (Abbildung 4-9, Abbildung 4-11, Abbildung 4-12) zeigten Übereinstimmungen und (methodisch bedingte) Abweichungen hinsichtlich der Expression ausgewählter Gene. Verglichen mit dem NGS-Datensatz konnten mittels Microarray etwa doppelt so viele signifikant hochregulierte Gene durch die HCoV-229E-Infektion detektiert werden, sodass von einer unterschiedlichen Sensitivität dieser beiden Analyseverfahren auszugehen ist. Bekannt ist, dass es zu methodisch bzw. auswertungsbedingten Unterschieden der verschiedenen Analysen kommen kann [Git *et al.*, 2010, Dalman *et al.*, 2012, Pumeda, 2024]. Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Methoden könnten allerdings auch im direkten Zusammenhang mit den in den jeweiligen Experimenten verwendeten MRC-5-Zellen stehen. Ein wesentlicher Nachteil bei der Verwendung dieser Zellen ist deren begrenzte Lebensdauer. Es wird davon ausgegangen, dass die Seneszenz nach etwa 42- 46 Zellteilungen eintritt [Cytion, 2025]. Mögliche Auswirkungen der Alterung dieser Zellen auf die zelluläre Genexpression einschließlich der hier untersuchten Zielgene sollten in künftigen Studien näher analysiert werden. Die genaue Passageanzahl der für die Microarray-Analyse verwendeten Zellen ist leider nicht bekannt. Für alle anderen Analysen wurden MRC-5-Zellen verwendet, die die Passage 28 nicht überschritten hatten.

Bei der Reanalyse des Microarray-Datensatzes konnte eine infektionsspezifisch vermehrte Expression von PARP7, PARP6 und PARP11 in MRC-5-Zellen erfasst werden, welche mittels RT-qPCR validiert wurde. Parallel dazu konnte eine verringerte Expression von PARP8, PARP3 und PARP4 mittels Microarray-Analyse bzw. für PARP3 mittels NGS detektiert werden. Übereinstimmend mit der Literatur wurde mittels RT-qPCR für PARP3 und PARP4 keine signifikante Regulation im Vergleich mit nicht infizierten Proben detektiert. So hatten beispielsweise auch Grunewald *et al.* in BMDMs, murinen Fibroblasten (17Cl-1) und Zellen eines Hirntumor-Astrozytomas (engl. *delayed brain tumor astrocytoma*) nahezu keine Expression von PARP3 und PARP4 in MHV-infizierten Zellen detektiert [Grunewald *et al.*, 2019, Grunewald *et al.*, 2020]. Zusätzlich wurden MRC-5-Zellen mittels NGS analysiert, die mit einer MOI von 3,0 infiziert wurden (Abbildung 4-11). Bei einer MOI von 3,0 ist davon auszugehen, dass alle Zellen infiziert wurden,

Diskussion

sodass keine Produktion und Freisetzung weiterer Viruspartikel erforderlich sind, um alle Zellen der Zellkultur zu infizieren. Eine signifikant erhöhte Expression gegenüber einer Infektion mit einer MOI von 0,1 wurde für PARP5b, einem infektionsspezifisch regulierten PARP (Abbildung 4-10), detektiert. Da sowohl die Anzahl regulierter PARPs als auch die Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene durch eine höhere Virusmenge ansteigt, ist davon auszugehen, dass bei einer synchronisierten Infektion aller Zellen einer Zellkultur zusätzliche Mechanismen der antiviralen Immunabwehr und/oder virusinduzierte infektionsfördernde Prozesse bereits frühzeitig stark aktiviert werden.

Eine gesteigerte PARP7-Expression in HCoV-229E- oder HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen ergab sich aus dem NGS-Datensatz unabhängig von der verwendeten Virusmenge. Bei einer höheren Virusmenge (MOI 3,0) wurden nach der Infektion mit HCoV-229E_N1305A zusätzlich PARP5b und PARP8 vermehrt bzw. PARP3 verringert exprimiert. Dadurch wurde erneut gezeigt, dass bei einer synchronisierten Infektion aller Zellen mehr PARPs reguliert werden. Allgemein bekannt ist, dass durch eine höhere Virusmenge pro Zelle eine deutlich stärker veränderte Genexpression ausgelöst werden kann. Diese Auswirkungen ließen sich auch in MRC-5-Zellen nach der Infektion mit einer MOI von 3,0 im Vergleich mit einer MOI von 0,1 nachweisen. Welche Funktion die einzelnen differentiell regulierten PARPs übernehmen ist allerdings nicht oder nur teilweise bekannt (Kapitel 1.8). Es zeigte sich, dass die Expression der PARPs in Abhängigkeit von der für die Infektion verwendeten Mutante variiert (Anhang Abbildung 7-5 bis Abbildung 7-7). Die Microarray-Datenanalyse ergab eine ähnliche PARP-mRNA-Expression für HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_H1310A, HCoV-229E_N1357S und HCoV-229E in MRC-5-Zellen. Übereinstimmend wurde PARP8 verringert und PARP7, PARP6 und/oder PARP11 vermehrt exprimiert. Zusätzlich wurden PARP1 (HCoV-229E_H1310A, HCoV-229E_N1357S) und PARP16 (HCoV-229E_H1310A) im Vergleich mit der mitgeführten Kontrolle signifikant verringert exprimiert. Die Infektion mit der Deletionsmutante führte zu einer erhöhten PARP11-Expression (Anhang Abbildung 7-5). Alle anderen PARPs waren im Vergleich mit der nicht infizierten Probe nicht signifikant reguliert. Da mögliche infektionsrelevante Funktionen einzelner PARPs bei viralen Infektionen bisher kaum untersucht wurden, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt kein direkter Zusammenhang zwischen bestimmten MacD-Mutationen und geänderten Expressionsmustern einzelner PARPs festgestellt werden. Allerdings soll an dieser Stelle die infektionsspezifisch vermehrte Expression von PARP7 hervorgehoben werden. Mit allen drei Methoden konnte nach der Infektion mit HCoV-229E eine signifikant erhöhte PARP7-Expression gezeigt werden (Abbildung 4-9, Abbildung 4-10, Anhang Abbildung 7-5). Mittels RT-qPCR konnte eine gesteigerte Expression für HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357Q detektiert werden. Diese Ergebnisse konnten teilweise mit NGS bzw. Microarray-Analysen bestätigt werden. Dies lässt vermuten, dass PARP7 eine Rolle bei der HCoV-229E-Infektion spielt. Umstritten ist jedoch, ob PARP7 infektionsfördernde und/oder infektionshemmende Funktionen übernehmen kann (Kapitel 1.8).

Diskussion

5.2.3.2 PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Neben den MRC-5-Zellen wurden auch A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach einer Infektion mit HCoV-229E bzw. einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten analysiert, um mögliche zelltypabhängige und unabhängige Regulationen aufzudecken. Die Infektion mit HCoV-229E führt zu einer gesteigerten Expression von PARP7 und weiteren 497 mRNAs (Abbildung 4-15). Gleichzeitig konnten 24 signifikant verringert exprimierte Gene detektiert werden. Eine erhöhte PARP7 mRNA-Expression wurde auch in einer früheren Studie von Calu-3-Zellen (Epithelzellen aus Lungenadenokarzinom) und A549^{ACE2+}-Zellen nach einer SARS-CoV-2-Infektion detektiert [Heer *et al.*, 2020]. Dies deutet darauf hin, dass ausgewählte PARPs unabhängig vom Zelltyp und ggf. auch unabhängig vom jeweils verwendeten Coronavirus einen Einfluss auf die virusinduzierte zelluläre Antwort besitzen.

Bei einer Infektion von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q wurde PARP7 vermehrt exprimiert (Abbildung 4-16). Die Anzahl signifikant regulierter Gene unterschied sich dabei in Abhängigkeit von der für die Infektion verwendeten MacD-Mutante. Der schwächste Effekt auf die Genregulation wurde für HCoV-229E_N1305A beobachtet. Eine ähnliche Anzahl regulierter Gene wurde für HCoV-229E-infizierte Zellen detektiert (Abbildung 4-15). In HCoV-229E_ΔMacD- oder HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen wurden etwa drei- bis fünffach mehr Gene vermehrt exprimiert. Dies deutet darauf hin, dass HCoV-229E bei einem Verlust seiner MacD oder bei einer durch die Punktmutation (HCoV-229E_N1357Q) ausgelösten Funktionsänderung sowohl die Anzahl als auch das Ausmaß bestimmter virusinduzierter Reaktionsmuster der Wirtszelle deutlich ansteigen, wozu vermutlich auch eine stärkere angeborene Immunantwort gehört. Zusätzlich konnte in diesen Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1357Q) eine verstärkte Expression von PARP8 und PARP13S bzw. in HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen PARP9, PARP12 und PARP10 detektiert werden. PARP9, PARP10, PARP12 und PARP13S werden den ISGs zugeordnet [OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]. Diese Ergebnisse stärken die Vermutung, dass HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1357Q eine gesteigerte antivirale Immunantwort auslösen, wodurch u.a. eine Aktivierung bestimmter ISGs erwartet werden kann.

5.2.3.3 PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten makrophagenähnlichen Zellen

Der dritte analysierte Zelltyp umfasste makrophagenähnliche Zellen. Dafür wurden Monozyten (THP-1-Zellen) in drei Subtypen differenziert (Kapitel 3.1.2) und anschließend mit HCoV-229E infiziert. Die Auswertung der mittels RT-qPCR generierten Daten zeigte eine signifikant erhöhte Expression aller getesteten PARPs (PARP7, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13 und PARP14) im Vergleich mit nicht infizierten Zellen. Auffällig ist, dass THP1(M1)-Zellen (mit Ausnahme von PARP12) eine schwächere Expression verglichen mit den anderen beiden Subtypen aufwiesen. Dies könnte darauf hindeuten, dass bei einer reduzierten Replikationsrate, welche durch niedrigere Virustiter gezeigt werden konnte (Abbildung 4-7), eine geringere Expression erfolgt bzw. keine Notwendigkeit der Expression bestimmter Gene vorliegt. Mittels NGS konnte analog dazu eine

Diskussion

Regulation von PARPs bedingt durch die HCoV-229E-Infektion gezeigt werden. In allen drei Subtypen wurden über 5000 Gene differentiell exprimiert. Die stärkste Regulation konnte in THP1(M0)-Zellen beobachtet werden. Die Differenzierung von THP1(M0)-Zellen kann durch verschiedenste Faktoren induziert werden [Murray *et al.*, 2014]. Während PARP1, PARP3 und PARP13L verringert exprimiert wurden, zeigte sich eine gesteigerte Expression von PARP14, PARP9, PARP12, PARP10 und PARP5a. Letztere sind bekannt für deren Zytokin-abhängige Induktion [Jeltema *et al.*, 2025]. In THP1(M1)- und THP1(M2)-Zellen wurden PARP14, PARP13S, PARP9, PARP12 und PARP5a vermehrt detektiert.

Iwata *et al.* konnten in primären Makrophagen und THP-1-Zellen zeigen, dass sich die Expression von PARP9 und PARP14 gegenseitig beeinflusst. Eine Verringerung einer der beiden mRNAs führte zur vermehrten Expression der jeweils anderen. Zusätzlich wurden PARP9 und PARP14 als makrophagenaktivierende Faktoren charakterisiert, die die Zytokinfreisetzung beeinflussen. Während makrophagenähnliche Zellen, welche mit IL-4 stimuliert wurden, eine verringerte Proteinmenge beider PARPs aufweisen, resultiert eine Behandlung mit IFN- γ in einer höheren PARP9- und PARP14-Proteinmenge [Iwata *et al.*, 2016]. Darüber hinaus trägt die Behandlung im Allgemeinen zu einer verstärkten Poly-ADP-Ribosylierung bei [Berton *et al.*, 1991]. In dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchsansatz wurde das Zusammenspiel von PARP9 und PARP14 nicht näher analysiert. Allerdings kann festgehalten werden, dass (bedingt durch die Infektion) eine gesteigerte Expression beider Gene auftritt. Für eine detailliertere Analyse könnten die generierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP9-KO (Daten nicht gezeigt) verwendet werden. Neben PARP9 und PARP14 sind auch PARP5a, PARP12 und PARP13 an der Immunantwort beteiligt [Xu *et al.*, 2022, Kerr *et al.*, 2023, Busa *et al.*, 2024] und weisen eine differentiell regulierte Genexpression durch die HCoV-229E-Infektion auf.

In THP1(M1)- und THP1(M2)-Zellen wurden PARP1 und PARP13L sowie in THP1(M1)-Zellen zusätzlich PARP3 verringert nachgewiesen. Vergleicht man die Ergebnisse von NGS und RT-qPCR fällt auf, dass der Trend von PARP9, PARP12 und PARP14 übereinstimmt. Eine partielle Übereinstimmung wurde auch für PARP10 und PARP13(S) gezeigt. Eine unerklärliche Diskrepanz wurde für die PARP7-Expression für den Vergleich von NGS- und RT-qPCR-Daten festgestellt. Eine erhöhte PARP7-Expression konnte ausschließlich mittels RT-qPCR bestätigt werden. Die makrophagenähnlichen Zellsubtypen wurden ebenfalls nach Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357Q hinsichtlich der Expression von PARP7 analysiert. Dabei wurde (in Übereinstimmung mit HCoV-229E) die vergleichsweise stärkste PARP7-Expression in THP1(M0)-Zellen gefunden. Die beiden anderen Subtypen zeigten eine schwächere Überexpression.

Ein besonderer Fokus lag auf der Regulation der Expression durch die Infektion in dem jeweiligen Zelltyp. Eine mindestens vierfach vermehrte Expression wurde für PARP5a, PARP5b, PARP6, PARP8, PARP11 und PARP13 (bzw. PARP13S) in MRC-5-Zellen mit mindestens einer der drei verwendeten Methoden detektiert. Methodenübergreifend wurde die stärkste infektionsspezifische Expression für PARP7 detektiert (Abbildung 4-9, Abbildung 4-10, Anhang Abbildung 7-5). Eine

Diskussion

signifikant erhöhte Expression von PARP7 wurde darüber hinaus in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mittels NGS und RT-qPCR detektiert. Sowohl in Huh-7-Zellen (Daten nicht gezeigt) als auch in differenzierten THP-1-Zellen konnte mittels RT-qPCR eine vermehrte PARP7-Expression gezeigt werden. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Expression dieser mRNA zelltypunabhängig durch die HCoV-229E-Infektion induziert wird. In MRC-5-Zellen ist diese Beobachtung zusätzlich bei einer höheren MOI zu verzeichnen. PARP7-mRNA wird auch in SARS-CoV-2-infizierten Calu-3- und A549^{ACE2+}-Zellen vermehrt exprimiert [Heer *et al.*, 2020]. Eine durch MHV induzierte Expression wurde von Grunewald *et al.* in BMDM beschrieben [Grunewald *et al.*, 2019, Grunewald *et al.*, 2020]. Dies weist auf eine besondere Rolle von PARPs, insbesondere PARP7, während der Coronavirus-Infektion hin.

PARPs modifizieren mit ihrer ADP-Ribosylierungsaktivität zelluläre und virale Proteine und können dadurch auch zu deren Degradation oder Inaktivierung beitragen. Damit können PARPs die Regulation einzelner Signalwege, die Zytokinfreisetzung oder Entzündungsprozesse beeinflussen. PARPs können auch in negativen Feedback-Mechanismen agieren, beispielsweise durch das Verhindern einer übermäßigen Entzündungsreaktion oder eines Zytokinsturms. Bekannt ist, dass einige PARPs eine Rolle bei der Regulation von Zellstress (insbesondere bei DNA-Schäden) besitzen und darüber hinaus zu einem programmierten Zelltod beitragen können. Die Aktivierung einzelner PARPs kann ein Schutzmechanismus der Zellen sein, der bei einer unkontrolliert ablaufenden Infektion den Zelltod herbeiführt, um dadurch die weitere Replikation und weitere Ausbreitung der Viren im Organismus zu verhindern. Um diese Möglichkeiten in einen besseren Kontext im Zusammenhang mit einer HCoV-229E-Infektion zu rücken, wurde die Genexpression einiger direkter bzw. indirekter PARP7-Interaktionspartner näher betrachtet.

5.2.4 Regulation von PARP7-assoziierten Genen in Abhängigkeit von HCoV-229E

Die Genexpression von PARP7-assoziierten Genen wurde in verschiedenen Zelltypen analysiert. Diese Analyse umfasste dabei die folgenden Gene: TBK1, FRA1, RIG-I, MDA5, MAVS, p50, p65, IRF1, IRF3, IRF7, NEMO, IKK α , IKK β , IKK ϵ , IKK κ , DTX3L, IFNAR1, IFNAR2, IFNLR1 und Interferone (α , β , λ).

5.2.4.1 Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

In MRC-5-Zellen führte eine Infektion mit HCoV-229E zu einer verringerten Expression von IRF3, welche sowohl mittels NGS als auch mittels RT-qPCR nachgewiesen werden konnte. Parallel dazu wurde methodenübergreifend eine vermehrte TBK1-Expression erfasst. Während der HCoV-229E-Infektion wird PARP7 vermehrt exprimiert (Kapitel 4.2). Wenn die gesteigerte Genexpression zu einem erhöhten Proteinlevel führt, könnten diese PARP7-Proteine unter anderem zu einer Inaktivierung von TBK1 durch dessen ADP-Ribosylierung führen (Kapitel 1.8). Die Zelle benötigt TBK1 für die Phosphorylierung von IRF3 und IRF7. Einer virusspezifischen PARP7-vermittelten Inaktivierung von TBK1-Protein könnte die Wirtszelle mit einer gesteigerten Produktion von TBK1

Diskussion

entgegenwirken, wodurch die Phosphorylierung von IRF3 bzw. IRF7 gesteigert werden könnte. Dies würde dann zur Translokation der beiden Proteine in den Zellkern führen und damit die Genexpression von IFNs bzw. ISGs induzieren [Yamada *et al.*, 2016, Rasmussen *et al.*, 2023]. Die Phosphorylierung von IRF3 kann außerdem indirekt von FRA1 inhibiert werden. Dies erfolgt durch die verringerte Ubiquitinierung von TRAF3 (engl. *TNF receptor-associated factor 3*) / TRIF (engl. *TIR domain-containing adapter inducing IFN- β*), wodurch deren Interaktion mit TBK1 verhindert wird, sodass keine IRF3-Phosphorylierung stattfindet [Cai *et al.*, 2017]. FRA1-mRNA wurde mittels Microarray in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen vermehrt detektiert. IRF3 wird in den meisten Zellen konstant gebildet und steht somit direkt zu Infektionsbeginn zur Verfügung. Eine fehlende IRF3-Translokation kann nachfolgend zu einer ausbleibenden IRF7-Aktivierung führen. Eine verzögerte Expression und Aktivierung von IRF7 kann die Feinabstimmung der IFN-Produktion beeinflussen [Dalskov *et al.*, 2023]. Eine vermehrte IRF7-Expression konnte methodenübergreifend nach der HCoV-229E-Infektion mit einer MOI von 0,1 nicht detektiert werden. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass HCoV-229E einen Einfluss auf die IFN- bzw. ISG-vermittelte Immunantwort in MRC-5-Zellen nimmt, wobei verschiedene Signalwege reguliert werden können. In weiteren Versuchen sollte die Phosphorylierung ausgewählter Proteine und die (möglicherweise ausbleibende) Translokation von IRF3 mikroskopisch nachgewiesen werden.

Bei einer HCoV-229E-Infektion mit einer MOI von 3,0 konnte eine verringerte Regulation von IRF3 sowie eine verstärkte TBK1- und IRF7-Expression identifiziert werden. Die Infektion mit einer höheren MOI führte zu einer verstärkten Genregulation. Eine Vielzahl von Genen, welche an antiviralen Signalwegen beteiligt sind, wurden vermehrt exprimiert. Dazu zählen beispielsweise p50, TBK1, RIG-I und MDA5. Letztere gehören zu den PRRs und detektieren virale RNA, wodurch die angeborene Immunantwort aktiviert wird. Eine IFN-Freisetzung induziert die MDA5-Expression, sodass dies als Feedbackreaktion betrachtet werden kann [Kato *et al.*, 2006]. Allerdings haben CoVs verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Synthese von IFNs zu unterdrücken [Spiegel *et al.*, 2005, Kuri *et al.*, 2009, Kuri & Weber, 2010, Kuri *et al.*, 2011, Alhammad *et al.*, 2023, Martinez-Vendrell *et al.*, 2025, Pfannenstiel *et al.*, 2025].

Während insgesamt mehr als 5600 Gene signifikant durch die HCoV-229E-Infektion reguliert wurden, konnte eine Infektion mit HCoV-229E_N1305A eine Regulation von über 4600 Genen induzieren. Diese Tendenz ist sowohl bei einer geringeren MOI von 0,1 als auch bei einer MOI von 3,0 zu beobachten und deutet darauf hin, dass eine HCoV-229E-Infektion eine stärkere Genregulation bzw. Aktivierung der Wirtszelle als diese HCoV-229E-MacD-Mutante auslöst. Eineverstrkte TBK1-Expression konnte mittels RT-qPCR sowohl fur HCoV-229E_N1305A-infizierte (MOI 0,1) Zellen als auch fur HCoV-229E_MacD-, HCoV-229E_N1357H- und HCoV-229E_N1357Q-infizierte Zellen bestätigt werden (Abbildung 4-23A). Keine signifikante Regulation erfolgte fur IRF3 (Abbildung 4-23C), welches, je nach verwendetem Virus, kaum oder sogar geringer als in nicht infizierten Zellen differentiell exprimiert wurde. Ausgehend von den RT-qPCR-Ergebnissen kann festgehalten werden, dass die Genexpression von TBK1 und IRF7 von HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen verglichen mit den anderen MacD-Mutanten der in

Diskussion

HCoV-229E-infizierten Proben am ähnlichsten ist. Von den verwendeten MacD-Mutanten weist HCoV-229E_N1357Q zudem die HCoV-229E-ähnlichste De-ADP-Ribosylierungsaktivität in biochemischen Experimenten mit den entsprechenden bakteriell exprimierten MacD-Proteinen *in vitro* auf [Hartmann, 2023].

5.2.4.2 Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Die Genexpression der zuvor beschriebenen Gene wurde analog in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mittels NGS bzw. RT-qPCR analysiert. Durch eine Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten wurden insgesamt 1654 Gene differentiell reguliert (Abbildung 4-14A). Für HCoV-229E- und HCoV-229E_N1305A-infizierte Zellen wurden jeweils unter 100 differentiell regulierte Gene erfasst. Vergleicht man A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden, fällt auf, dass die Expression der ausgewählten Gene in HCoV-229E_N1305A- und HCoV-229E-infizierten Zellen ähnlich ist (Abbildung 4-24A, Abbildung 4-25). Die übereinstimmend gefundene vermehrte FRA1-Expression unterstützt die Hypothese, dass die Wirtszelle versucht, die IFN-vermittelte Immunantwort durch die Regulation (antiviraler) Gene zu aktivieren bzw. zu erhalten. Die Expression dieser ausgewählten Gene wird scheinbar nicht durch die Mutation beeinflusst. Allerdings stehen diese Ergebnisse der Expressionsanalysen und der Replikationseffizienz (Kapitel 4.1.2) für HCoV-229E_N1305A in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen im Gegensatz zu einigen bereits früher publizierten Daten. Bei SARS-CoV führte die entsprechende Mutation in der MacD zu einer abgeschwächten Replikation [Kuri *et al.*, 2011]. In BMDMs konnte bei jener Mutation in MHV ebenfalls eine verringerte Replikation sowie eine Veränderung der PARP-Expression beobachtet werden [Grunewald *et al.*, 2019]. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnten zelltypabhängige antivirale Abwehrmechanismen oder Stoffwechselprozesse sein. Weitere Analysen sind erforderlich, um detailliertere Aussagen treffen zu können. Zusätzlich muss beachtet werden, dass in den vorhandenen Studien, trotz einer hoch konservierten MacD (Abbildung 1-4), verschiedene Viren verwendet wurden.

Ein abweichendes Expressionsprofil für PARP7-assoziierte Gene wurde in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1357Q detektiert. Dabei wurden beispielsweise FRA1, p50, MDA5 und RIG-I vermehrt exprimiert (Abbildung 4-25). Zusätzlich wurde mittels RT-qPCR eine vermehrte TBK1-Expression in infizierten Zellen gefunden (Abbildung 4-26). HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1357Q zeigten dabei die stärkste Expression, welche mittels NGS für HCoV-229E_N1357Q erneut bestätigt bzw. auch für HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S nachgewiesen wurde. Außerdem konnte mit beiden Methoden eine verringerte IRF3-Expression für rekombinante HCoV-229E-MacD-Mutanten mit diesen drei Mutationen detektiert werden. Die stärkste Veränderung der Genexpression wurde durch die HCoV-229E_N1357Q-Infektion mittels NGS detektiert. Der Vergleich mit HCoV-229E_N1357H- bzw. HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen (Anhang Abbildung 7-23, Abbildung 7-24) zeigte die gleichen regulierten Gene und lässt vermuten, dass N1357 eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung bzw. dem Umgehen der antiviralen Immunantwort in

Diskussion

A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen spielen könnte. Allerdings hat der vollständige Verlust der Domäne einen schwächeren Effekt auf die Genregulation. Das bedeutet, dass eine an Position N1357 mutierte MacD stärkere Auswirkungen auf die Immunantwort hat als eine Deletion der gesamten Domäne. Eine mögliche (aber noch zu bestätigende) Erklärung hierfür könnte eine durch diese Mutationen veränderte Substratspezifität der MacD sein, die zu einem veränderten Spektrum von Proteinsubstraten führen würde, die von der MacD de-ADP-ribosyliert werden können. Um einen möglichen direkten Zusammenhang mit der De-ADP-Ribosylierungsaktivität zeigen zu können, sind weitere Experimente erforderlich. Allerdings kann festgehalten werden, dass N1357 eine wichtige Rolle für die De-ADP-Ribosylierungsaktivität übernimmt. So konnte gezeigt werden, dass Substitutionen dieses Asn-Restes mit Histidin, Serin und Glutamin zu einer reduzierten MacD-Aktivität an einem Testsubstrat führen [Hartmann, 2023] und die zelluläre Genexpression in infizierten Zellen zelltypabhängig beeinflussen. Neben der De-ADP-Ribosylierungsaktivität der MacD könnten die Punktmutationen aber auch weitergehende Effekte haben, so zum Beispiel könnten sie die Strukturen und/oder Funktionen benachbarter Proteindomänen im nsp3-Protein beeinflussen und damit auch deren mögliche Wechselwirkungen mit zellulären oder viralen Interaktionspartnern beeinträchtigen.

5.2.4.3 Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten makrophagenähnlichen Zellen

THP-1-Zellen wurden in drei verschiedene Subtypen differenziert und die Expression PARP7-assoziiierter Gene untereinander verglichen. Zellübergreifend wurden DTX3L, IRF7 und TBK1 vermehrt bzw. IRF3 und IFNRL1 verringert exprimiert (Abbildung 4-27). Darüber hinaus wurde eine Regulation weiterer Gene subtypabhängig detektiert. Eine gesteigerte Expression von FRA1 wurde in THP1(M1)- und THP1(M2)-Zellen detektiert. Cai *et al.* konnten zeigen, dass durch eine Polyinosinsäure:Polycytidylsäure-Stimulation (engl. *polyinosinic-polycytidylic acid*; poly(I:C)) von THP-1-Zellen eine gesteigerte Interaktion von FRA1 und TRAF/TRIF stattfindet [Cai *et al.*, 2017]. Poly(I:C) simuliert eine virale Infektion und aktiviert dadurch verschiedene Signalwege. Da eine gesteigerte FRA1-Expression nicht in THP1(M0)-Zellen beobachtet werden konnte, ist nicht auszuschließen, dass die Differenzierung der THP-1-Zellen mit LPS, IFN- γ bzw. IL-4 und IL-13 Ursache der veränderten Genexpression ist. Monozyten sind aufgrund der limitierten Infektion dieser Zellen mit Coronaviren [Desforges *et al.*, 2007] keine brauchbare Option für diese infektionsabhängige Analyse. Möglicherweise sind aus Blut isolierte Makrophagen eine Alternative, wobei auch deren Polarisation pathogen- bzw. zytokininduziert stattfindet. Zusätzlich könnten die Aussagen dabei durch Verwendung unterschiedlicher Spender bzw. durch das Vorliegen einer Mischpopulation beeinflusst werden, insbesondere da den Subtypen verschiedene Aufgaben während des Infektionsverlaufs zugeschrieben werden und damit unterschiedliche Signalwege aktiviert bzw. inhibiert werden. Sowohl in THP1(M1)- als auch in THP1(M2)-Zellen wurden außerdem p50 und RIG-I vermehrt exprimiert. RIG-I und MDA5, welche in THP1(M2)-Zellen vermehrt detektiert wurden, übernehmen die Detektion viraler RNA und sind Bestandteil verschiedener antiviraler Signalwege.

Diskussion

Vergleicht man die vermehrt exprimierte Gene in den jeweiligen Zelltypen nach der Infektion mit HCoV-229E, zeigen sich Abweichungen, sodass vermutlich eine zelltypabhängige Regulation stattfindet. MRC-5-Zellen exprimieren insbesondere p50, TBK1 und MDA5. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte eine vermehrte Expression von FRA1 und IRF7 detektiert werden. Alle drei makrophagenähnlichen Subtypen zeigten eine vermehrte DTX3L-, IRF7- und TBK1-Expression. Weitere subtypabhängig verstärkte exprimierte Gene umfassen RIG-I, FRA1, p50 und MDA5. Dies deutet auf eine individuelle antivirale Immunantwort der jeweiligen Zelltypen bzw. Subtypen hin. Die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten erfolgte in MRC-5- bzw. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Letztere zeigten eine verstärkte Expression von FRA1 und p50 nach HCoV-229E_N1305A-Infektion. Diese führte in MRC-5-Zellen zu einer Expression von p50, MDA5 und TBK1. Die Analyse des Microarray-Datensatzes zeigte übereinstimmend eine gesteigerte TBK1- und p50-Expression. Zusätzlich wurden allerdings auch IRF1, DTX3L und p65 vermehrt exprimiert. In beiden Zelltypen wurde eine gesteigerte p50-Expression festgestellt. Als Teil des NF- κ B-Signalweges ist p50 unter anderem an der Produktion von ISGs beteiligt. Abschließend kann festgehalten werden, dass an der Immunantwort in den verwendeten Zelltypen verschiedene Genregulationen beteiligt sind. In allen drei Zelltypen erfolgt auf mRNA-Ebene eine Regulation der IRF3-induzierten Immunantwort (Kapitel 1.3). Da dabei verschiedene Proteinmodifikationen stattfinden, wurden ausgewählte Proteine näher analysiert.

5.3 Zusammenhang zwischen Proteinregulation und Genexpression während einer HCoV-229E-Infektion

PARP7-mRNA wird zelltypunabhängig nach HCoV-229E-Infektion vermehrt exprimiert. Stellvertretend für HCoV-229E-induzierte PARPs wurde PARP7 in MRC-5-Zellen mittels Western Blot analysiert (Abbildung 4-28A). Eine starke Zunahme konnte auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden, was auf die bekannte infektionsassoziierte verminderte Translation der meisten zellulären mRNAs und der dadurch verringerten Neusynthese zellulärer Proteine zurückzuführen sein könnte. Andere mögliche Ursachen könnten auch ein alternatives *Splicing* der mRNA, eine geringe Halbwertszeit von mRNA und/oder Protein und infektionsinduzierte Proteindegradation durch bestimmte posttranslationale Modifikationen sein. Es wird spekuliert, dass die schnelle Prozessierung von PARP7-Protein, welches eine Halbwertszeit von 4,5 min aufweist, durch eine mögliche Instabilität der Proteinstruktur bedingt sein könnte [Kamata *et al.*, 2021]. Auf Proteinebene konnte durch die fehlende Verfügbarkeit geeigneter spezifischer Antikörper keine weitere Detektion in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen erfolgen. Das Fehlen geeigneter Nachweisreagenzien verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Detektion von PARP7 und zeigt die Notwendigkeit einer deutlich umfassenderen Charakterisierung zellulärer PARPs. Bekannt ist, dass PARP7 die antivirale Immunantwort durch die Regulation von Typ-I IFNs inhibiert [Jeltema *et al.*, 2025]. Unter der Annahme, dass eine vermehrte mRNA-Expression durch die Infektion in einer gesteigerten Proteinmenge resultiert, würde eine verringerte Immunantwort erfolgen. Mögliche direkt mit PARP7 im Zusammenhang stehende Signalwege sind in Abbildung 1-3 dargestellt. Darauf basierend wurde die Proteinanalyse für TBK1, FRA1 und IRF3 erweitert.

Diskussion

Ausgewählte Proteine antiviraler Signalwege bzw. deren posttranslationale Modifikationen wurden in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen analysiert. ADP-Ribosylierungen wurden mit einem Antikörper, welcher MAR- und PARylierung detektiert, bestimmt (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32). Verglichen mit nicht infizierten Proben wurde in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen ein schwächeres Signal für die Modifikationen detektiert. Dies könnte ein Indiz für die MacD-vermittelte De-ADP-Ribosylierung in virusinfizierten Zellen sein, welche zu einem geringeren Signal ADP-ribosylierter Proteine führt. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte keine proteinübergreifende Veränderung der ADP-Ribosylierung in HCoV-229E-infizierten Zellen detektiert werden. Die prominentesten ADP-ribosylierten Proteine mit Molekularmassen von ca. 70 und 50 kDa stimmten jedoch in beiden Zelltypen überein. Eine ADP-Ribosylierung des HCoV-229E-N-Proteins (50 kDa) in MRC-5- und in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32) wird anhand der Proteingröße und der in Kombination verwendeten Antikörper angenommen. Für andere Coronaviren wie MHV, PEDV, SARS-CoV und MERS-CoV wurde bereits zuvor eine ADP-Ribosylierung des N-Proteins nachgewiesen [Grunewald *et al.*, 2018]. Eine gesteigerte N-Proteinmenge sowie eine stärkere ADP-Ribosylierung konnte nach der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1357Q in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen detektiert werden (Abbildung 4-32). Dies ist in Übereinstimmung mit vorherigen Studien, die zeigen konnten, dass diese MacD-Mutanten keine bzw. eine reduzierte De-ADP-Ribosylierungsaktivität an einem Testsubstrat *in vitro* besitzen [Hartmann, 2023]. Auffällig ist jedoch, dass nach der Infektion mit HCoV-229E_N1305A, dessen MacD ebenfalls eine reduzierte De-ADP-Ribosylierungsaktivität besitzt, eine geringere (ADP-ribosylierte) N-Proteinmenge detektiert wurde. Die gefundenen Unterschiede hinsichtlich der Proteinmenge und der ADP-Ribosylierung des N-Proteins in Zellen, die mit HCoV-229E oder den unterschiedlichen MacD-Mutanten infiziert wurden, sollten in der Zukunft näher analysiert werden. Zusätzlich könnte die Charakterisierung weiterer ADP-ribosylierter Proteine mittels Massenspektrometrie ggf. nach vorheriger Anreicherung modifizierter Proteine mittels Immunpräzipitation erfolgen [Nowak *et al.*, 2020]. Darüber hinaus könnten Interaktionspartner identifiziert werden, welche an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind und ggf. durch eine (limitierte) De-ADP-Ribosylierungsaktivität der viralen MacD beeinflusst werden.

Neben viralen Proteinen können auch zelluläre Proteine, wie beispielsweise PARPs, FRA1 oder TBK1 ADP-ribosyliert werden [Masaoka *et al.*, 2012, Yamada *et al.*, 2016, Manetsch *et al.*, 2023]. Ausgewählte Signalwege der Immunantwort wurden im Kontext mit einer möglichen Regulation durch PARP7 näher betrachtet. Ein wichtiger Signalweg umfasst die Interaktion von TBK1 und IRF3, wodurch IFNs und ISGs induziert werden. Basierend auf den vorangegangenen Genexpressionsanalysen wurden TBK1- und IRF3-Proteinlevel in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen analysiert. Die Stabilität und Aktivität von TBK1 kann durch verschiedene posttranslationale Modifikationen, unter anderem durch ADP-Ribosylierung, beeinflusst werden. Der Nachweis dieser Modifikation ist technisch anspruchsvoll und wurde im Rahmen dieser Arbeit in keinem Zelltyp untersucht. Während auf mRNA-Ebene durch die HCoV-229E-Infektion TBK1 vermehrt detektiert wurde, konnte auf Proteinebene ein Rückgang um ca. 20 % (nicht signifikant) in infizierten MRC-5-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-31). In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde TBK1-mRNA

Diskussion

durch die Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357S und HCoV-229E_N1357Q vermehrt detektiert. Auf Proteinebene konnte ebenfalls keine signifikante Änderung der Proteinmenge durch die Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten detektiert werden. Übereinstimmend mit den Ergebnissen für MRC-5-Zellen zeigen andere Studien, dass eine SARS-CoV-2-Infektion zu einer geringeren TBK1-Proteinmenge führt. Eine Degradation kann dabei beispielsweise durch die Bindung mit dem viralen M-Protein über den Ubiquitin-Signalweg erfolgen [Sui *et al.*, 2021]. Auch andere virale Proteine (nsp6 und nsp13) können TBK1 binden und dessen Phosphorylierungsaktivität inhibieren [Xia *et al.*, 2020]. Als Teil der Immunantwort erfolgt die Expression von IFNs und ISGs durch die Translokation des phosphorylierten IRF3 in den Zellkern [Yamada *et al.*, 2016, Rasmussen *et al.*, 2023]. Selbst bei gleichbleibender TBK1-Proteinmenge kann die TBK1-vermittelte Phosphorylierung von IRF3 durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst sein.

Eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes von IRF3 wurde in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen detektiert (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32). Intrazellulär liegt IRF3 in nicht-phosphorylierter, hypo- und/oder hyperphosphorylierter Form vor. Hypophosphoryliertes IRF3 wird als voraktiver Zustand bezeichnet. Eine Hyperphosphorylierung ist durch die Modifikation von mindestens drei Aminosäuren (Ser339, Ser386 und Ser396) gekennzeichnet [Robitaille *et al.*, 2016]. In MRC-5-Zellen konnten mittels Western Blot drei Signale detektiert werden, wobei davon ausgegangen wird, dass es sich dabei um die nicht-phosphorylierte, die hypo- und die hyperphosphorylierte Form handelt. In HCoV-229E-infizierten Proben wurde (im Vergleich mit nicht infizierten MRC-5-Zellen) die hyperphosphorylierte Form vermehrt und hypophosphoryliertes IRF3 verringert detektiert. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit der Literatur, da durch verschiedene Stressfaktoren, wie eine virale Infektion, eine Phosphorylierung aktiviert wird, wodurch hyperphosphoryliertes IRF3 als Dimer im Zellkern zur Aktivierung von IFNs führt. Dafür entscheidend ist eine spezifische Phosphorylierung von Serin bzw. Threonin [Servant *et al.*, 2001, Clément *et al.*, 2008]. Interessanterweise wird IRF3-mRNA in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen im Vergleich mit nicht infizierten Zellen verringert detektiert. Der Microarray-Datensatz zeigt darüber hinaus eine verringerte Expression nach Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S. Au *et al.* konnten zeigen, dass eine konstante IRF3-Expression unabhängig von einer Infektion unter anderem in HeLa-Zellen erfolgt. Allerdings wurde die Versuchsreihe mit dem Newcastle-Disease-Virus (NDV) in einem Zeitraum von bis zu 24 hpi durchgeführt [Au *et al.*, 1995]. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass MRC-5-Zellen, trotz erhöhter PARP7- bzw. TBK1-mRNA-Level und einer verringerten IRF3-Expression, sowohl die TBK1-Proteinmenge relativ konstant halten als auch die Phosphorylierung von IRF3 als Teil der Immunantwort ermöglichen (Abbildung 4-30). Diese Beobachtung ist zelltypabhängig, da in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen eine Veränderung des Phosphorylierungszustandes von IRF3 in infizierten Proben beobachtet wurde. In HCoV-229E-infizierten Zellen wurde hierbei weniger hypophosphoryliertes IRF3-Protein, aber kein vermehrt hyperphosphoryliertes IRF3-Protein detektiert (Abbildung 4-32). Überraschenderweise konnten jedoch nach Infektionen mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q

Diskussion

erhöhte Mengen hyperphosphorylierten IRF3-Proteins im Vergleich mit hypophosphoryliertem IRF3-Protein in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen detektiert werden. Diese Daten legen den Schluss nahe, dass alle HCoV-229E-MacD-Mutanten die (auch bei vielen anderen Virusinfektionen beobachtete) Phosphorylierung von IRF3 induzieren, während HCoV-229E (mit seiner aktiven MacD) offenbar in der Lage ist, eine IRF3-vermittelte Immunantwort in diesen Zellen zu unterdrücken. Diese Schlussfolgerung widerspiegelt sich jedoch nicht in den gemessenen Virustitern, die keine signifikante Titerreduktion nach Infektionen mit den MacD-Mutanten im Vergleich mit HCoV-229E ergeben hatten. Dies weist daraufhin, dass weitere (antivirale) Signalwege durch HCoV-229E reguliert werden, um (unabhängig von der MacD) eine effiziente Virusreplikation in Zellkultur sicherzustellen. Andere Studien zeigen, dass 24 h nach Infektion mit Sendavivirus, einem RNA-Virus, in A549- und THP-1-Zellen eine verringerte IRF3-Proteinmenge detektiert wird. In Übereinstimmung mit den gezeigten NGS-Daten (im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Proben) konnte auch Wu *et al.* keine signifikante Regulation auf mRNA-Level detektieren [Wu *et al.*, 2021].

Ein indirekter Einfluss auf die IRF3-Aktivierung wurde für FRA1 in anderen Studien beschrieben, obwohl bisher kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Proteinen gezeigt wurde. Bekannt ist, dass FRA1 als negativer Regulator bei der Synthese von Typ-I-IFNs wirken kann [Cai *et al.*, 2017]. Mittels NGS konnte für FRA1 eine gesteigerte Expression nach der Infektion mit HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten nachgewiesen werden. Eine signifikant erhöhte Expression wurde in HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen detektiert (Abbildung 4-25, Anhang Abbildung 7-13). Eine verringerte Proteinmenge wurde im Vergleich mit nicht infizierten Proben in allen infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen detektiert (Abbildung 4-32). Bekannt ist, dass FRA1 durch PARP7 stabilisiert und dessen Degradation im Proteasom verhindert wird [Manetsch *et al.*, 2023]. Sowohl PARP7 als auch FRA1 wurden auf mRNA-Ebene vermehrt exprimiert. Allerdings ist die erhöhte FRA1-Expression mit einer verringerten Proteinmenge assoziiert. Auffällig war dabei, dass die FRA1-Proteinmenge insbesondere bei denjenigen HCoV-229E-MacD-Mutanten am geringsten war, die nach einer Infektion zur größten Anzahl differentiell regulierter Gene geführt hatten. Dies könnte beispielsweise darauf hindeuten, dass das FRA1-Protein durch andere (antivirale) Signalwege gehemmt bzw. degradiert wird.

5.4 Auswirkungen eines PARP7-Knockdowns auf die HCoV-229E-Infektion

Insbesondere durch die Analyse der Genexpression und ausgewählter Proteine wurde ein Zusammenhang zwischen der zelltypunabhängigen PARP7-mRNA-Expression und der Immunantwort in infizierten Zellen vermutet. Um den Einfluss von PARPs, insbesondere PARP7, zu analysieren, wurde versucht, verschiedene PARP-Knockout-Zelllinien zu generieren. Die Verwendung eines lentiviralen CRISPR-Cas9-Systems führte nach der Transduktion unabhängig von dem verwendeten Zielgen zu Wachstumsdefiziten in MRC-5-Zellen. Die Transfektion von kommerziell erworbenen siRNAs für PARP7 und PARP9 resultierte in unspezifischer mRNA-

Diskussion

Regulation dieser PARPs (Daten nicht gezeigt). Auf Grund dieser Beobachtungen wurden keine PARP7-veränderten MRC-5-Zellen für weitere Analysen verwendet.

A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnten ohne Veränderung des Phänotyps transduziert werden. Der Nachweis eines *Knockouts* bzw. *Knockdowns* sollte auf Proteinebene erfolgen. Für die Detektion von PARP7 wurden verschiedene Antikörper getestet. Ausschließlich mit einem Antikörper der Firma Abcam (ab84664) gelang ein spezifischer Nachweis dieses Proteins. Der Vergleich der drei verwendeten sgRNAs zu A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, die nicht mit einer sgRNA inkubiert wurden, zeigte eine deutlich verminderte Proteinmenge bei Verwendung der sgRNA3 (Abbildung 4-33A). Da der zunächst verwendete Antikörper inzwischen nicht mehr verfügbar ist, konnte leider keine umfassendere Validierung auf Proteinebene erfolgen. Allerdings erfolgte eine Überprüfung der PARP7-Sequenz. Dabei konnte eine Leserasterverschiebung im PARP7-Gen in sgRNA3-transduzierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 4-33B). Dies lässt darauf schließen, dass in diesen Zellen die Translation der mutierten mRNA zu einem massiv verkürzten und damit dysfunktionalen PARP7-Protein führt. Das angestrebte Ziel wurde auch durch ein geeignetes Design der verwendeten sgRNAs unterstützt, wobei alle verwendeten sgRNAs (an unterschiedlichen Positionen) im ersten Exon dieses Gens banden.

Die erzeugten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden hinsichtlich der Replikation von HCoV-229E und den davon abgeleiteten HCoV-229E-MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD verglichen (Abbildung 4-34, Abbildung 4-4). Beide Zelllinien wurden mit HCoV-229E infiziert und 48 hpi wurden Virustiter von 10⁶ PFU/ml gemessen. Auffällig war, dass ein um eine log-Stufe geringerer Virustiter 48 hpi für HCoV-229E-MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass der PARP7-KD scheinbar keinen entscheidenden Einfluss auf die Virusreplikation nimmt, da die erzielten Virustiter in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit normalen oder reduzierten PARP7-Konzentrationen nur geringfügig voneinander abwichen. Allerdings bleibt die Frage offen, weshalb die Expression von PARP7 zelltypunabhängig durch die Infektion erhöht ist. Eine mögliche Ursache könnte die Regulation anderer Gene im Rahmen der Immunantwort sein. Daher wurden die differentiell regulierten Gene in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD gegenübergestellt.

5.4.1 PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD

Durch den PARP7-KD wurde eine größere Anzahl an Genen differentiell reguliert (Abbildung 4-35). In HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden mehr als fünffach mehr Gene differentiell exprimiert. Übereinstimmend mit vorherigen Analysen zeigte sich die größte Ähnlichkeit hinsichtlich der zellulären Genexpression bei Zellen, die mit HCoV-229E oder HCoV-229E_N1305A infiziert wurden. Infektionen mit den anderen HCoV-229E-MacD-Mutanten führten zu deutlich mehr differentiell exprimierte Genen in diesen Zellen. Insbesondere HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S wiesen untereinander ein ähnliches Expressionsprofil auf. Eine ähnliche Regulation zeigten auch HCoV-229E_ΔMacD-

Diskussion

infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Nach der Infektion mit den MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden 323 Gene detektiert, die auch in HCoV-229E-infizierten Proben reguliert wurden. Allerdings konnte in Übereinstimmung mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD eine Vielzahl regulierter Gene für HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S sowie auch für HCoV-229E_ΔMacD nachgewiesen werden (Abbildung 4-35C). Durch die übereinstimmend vermehrte Expression von 148 Genen nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S konnte die Relevanz dieses Asparagin-Rests auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD gezeigt werden. Dabei sollte beachtet werden, dass bei allen verwendeten Viren eine signifikant vermehrte PARP7-Expression mittels RT-qPCR und NGS detektiert wurde (Abbildung 4-36, Abbildung 4-37, Abbildung 4-38, Anhang Abbildung 7-25). Gemeinsam ist beiden Methoden, dass die Expression von PARP7 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD nach Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A geringer ist als in HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- oder HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen. Trotz einer vermehrten Expression führt die KD-assozierte Veränderung des Leserasters der gebildeten mRNAs zu unvollständigen und deshalb dysfunktionalen PARP7-Protein-Varianten. Diskutiert wird, ob fehlende bzw. funktionsunfähige PARPs durch die vermehrte Expression anderer PARPs ausgeglichen werden können. Für PARP9 und PARP14 konnte ein solches Zusammenspiel bereits gezeigt werden [Iwata *et al.*, 2016]. Daher wurde auch die Expression der verbleibenden 16 PARPs analysiert. Durch die Infektion mit HCoV-229E konnte zusätzlich PARP13S vermehrt nachgewiesen werden. Abhängig von der für die Infektion verwendeten MacD-Mutante wurden PARP5a, PARP6, PARP8, PARP9, PARP10, PARP12 und PARP14 zusätzlich vermehrt exprimiert. Auffällig war, dass die meisten PARPs nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S differentiell exprimiert wurden. Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen detektiert werden. Das bedeutet, dass eine gesteigerte Expression der PARPs vermutlich im Zusammenhang mit dem PARP7-KD steht. Ein direkter Zusammenhang zwischen PARP7 und einem anderen PARP konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden.

5.4.2 Regulation PARP7-assoziierter Gene in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD

Analog erfolgte die Analyse von PARP7-assozierten Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Nach der Infektion mit HCoV-229E wurden im Vergleich mit Zellen ohne PARP7-KD p50, MDA5 und RIG-I vermehrt exprimiert (Abbildung 4-39A). Diesen drei Genen gemeinsam ist ihre Beteiligung an der NF-κB-assozierten Signalübertragung. IRF7 und FRA1 wurden unabhängig von einem PARP7-KD vermehrt exprimiert (Abbildung 4-24A). Durch einen PARP7-KD wurden mehr Gene differentiell reguliert. Das bedeutet, dass PARP7 eine Rolle bei der Unterdrückung von (antiviralen) Signalwegen besitzen könnte. Diese Hypothese wird auch durch die gefundene vermehrte Expression von Komponenten des NF-κB-Signalweges gestützt. Die Infektionen mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S zeigten übereinstimmend

Diskussion

eine vermehrte Expression von FRA1 im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Abhängig von der verwendeten MacD-Mutante wurden zusätzlich p50, IRF7, FRA1, MDA5, RIG-I und/oder IKBKE vermehrt detektiert (Anhang Abbildung 7-15, Abbildung 7-24). Sowohl für die Infektion mit HCoV-229E als auch für die Infektion mit den MacD-Mutanten wurden ähnliche Genexpressionsprofile für Zellen ohne oder mit PARP7-KD erfasst. Keine veränderte Regulation konnte nach Infektion mit HCoV-229E_N1357Q im Vergleich der beiden Zelllinien gezeigt werden. Für HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S wurden ebenfalls die gleichen Gene vermehrt exprimiert und die Anzahl regulierter Gene war ähnlich (Abbildung 4-40, Anhang Abbildung 7-26). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine fehlerhafte PARP7-Expression, welche zu einer geringeren Proteinmenge und/oder nicht funktionsfähigen Proteinen führt, einen Einfluss auf die Immunantwort nimmt. Möglicherweise werden PARP7-assoziierte Funktionen (wie beispielsweise bestimmte Proteinmodifikationen) von anderen Proteinen übernommen oder andere PARP7-unabhängige Signalwege verstärkt aktiviert. Um den Einfluss eines PARP7-KD auf die Proteinregulation zu prüfen, wurden ausgewählte Proteine mittels Western Blot analysiert.

5.4.3 Proteinregulation in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD

ADP-ribosylierte Proteine unterschiedlichster Größe konnten nachgewiesen werden (Abbildung 4-41). Die stärksten Signale konnten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD bei 70 bzw. 50 kDa erfasst werden (wie bereits zuvor in den genetisch unveränderten parental Zellen). Letzteres wird insbesondere aufgrund der Größe und den verwendeten Antikörpern mit dem viralen N-Protein assoziiert. Die Daten zeigen, dass PARP7 keine signifikanten Auswirkungen auf die ADP-Ribosylierung des viralen N-Proteins hat und somit nicht bzw. nicht allein für die ADP-Ribosylierung dieses viralen Proteins verantwortlich ist. Derzeit kann das ADP-ribosylierte Protein bzw. die Proteine mit einer Größe von etwa 70 kDa keinem bekannten Protein zugeordnet werden. Für eine Identifizierung dieses und weiterer Proteine könnte eine Analyse mittels Massenspektrometrie durchgeführt werden.

Anhand der Ergebnisse der Western Blots kann festgehalten werden, dass PARP9 nicht die Proteinfunktion von PARP7 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD übernimmt, da PARP9 nicht bzw. kaum detektiert wurde. Dies schließt allerdings nicht das mögliche Zusammenspiel anderer PARPs aus, um das Fehlen von PARP7 auszugleichen.

In infizierten Zellen wurde eine geringere FRA1-Proteinmenge als in nicht infizierten Zellen unabhängig von der Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten detektiert. Dies deutet auf eine reduzierte Proteinmenge durch eine Infektion hin. Die gefundene gesteigerte Expression von FRA1-mRNA korreliert somit nicht mit einer erhöhten FRA1-Proteinmenge. Möglicherweise ist auch in diesem Fall der bekannte translationale „Shutdown“ in coronavirusinfizierten Zellen für diese Diskrepanz verantwortlich, der zu einer präferentiellen Translation viraler gegenüber zellulärer mRNAs führt. Weitere Faktoren könnten sein, dass durch den PARP7-KD die Stabilisierung von FRA1 ausbleibt, sodass FRA1 degradiert wird [Manetsch et

Diskussion

al., 2023]. Dadurch erfolgt keine negative Regulation des Typ-I-IFN-Signalweges und der gebildete Komplex aus TBK1, TRAF3 und TRIF führt zur Phosphorylierung von IRF3 [Cai *et al.*, 2017]. TBK1 konnte in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD nach der Infektion mit HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten detektiert werden (Abbildung 4-41). Allerdings erscheint die Proteinmenge in HCoV-229E_ΔMacD- und HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen erhöht, obwohl auf mRNA-Ebene nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S eine vermehrte TBK1-Expression detektiert wurde. Auffällig ist, dass bei einer höheren TBK1-Proteinmenge eine höhere Menge nicht-phosphoryliertes und hyperphosphoryliertes IRF3 detektiert wurde. In HCoV-229E- und HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen wurde das stärkste Signal innerhalb der einzelnen Proben für hyperphosphoryliertes IRF3 detektiert. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine IRF3-Phosphorylierung in allen infizierten Zellen erfolgt. Dabei steht jedoch in Zellen, die mit HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A infiziert wurden, mehr nicht-phosphoryliertes Protein zur Verfügung.

5.5 Wachstumsanalyse von HCoV-229E in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung

Durch eine Infektion werden antivirale Signalwege innerhalb der Wirtszelle aktiviert. Diese resultieren unter anderem in der Freisetzung von IFNs, welche benachbarte Zellen bereits vor der Infektion in Alarmbereitschaft, einen sogenannten antiviralen Status, versetzen können. Dieser Mechanismus kann durch die Vorbehandlung mit IFNs imitiert werden. Als Teil der angeborenen Immunantwort werden Typ-III-IFNs an der Epitheloberfläche gebildet. Insbesondere bei einer (RNA-) Virusinfektion mit einer höheren Viruspartikelmenge werden zusätzlich Typ-I-IFNs freigesetzt [Zhang *et al.*, 2008, Kikkert, 2020]. Bei unterschiedlichen Coronaviren wurde übereinstimmend eine abgeschwächte und/oder verzögerte Typ-I-IFN-Antwort beobachtet. Dabei begünstigt beispielsweise eine Blockade der IRF3-vermittelten IFN-β-Produktion die Virusreplikation [Spiegel *et al.*, 2005, Kuri *et al.*, 2009, Kuri & Weber, 2010]. Unterschiedliche Studien belegen, dass eine IFN-β-Behandlung vor allem zu Beginn der Infektion die Replikation von CoVs hemmen kann [Thiel & Weber, 2008, Felgenhauer *et al.*, 2020, Mary *et al.*, 2020]. Allerdings haben Coronaviren verschiedene Mechanismen entwickelt, um der antiviralen Immunantwort der Wirtszelle zu entgehen (Kapitel 1.6). Unter anderem wird die Induktion von IFN-β und die Aktivierung des NF-κB-Signalweges durch M^{pro}-vermittelte Spaltungen spezifischer zellulärer Proteine unterdrückt [Martínez-Vendrell *et al.*, 2025]. Andere Studien beschreiben eine inhibierte IFN-Antwort in Abhängigkeit von der MacD bzw. deren enzymatischer Aktivität [Kuri *et al.*, 2011, Alhammad *et al.*, 2023, Pfannenstiel *et al.*, 2025].

5.5.1 IFN-abhängige Replikation von HCoV-229E in MRC-5-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Replikation von HCoV-229E in Abhängigkeit von Typ-I- (IFN-α und IFN-β) und Typ-III- (IFN-λ) IFN in humanen Fibroblasten analysiert. Dabei wurde eine signifikante Verringerung des Virustiters 24 und 48 hpi nach der Vorbehandlung mit 100 U IFN-β1 pro ml detektiert (Abbildung 4-1). Dies stimmt mit anderen Studien überein, die bereits zeigen

Diskussion

konnten, dass MRC-5-Zellen durch die Zugabe von Typ-I-IFN in einen antiviralen Status versetzt werden und die Infektion mit HCoV-229E verringert wird. Darüber hinaus wurde eine Verringerung der Replikation nach Behandlung mit IFN- α beschrieben [Duncan *et al.*, 2023]. Im Gegensatz zu diesen früheren Daten konnte im Rahmen dieser Arbeit kein reduzierter Virustiter nach einer Vorbehandlung der MRC-5-Zellen mit 100 U/ml IFN- α 2 detektiert werden (Abbildung 4-1). Dies deutet darauf hin, dass MRC-5-Zellen nicht IFN- α 2-sensitiv bei der verwendeten Virusmenge oder der verwendeten Interferonkonzentration von 100 U/ml sind. Für die fünffache Menge IFN- α konnte Duncan *et al.* zeigen, dass die Replikation von HCoV-229E bei einer MOI von 0,01 verzögert stattfindet [Duncan *et al.*, 2023]. Zelltypabhängig besitzt sowohl IFN- α als auch IFN- λ eine antivirale Wirkung gegenüber unterschiedlichen CoVs, wie z. B. HCoV-229E, SARS-CoV und MERS-CoV [Kuri *et al.*, 2011, Hamming *et al.*, 2013]. Im Rahmen von SARS-CoV-2-Infektionen wurden bei später genesenen Patienten höhere IFN- λ 1-Konzentrationen gemessen als in Patienten, die an dieser Infektion verstarben. Diese Beobachtung legt nahe, dass IFN- λ 1 bei einer COVID-19-Erkrankung einen positiven Einfluss auf die Genesung besitzt [Fallah Vastani *et al.*, 2022]. Wie erwartet konnte keine IFN- λ 1-induzierte Virustiterverminderung in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen detektiert werden, da Fibroblasten den benötigten Rezeptor (IFNRL1) nicht exprimieren [Meager *et al.*, 2005, Stoltz and Klingström, 2010, Hermant & Michiels, 2014]. Für alle nachfolgenden Analysen wurde deshalb ausschließlich eine IFN- β 1-Behandlung 16 h vor der Infektion durchgeführt und deren Auswirkungen auf die virale Replikation sowie die zelluläre Genexpression und Proteinregulation analysiert.

Darüber hinaus wurden HCoV-229E-MacD-Mutanten verwendet, um mögliche Zusammenhänge zwischen einer reduzierten oder fehlenden De-ADP-Ribosylierungsaktivität der viralen MacD und den beobachteten Effekten der IFN- β 1-Behandlung zu bestimmen. Eine IFN- β -Vorbehandlung führte zu einer inhomogenen Verteilung der HCoV-229E-Infektion auf dem Zellrasen (Abbildung 4-2B1, Abbildung 4-2B2), welche sich zusätzlich in einem reduzierten Virustiter (10^4 - 10^5 PFU/ml) widerspiegelte (Abbildung 4-3). Eine Behandlung HCoV-229E-infizierter MRC-5-Zellen führte zu einem verzögerten Anstieg des Virustiters im Zeitraum von 8 bis 96 hpi.

Die Behandlung führte 48 hpi bei allen verwendeten Viren (HCoV-229E, HCoV-229E_ Δ MacD, HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_H1310A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) zu signifikant verringerten Virustitern in MRC-5-Zellen (Abbildung 4-3B). Die MacD-Mutanten zeigten mit Ausnahme von HCoV-229E_ Δ MacD einen um bis zu zwei log-Stufen niedrigeren Virustiter als HCoV-229E. Die MacD-Deletion wies die höchste IFN- β -Sensitivität, mit einem um fünf log-Stufen verringerten Virustiter, auf. Verringerte Virustiter durch die IFN- β -Zugabe wurden auch in MHV-infizierten Makrophagen aus dem Knochenmark (engl. *bone marrow-derived macrophages*, BMDM) beschrieben. Grunewald *et al.* zeigten ähnliche Verringerungen im Vergleich von MHV und MHV_N1347A [Grunewald *et al.*, 2019]. Die in dieser MHV-MacD-Mutante vorhandene Alanin-Substitution eines konservierten Asparaginrestes im aktiven Zentrum der MacD entspricht exakt derjenigen der in dieser Arbeit verwendeten MacD-Mutante HCoV-229E_N1305A. Eine erhöhte IFN-Sensitivität konnte auch in SARS-CoV-2_ Δ MacD1-infizierten Calu-3-Zellen von Alhammad *et al.* gezeigt werden.

Diskussion

Interessanterweise konnte dabei kein signifikanter Unterschied gegenüber SARS-CoV-2-infizierten Zellen nach einer IFN- β -Vorbehandlung mit bis zu 500 U detektiert werden. Allerdings wurde eine IFN- γ -Sensitivität nachgewiesen [Alhammad *et al.*, 2023]. In Übereinstimmung zeigen diese Daten, dass eine Vorbehandlung mit IFNs zu einer verringerten Replikation von CoVs führt. Einige der zuvor verwendeten MacD-Mutanten wurden in einem zusätzlichen Zelltyp verwendet, um mögliche zelltypabhängige Unterschiede in der Virusreplikation charakterisieren zu können.

5.5.2 IFN- β -abhängige Replikation von HCoV-229E in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Reduzierte Virustiter konnten für MacD-Mutanten zelltypunabhängig auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nachgewiesen werden. Mikroskopische Aufnahmen der A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, wie auch der MRC-5-Zellen, zeigten eine durch die IFN- β -Behandlung verursachte inhomogene Verteilung infizierter Zellen (Abbildung 4-5B1, Abbildung 4-5B2). Analog zu unbehandelten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte eine Syncytiumbildung detektiert werden. Eine antivirale Wirkung von IFNs, insbesondere von IFN- β , ist in A549-Zellen auch für verschiedene andere Viren, beispielsweise Blauzungenvirus, Rhinovirus und Zika-Virus, beschrieben worden. Dabei wurden Konzentrationen von 31-1000 U/ml IFN- β verwendet [Gaajetaan *et al.*, 2013, Doceul *et al.*, 2014, Gobillot *et al.*, 2020]. Für HCoV-229E-infizierte Zellen konnte bei einer Konzentration von 100 U/ml eine gehemmte Virusreplikation nachgewiesen werden (Abbildung 4-4). Darüber hinaus wurde für HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q 48 hpi eine signifikante Verringerung des Virustiters durch IFN- β detektiert. Die Ergebnisse für HCoV-229E_N1305A sind in Übereinstimmung mit der Literatur. Bei SARS-CoV führte diese Mutation zu einer verringerten Replikation und einer gesteigerten IFN-Sensitivität [Kuri *et al.*, 2011]. In BMDMs konnte für MHV mit dieser Mutation ebenfalls eine verringerte Replikation, eine gesteigerte IFN-Sensitivität sowie eine Veränderung der PARP-Expression beobachtet werden [Grunewald *et al.*, 2019]. HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S zeigten eine (nicht signifikant) reduzierte Replikation durch eine IFN- β -Vorbehandlung. Andere Studien weisen bei der Infektion von A549^{ACE2+/TMPRSS2+}-Zellen mit SARS-CoV-2 und einer IFN- β -Vorbehandlung (170 U/ml) 24 hpi eine signifikant verringerte Virusreplikation auf [Magalhães *et al.*, 2023]. In Tumorzellen kann das Zellwachstum und zelluläre (antivirale) Signalwege durch die IFN- β -Exposition beeinflusst sein [Hiebinger *et al.*, 2023]. Inwieweit die zusätzlich überexprimierten Gene (CD13, TMPRSS2) Auswirkungen auf zelluläre Funktionen und den Infektionsverlauf haben, ist nicht bekannt. Für die Infektion mit HCoV-229E ist die Expression des Rezeptors (CD13) und der Serinprotease allerdings erforderlich, um die effiziente rezeptorvermittelte Virusaufnahme und Aktivierung der Fusionsaktivität des viralen S-Proteins an der Plasmamembran zu ermöglichen. Zusätzlich sollte allerdings beachtet werden, dass CD13 in Krebszellen unter anderem die Signalweiterleitung beeinträchtigen kann. Darüber hinaus sind Auswirkungen auf die Zellmigration, Protein-Protein-Interaktionen und Signaltransduktionen möglich [Lendeckel *et al.*, 2023].

Neben A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde ein weiterer Tumorzelltyp (Huh-7-Zellen) analog vorbehandelt und/oder mit HCoV-229E infiziert. Dabei konnte keine IFN- β -induzierte Virustiterverringering detektiert werden (Anhang Abbildung 7-22). Dies steht im Kontrast zu

Diskussion

Ergebnissen von SARS-CoV-2-infizierten Huh-7-Zellen. Durch eine Vorbehandlung mit 100 U IFN- β konnten Chen *et al.* verringerte Virustiter detektieren [Chen *et al.*, 2021]. Eine mögliche Erklärung dafür können Schwankungen der spezifischen Aktivität des kommerziell erworbenen IFN- β , die auch innerhalb dieses Projektes beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt) oder eine virusspezifische IFN-Sensitivität sein. Studien konnten nach einer IFN- β -Behandlung von A549- oder Huh-7-Zellen mit anschließender Virusinfektion eine veränderte Genexpression, eine Induktion antiviraler microRNAs oder ISGs nachweisen [Melén *et al.*, 2000, Brownell *et al.*, 2013, Gaajetaan *et al.*, 2013, Chen *et al.*, 2021, Alalem *et al.*, 2023]. Um einen Überblick über die zelluläre Genregulation während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von IFN- β zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse für IFN- β -behandelte MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen durchgeführt.

5.6 Welchen Einfluss hat eine IFN- β -Vorbehandlung auf die Genexpression während der HCoV-229E-Infektion?

Die Auswirkungen einer IFN- β -Vorbehandlung auf die Genexpression wurden in infizierten MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen analysiert. Für beide Zelltypen wurde je eine Heatmap als Gesamtübersicht erstellt (Abbildung 4-8A, Abbildung 4-14A).

5.6.1 Genexpression in IFN- β -vorbehandelten HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

Eine erste Übersicht differentiell regulierter Gene (p -Wert $\geq 1,3$ und Log2FoldChange ≥ 2 bzw. ≤ -2) wurde als Heatmap in Abbildung 4-8A für behandelte und/oder infizierte MRC-5-Zellen dargestellt. Die zelluläre Genexpression wurde dabei nach einer Vorbehandlung der Zellen mit IFN- β und nachfolgender Infektion mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E_N1305A bei einer MOI von 0,1 oder 3,0 vergleichend untersucht.

Bei einer IFN-Vorbehandlung wird davon ausgegangen, dass eine Induktion von ISGs und damit verbundenen antiviralen Signalwegen erfolgt, die zu einer reduzierten Virusreplikation (Abbildung 4-3) beitragen. Die Behandlung mit IFN- β führte in allen Proben zu einer geringeren Anzahl differentiell exprimierter Gene (Abbildung 4-8A, Abbildung 4-8C) in virusinfizierten Zellen. Bei Verwendung einer hohen MOI von 3,0 zeigte sich in infizierten MRC-5-Zellen, sowohl in unbehandelten als auch in IFN- β -behandelten Zellen, eine erhöhte Anzahl differentiell exprimierter Gene. Durch eine Interferonzugabe wurden andere bzw. zusätzliche Gene reguliert. Gleichzeitig wurden einige durch die Infektion induzierte Gene bei IFN- β -Vorbehandlung nicht mehr (signifikant) differentiell exprimiert. Es ist davon auszugehen, dass die IFN- β -Vorbehandlung zu einer reduzierten Virusreplikation führt, die wiederum eine Anpassung der zellulären Genexpression zur Folge hat. Die Auswirkungen der IFN- β -Vorbehandlung waren bei einer Infektion mit einer höheren MOI jedoch deutlich verringert. Während in unbehandelten Zellen 386 identische Gene in HCoV-229E- bzw. HCoV-229E_N1305A-infizierten Proben vermehrt detektiert wurden, konnten in IFN- β -vorbehandelten infizierten MRC-5-Zellen lediglich 7 verstärkt exprimierte Gene beobachtet

Diskussion

werden. Diese Gene (IL6, CXCL2, CXCL3, CXCL8, DDIT3, HSPA6, HERPUD1) stehen im Zusammenhang mit der stressassoziierten Immunantwort.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Genregulation sowohl von der Virusmenge, dem verwendeten Virus als auch von einer IFN- β -Behandlung abhängig ist. Durch eine verzögerte Infektion (MOI 0,1) kann eine IFN-induzierte Aktivierung benachbarter Zellen erfolgen, sodass unterschiedliche Gene bzw. Signalwege reguliert werden. Bei einer Infektion mit einer MOI von 3,0 kann von einer Infektion aller Zellen ausgegangen werden. Eine veränderte Genexpression und die damit in Verbindung stehenden Signalwege sind vom Verlauf der CoV-Infektion bzw. der verwendeten MOI abhängig [Sun *et al.*, 2020, Ding *et al.*, 2023]. Die deutlich geringere Genexpression bei Verwendung von HCoV-229E_N1305A, einer MacD-Mutante mit abgeschwächter De-ADP-Ribosylierungsaktivität, könnte zusätzlich darauf hindeuten, dass die Aktivierung einer Vielzahl von Genen und/oder Signalwegen in MRC-5-Zellen bei einer Infektion mit dieser MacD-Mutante nicht erforderlich ist. Neben der De-ADP-Ribosylierungsaktivität könnten dabei weitere Faktoren wie die Proteinfaltung oder Protein-Protein-Interaktionen eine Rolle spielen.

5.6.2 Genexpression in IFN- β -vorbehandelten HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Nach einer IFN- β -Behandlung und anschließender Infektion mit HCoV-229E wurden in MRC-5-Zellen rund vierfach mehr Gene als in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen differentiell reguliert (Abbildung 4-8A, Abbildung 4-14A). Die geringere Anzahl differentiell exprimierter Gene in beiden IFN- β -vorbehandelten Zelltypen deutet auf eine abgeschwächte Immunantwort hin. Diese korreliert außerdem mit einer geringeren Virusreplikation in diesen Zellen (Abbildung 4-4). Auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit einer der MacD-Mutanten infiziert wurden, konnte dies beobachtet werden. Zusätzlich wurde die Expression der ISGs in unbehandelten und IFN- β -behandelten Zellen gegenübergestellt. Während die Anzahl vermehrt exprimierter ISGs in HCoV-229E-infizierten Zellen durch die IFN- β -Behandlung verdoppelt wurde, konnte lediglich eine Zunahme um 21,7 bis 40 % in mit MacD-Mutanten infizierten Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine geringere Aktivierung der Zellen in behandelten und mit MacD-Mutanten infizierten Proben hin. Den schwächsten Effekt auf die Genregulation zeigte HCoV-229E_N1305A unabhängig von einer Vorbehandlung. Eine ähnliche Anzahl regulierter Gene konnte für HCoV-229E-infizierte Zellen detektiert werden. Eine drei- bis fünffach gesteigerte Anzahl vermehrt exprimierter Gene konnte in vorbehandelten HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- bzw. HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen detektiert werden. Die MacD-Mutanten HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S wiesen in behandelten Zellen geringe Abweichungen untereinander auf. Für einen besseren Vergleich der in allen MacD-Mutanten vermehrt exprimierten Gene wurde ein UpSet-Diagramm für behandelte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen erstellt (Abbildung 4-14D). Bei Infektionen mit (allen) MacD-Mutanten wurden 60 Gene nach vorheriger IFN- β -Behandlung identifiziert, wobei 56 dieser Gene auch in Zellen nach einer Infektion mit HCoV-229E detektiert wurden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass diese Gene Teil einer allgemeinen innate Immunantwort

Diskussion

auf die Virusinfektion in IFN- β -behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen sind und ihre differentielle Expression unabhängig von der Aktivität der viralen MacD erfolgt. Auffällig ist, dass bei Infektionen mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S 147 übereinstimmende Gene in IFN- β -behandelten Zellen detektiert werden konnten. Da lediglich 13 dieser Gene auch ohne diese IFN- β -Vorbehandlung detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass eine HCoV-229E_N1357-spezifische Induktion bestimmter Signalwege in IFN- β -behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen stattfindet. Um einen detaillierteren Einblick in die Genregulation zu erhalten, wurde unter anderem die PARP-Expression in behandelten MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen analysiert, die mit HCoV-229E oder einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden.

5.6.3 Expression von PARP-mRNA in Abhängigkeit von HCoV-229E-Infektion und/oder IFN- β -Vorbehandlung

Wie zuvor gezeigt, können einige PARPs infektionsspezifisch vermehrt exprimiert werden (Kapitel 4.2, Kapitel 5.2.3). Andere werden den ISGs zugeordnet und werden durch IFN induziert [OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]. In Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und/oder HCoV-229E-Infektion wurde die Expression der 17 humanen PARPs analysiert.

5.6.3.1 IFN- β -abhängige PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

Die Reanalyse hinsichtlich der PARP-Genexpression (Anhang Abbildung 7-5, Abbildung 7-6, Abbildung 7-7) des bereits vorhandenen Microarray-Datensatzes ermöglichte einen Einblick in die deregulierten Gene in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung in infizierten MRC-5-Zellen. Sowohl RT-qPCR- (Abbildung 4-10) als auch NGS-Datensätze (Abbildung 4-9, Abbildung 4-11, Abbildung 4-12) zeigten Übereinstimmungen und (methodisch bedingte) Abweichungen hinsichtlich der Expression ausgewählter Gene (Kapitel 5.2.3.1). Die Microarray-Daten zeigten eine 6,8-fach-vermehrte Expression von PARP10 durch die IFN- β -Behandlung von MRC-5-Zellen ohne anschließende Infektion (Anhang Abbildung 7-7). Im Gegensatz dazu konnten keine IFN- β -induzierten PARPs mittels NGS detektiert werden (Abbildung 4-9). Frühere Arbeiten wiesen darauf hin, dass PARP7, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP13, PARP14 und PARP15 IFN-induziert werden können [Grunewald *et al.*, 2019]. Diese Annahme beruht auf RT-qPCR-Ergebnissen, wobei Grunewald *et al.* mit den gewählten Primerpaaren nicht alle 17 humanen PARPs detektieren konnten. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten RT-qPCR-Analysen erlaubten die Detektion aller PARPs und eine Gegenüberstellung von IFN- β - und infektionsspezifisch differentiell exprimierten PARPs. Mit Ausnahme von PARP4 konnte eine Zunahme der Expression durch IFN- β für alle PARPs detektiert werden. Allerdings ist die infektionsspezifische Genexpression einiger dieser PARPs um ein Vielfaches höher (Abbildung 4-10, Kapitel 5.2.3). Für PARP2, PARP3, PARP9, PARP10, PARP14 und PARP15 konnte dies nicht beobachtet werden. Das bedeutet, dass (übereinstimmend mit Grunewald *et al.*) eine IFN- β -vermittelte Aktivierung der Genexpression für PARP9, PARP10, PARP14 und PARP15 gezeigt werden konnte. Andere Studien haben zur Einordnung dieser PARPs, wie auch von

Diskussion

PARP5b, PARP11, PARP12, PARP13S und PARP13L, als ISGs beigetragen [OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]. Ein Teil der regulierten PARPs wurde auch bei einer Infektion von IFN- β -vorbehandelten MRC-5-Zellen induziert. Eine gesteigerte Expression von PARP7, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP13 (bzw. PARP13S) und PARP14 wurde mittels RT-qPCR, Microarray und/oder NGS-Analyse bestätigt.

Mittels NGS wurden zusätzlich MRC-5-Zellen analysiert, die mit einer MOI von 3,0 infiziert wurden (Abbildung 4-11). In IFN- β -vorbehandelten und HCoV-229E-infizierten Zellen wurde PARP7, PARP13S, PARP12, PARP9, PARP14 und PARP10 vermehrt exprimiert. Lediglich PARP10 und PARP14 wurden in MRC-5-Zellen, welche IFN- β -vorbehandelt und mit HCoV-229E (MOI 0,1) infiziert wurden, nicht vermehrt exprimiert nachgewiesen. Auffällig war dabei, dass bei einer IFN- β -Behandlung und anschließenden Infektion mit HCoV-229E_N1305A bei einer MOI von 0,1 keine signifikante PARP-Regulation erfolgt. Bei einer höheren MOI von 3,0 wurden hingegen PARP7, PARP9, PARP12, PARP14, PARP13S und PARP10 vermehrt exprimiert. Der Vergleich mit vorbehandelten HCoV-229E-infizierten Zellen zeigte nur in vorbehandelten HCoV-229E_N1305A-infizierten (MOI 0,1) Proben signifikante Unterschiede. Dabei konnte eine verringerte Expression von PARP7, PARP9 und PARP13S bestätigt werden (Anhang Abbildung 7-9). Allgemein bekannt ist, dass durch Verwendung einer höheren Virusmenge, die zu einer frühen Infektion nahezu aller Zellen der Kultur führt, eine verstärkte antivirale Immunantwort, also eine veränderte Genexpression, ausgelöst werden kann. Da sowohl die Anzahl regulierter PARPs als auch die Gesamtanzahl differentiell exprimierter Gene durch eine höhere Virusmenge ansteigt, ist davon auszugehen, dass zusätzliche Mechanismen der antiviralen Wirtsantwort und/oder virusinduzierte infektionsfördernde Prozesse aktiviert werden. Diese Auswirkungen konnten sowohl in unbehandelten als auch in behandelten MRC-5-Zellen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus zeigte die Reanalyse der Microarray-Daten, dass die Expression von PARPs abhängig von den für die Infektion verwendeten MacD-Mutanten variiert (Anhang Abbildung 7-5 bis Abbildung 7-7). Die Mutanten unterschieden sich hinsichtlich der (im Vergleich mit HCoV-229E) veränderten De-ADP-Ribosylierungsaktivität ihrer genetisch veränderten MacD [Hartmann, 2023]. Die Microarray-Datenanalyse zeigte keine Regulation der PARPs nach Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_ΔMacD in IFN- β -vorbehandelten MRC-5-Zellen. Eine vermehrte Regulation wurde für PARP11, PARP9, PARP14 und PARP7 für HCoV-229E_H1310A bzw. für PARP15, PARP7 und PARP14 für HCoV-229E_N1357S beobachtet. Im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Proben wurden PARP7, PARP11 oder PARP12 abhängig von der verwendeten MacD-Mutante verringert bzw. PARP1, PARP4 und/oder PARP15 vermehrt exprimiert. Welche Funktion die einzelnen differentiell regulierten PARPs übernehmen ist allerdings nicht oder nur teilweise bekannt (Kapitel 1.8).

5.6.3.2 IFN- β -abhängige PARP-Expression in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Um zelltypabhängige bzw. -unabhängige Auswirkungen zu charakterisieren, wurden MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung und einer HCoV-229E-

Diskussion

Infektion analysiert (Abbildung 4-14, Abbildung 4-15). Durch die Behandlung mit IFN- β konnte mittels NGS keine PARP-Regulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings wurde eine vermehrte Expression von PARP10, PARP9, PARP13S, PARP12 und PARP14 nach Vorbehandlung und anschließender HCoV-229E-Infektion gefunden. Methodenabhängig wurden diese und andere PARPs (PARP5a, PARP7, PARP8, PARP11) unter den gleichen Versuchsbedingungen ebenfalls in MRC-5-Zellen vermehrt detektiert und scheinen daher relevant für die innate Immunantwort zu sein. Bereits in früheren Studien wurden in Zellen, die mit (anderen) Coronaviren infiziert und/oder einer IFN-Behandlung unterzogen wurden, einige dieser PARPs als vermehrt exprimiert nachgewiesen. Grunewald *et al.* zeigten eine vermehrte Expression von PARP7, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP13 und PARP14 in IFN- β -behandelten MHV-infizierten BMDMs 18 hpi [Grunewald *et al.*, 2019]. Eine IFN- β -Behandlung von BMDMs ohne Infektion führt unter anderem zu einer gesteigerten Expression von PARP7, PARP8, PARP9, PARP10, PARP11, PARP12, PARP13 und PARP14 ab 2 h nach der IFN- β -Zugabe [Jeltema *et al.*, 2025]. Dies deutet darauf hin, dass ausgewählte PARPs unabhängig vom Zelltyp IFN- β -induziert werden und einen Einfluss auf die Wirtszellantwort während einer CoV-Infektion nehmen können. Möglicherweise weisen IFN-induzierte PARPs nach der IFN- β -Behandlung oder im Infektionsverlauf eine veränderte Expression auf. Dadurch könnte die PARP-Expression direkt mit der Aktivierung der Zellen im Zusammenhang stehen. Um diese Hypothese zu prüfen, sollte ein zeitabhängiger Nachweis auf mRNA-Ebene erfolgen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte allerdings der Einfluss der MacD-Mutanten auf die wirtszelluläre Genexpression im Fokus stehen. NGS-Analysen von Zellen, die mit MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S) infiziert wurden, ergaben, dass PARP9, PARP10, PARP12 und PARP14 in behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen 48 hpi übergreifend vermehrt exprimiert wurden (Abbildung 4-16, Anhang Abbildung 7-23). Für diese Gene wurde bereits in anderen Zelltypen eine gesteigerte Expression durch IFN- β -Zugabe detektiert [Jeltema *et al.*, 2025]. Die Anzahl signifikant regulierter Gene unterschied sich in unbehandelten und IFN- β -behandelten Zellen abhängig von der für die Infektion verwendeten MacD-Mutante. Im Vergleich mit vorbehandelten HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (Anhang Abbildung 7-10, Abbildung 7-23) konnte eine signifikant erhöhte Expression von PARP8 (HCoV-229E_ΔMacD) bzw. PARP7, PARP8 und PARP13S (HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) detektiert werden. Das bedeutet, dass – im Vergleich mit unbehandelten Proben – eine abgeschwächte Genexpression nach der IFN- β -Zugabe erfolgte, aber ausgewählte PARPs in mit MacD-Mutanten infizierten Zellen vermehrt exprimiert wurden. Eine besondere Rolle könnten dabei PARP7, PARP8, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13S und/oder PARP14 einnehmen. Die Funktion dieser PARPs während der Infektion ist bisher kaum aufgeklärt worden. Stellvertretend für diese PARPs wurde in dieser Arbeit PARP7, welches zelltypunabhängig nach einer HCoV-229E-Infektion vermehrt exprimiert wurde, näher betrachtet (Abbildung 4-9, Abbildung 4-12, Abbildung 4-15, Abbildung 4-16). Die infektionsbedingt gesteigerte PARP7-Expression wurde bei einer IFN- β -Vorbehandlung in deutlich abgeschwächter Form beobachtet. Der Einfluss auf die Genexpression

Diskussion

von PARP7-assoziierten Genen wurde in einer zweiten Analyse betrachtet, die den möglichen Einfluss der IFN- β -Behandlung bestimmen sollte.

5.6.4 Regulation von PARP7-assoziierten Genen in Abhängigkeit von HCoV-229E und IFN- β -Vorbehandlung

In verschiedenen Zelltypen wurde die Genregulation von PARP7-assoziierten Genen nach IFN- β -Behandlung und HCoV-229E-Infektion analysiert. Der Fokus lag dabei auf den nachfolgenden Genen: TBK1, FRA1, RIG-I, MDA5, MAVS, p50, p65, IRF1, IRF3, IRF7, NEMO, IKK α , IKK β , IKK ϵ , IKK κ , DTX3L, IFNAR1, IFNAR2, IFNLR1 und Interferone (α , β , λ).

5.6.4.1 IFN- β -abhängige Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen

Für MRC-5-Zellen konnte nach der IFN- β -Stimulation keine Regulation der ausgewählten Gene mittels NGS detektiert werden (Abbildung 4-20). Interessanterweise zeigte der Microarray-Datensatz im Gegensatz dazu eine verringerte Expression von IFNL1 und IFNAR1 sowie eine vermehrte Expression von TBK1, DTX3L, FRA1 und p65 (Anhang Abbildung 7-7). Diese Unterschiede verdeutlichen erneut die Abweichungen, die durch die unterschiedliche Sensitivität der verwendeten Methoden oder die unterschiedliche Passagezahl der verwendeten Zellen bedingt sein könnten. Zusätzlich sind die Ergebnisse ein Anzeichen dafür, dass die differentielle Expression der ausgewählten Gene teilweise nicht bzw. nicht ausschließlich durch IFN- β induziert wird.

In IFN- β -behandelten und HCoV-229E-infizierten Zellen wurde eine vermehrte IRF7-Expression mittels RT-qPCR und NGS detektiert (Abbildung 4-20, Abbildung 4-21, Abbildung 4-23). Nach einer HCoV-229E-Infektion mit einer MOI von 3,0 konnte zusätzlich eine verringerte IRF3-Expression sowie eine verstärkte TBK1-Expression in IFN- β -behandelten Zellen identifiziert werden (Abbildung 4-21). Als Teil der angeborenen Immunantwort werden IFNs und ISGs durch Protein-Protein-Interaktionen von IRF7 und TBK1 bzw. IRF3 induziert. Die Aktivität des TBK1-Proteins kann durch eine PARP7-induzierte ADP-Ribosylierung gehemmt werden, wodurch die Phosphorylierung von IRF3 bzw. IRF7 und hierdurch auch die nachfolgende Immunantwort beeinflusst wird [Yamada *et al.*, 2016]. PARP7 wurde nach einer Infektion sowohl in unbehandelten als auch in IFN- β -behandelten MRC-5-Zellen vermehrt exprimiert (Abbildung 4-9 bis Abbildung 4-11). Die Ergebnisse zeigen, dass bei der Verwendung einer höheren MOI eine differentielle Genexpression erfolgt. Insbesondere wurde die Regulation von IRF3, IRF7 und TBK1 näher betrachtet, da diese Gene mit der IFN-Produktion im Zusammenhang stehen. Durch eine erhöhte TBK1-Expression könnte die Wirtszelle versuchen, einer PARP7-induzierten Inaktivierung bzw. Degradierung des TBK1-Proteins durch eine erhöhte Synthese dieses Proteins entgegenzuwirken. Die Verringerung der IRF3-Expression deutet darauf hin, dass durch die möglicherweise limitierte Verfügbarkeit von TBK1 weniger Phosphorylierung von IRF3 stattfindet und daher keine Notwendigkeit zur weiteren IRF3-Induktion besteht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden diese Proteine mittels Immunblot näher untersucht (Kapitel 5.7).

Diskussion

Vorbehandelte MRC-5-Zellen zeigten eine geringere Genexpression PARP7-assoziiierter Gene für HCoV-229E_N1305A-infizierte Zellen im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen (Abbildung 4-22). Nur bei Verwendung einer hohen MOI von 3,0 wurden diese Gene vermehrt exprimiert, einschließlich TBK1 und IRF7. Mittels RT-qPCR konnte jedoch eine gesteigerte Expression von TBK1 in allen getesteten MacD-Mutanten nach der Infektion mit einer MOI von 0,1 nachgewiesen werden (Abbildung 4-23). Darüber hinaus wurde in IFN- β -behandelten Zellen eine verringerte Expression von IRF7 und IRF3 für die meisten MacD-Mutanten beobachtet. Insbesondere IRF7 wurde in HCoV-229E_ΔMacD-, HCoV-229E_N1305A- und HCoV-229E_N1357H-infizierten Zellen signifikant verringert exprimiert, während IRF7 in HCoV-229E_N1357Q-infizierten MRC-5-Zellen vermehrt exprimiert wurde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Mutationen in der viralen MacD zu einer veränderten wirtszellulären Immunantwort führen, zu der auch IRF3-, IRF7- bzw. TBK1-vermittelte Effekte auf die IFN-Produktion beitragen.

5.6.4.2 IFN- β -abhängige Expression von PARP7-assoziierten Genen in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Die Genexpression der zuvor beschriebenen Gene wurde analog in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mittels NGS bzw. RT-qPCR analysiert. Eine IFN- β -Behandlung dieser Zellen führte zu einer signifikanten Regulation von 43 Genen (Abbildung 4-24B). Keines der näher betrachteten Gene wurde dabei IFN- β -induziert differentiell exprimiert. Eine Vorbehandlung mit IFN- β und anschließende HCoV-229E-Infektion zeigte eine verstärkte Expression von MDA5, RIG-I, IRF7, DTX3L und weiteren 269 Genen (Abbildung 4-24C). Die vermehrte Expression von IRF7, MDA5 und RIG-I unterstützt die Hypothese, dass die Wirtszelle versucht, die (IFN-vermittelte) Immunantwort durch die Regulation (antiviraler) Gene zu aktivieren bzw. zu erhalten. Vergleicht man A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, welche mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden, fällt auf, dass die Expression der ausgewählten Gene nach der IFN- β -Behandlung in HCoV-229E_N1305A-infizierten und HCoV-229E-infizierten Proben vollständig übereinstimmt (Abbildung 4-24, Abbildung 4-25). Analog zu unbehandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen hat diese Mutation scheinbar keinen Einfluss auf die vermehrte Expression der ausgewählten Gene. Auch die Heatmap in Abbildung 4-14A zeigt eine ähnliche Genexpression. Ein abweichendes Expressionsprofil für PARP7-assoziierte Gene wurde in IFN- β -behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1357Q detektiert. Dabei wurden beispielsweise p50 und FRA1 vermehrt exprimiert (Abbildung 4-25). Die stärkste Veränderung der Genexpression wurde für die HCoV-229E_N1357Q-Infektion beobachtet. Der Vergleich mit HCoV-229E_N1357H- bzw. HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen (Anhang Abbildung 7-24) ergab die gleichen regulierten Gene und unterstützt die Vermutung, dass N1357 zur Aufrechterhaltung bestimmter Funktionen der MacD bei der Unterdrückung bzw. Umgehung antiviraler wirtszellulärer Mechanismen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen beiträgt. Der vollständige Verlust der Domäne hat einen schwächeren Effekt auf die Genregulation unabhängig von der IFN- β -Behandlung. Das bedeutet, dass eine MacD-Deletion vom Virus besser toleriert wird als eine an Position N1357 mutierte MacD. Diese Annahme wird zusätzlich durch vorherige Studien im Labor

Diskussion

Ziebuhr gestützt, bei denen nach Substitution des N1357-Kodons durch ein Alanin- oder Aspartat-Kodon im HCoV-229E-Genom keine infektiösen Viren generiert werden konnten (persönliche Mitteilung). Möglicherweise könnte dies mit einer veränderten Proteinstruktur, veränderten Protein-Protein-Interaktion und/oder Änderungen der Substratspezifität einhergehen. N1357 ist kein Bestandteil des katalytischen Zentrums der MacD, interagiert jedoch mit einigen Aminosäureresten des erweiterten aktiven Zentrums des Enzyms (Abbildung 1-4). Die Mutation könnte deshalb die Struktur der Substratbindungstasche und damit auch die Substratspezifität des Enzyms beeinflussen, wodurch in der infizierten Zelle andere Proteine de-ADP-ribosyliert werden würden als bei einer HCoV-229E-Infektion. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Punktmutation weitere Auswirkungen hat, beispielsweise auf die Struktur und mögliche Interaktionen benachbarter Domänen im HCoV-229E nsp3. Die Hypothese lokaler Strukturänderungen könnte mittels NMR-Spektroskopie (engl. *Nuclear Magnetic Resonance*) überprüft werden. Möglicherweise könnte dabei auch die Grundlage der bestätigten reduzierten De-ADP-Ribosylierungsaktivitäten bakteriell produzierter MacD-Varianten mit Substitutionen dieses Asn-Restes aufgeklärt werden [Hartmann, 2023] sowie mögliche Ursachen gefunden werden für die beobachtete zelltypabhängig veränderte Genexpression in Zellen, die mit den entsprechenden MacD-Mutanten (Asn-1357 zu Histidin, Serin und Glutamin) infiziert wurden.

Vergleicht man die vermehrt exprimierte Gene in den jeweiligen Zelltypen nach der Infektion mit HCoV-229E, führte eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β unter anderem zu einer verstärkten Expression von MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Dies lässt vermuten, dass durch die Vorbehandlung dieser Zellen IFN- β -induzierte Signalwege aktiviert werden. Diese können sowohl ähnliche Mechanismen als auch zelltypspezifische Prozesse umfassen. Interessanterweise konnten einige der vermehrt exprimierte Gene ebenfalls in differenzierten THP-1-Zellen detektiert werden (Abbildung 4-27, Kapitel 5.2.4.3). Dazu zählen abhängig von dem jeweiligen Subtyp DTX3L, IRF7, p50, RIG-I und/oder MDA5. Da die Differenzierung dieser Zellen unter Verwendung von Interleukinen bzw. IFN- γ und LSP erfolgt, können mögliche Effekte dieser Zellstimulation auf die zelluläre Genexpression nicht ohne Weiteres von den durch die HCoV-229E-Infektion ausgelösten Effekten getrennt werden. Differenzierte THP-1-Zellen sind daher kein ideales Modell für Transkriptomanalysen virusinfizierter Zellen.

Die Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten erfolgte in MRC-5-Zellen bzw. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Eine zusätzliche Behandlung mit IFN- β führte in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zu einer Expression von MDA5, RIG-I, IRF7 und DTX3L. Mittels Microarray konnte eine vermehrte Expression von MDA5 und RIG-I auch in MRC-5-Zellen nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit IFN- β zeigte in beiden Zelltypen nach der Infektion mit HCoV-229E Δ MacD oder HCoV-229E Δ N1357S eine verstärkte Expression von MDA5 und RIG-I. Bei HCoV-229E Δ N1357S-infizierten Zellen wurde zusätzlich IRF7 verstärkt exprimiert. Andere in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen getestete MacD-Mutanten (HCoV-229E Δ N1357H, HCoV-229E Δ N1357Q) zeigten eine ähnliche Genregulation wie nach der Infektion mit HCoV-229E Δ N1357S. Abschließend kann festgehalten werden, dass eine zelltypabhängige Genregulation in Zellen erfolgt, die mit HCoV-229E oder einer der HCoV-229E-MacD-Mutanten infiziert wurden. Übereinstimmend konnte dabei auch in allen

Diskussion

verwendeten Zelltypen eine Regulation der Genexpression PARP7-assoziiierter Gene beobachtet werden. Es lag daher nahe, mögliche Auswirkungen dieser veränderten Genexpression auf Proteinebene für einige ausgewählte Proteine und deren posttranslationale Modifikationen näher zu untersuchen.

5.7 Zusammenhang zwischen Proteinregulation und Genexpression während einer HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung

PARP9 wird den IFN-abhängigen PARPs zugeordnet und konnte auf mRNA- und Proteinebene nach einer IFN- β -Stimulation von MRC-5-Zellen vermehrt detektiert werden (Abbildung 4-28, Abbildung 4-29). Dies stimmt mit anderen Studien zum Einfluss von Typ-I-Interferonen auf die PARP-Regulation überein [Xing *et al.*, 2021]. Mehr als doppelt so viel PARP9-Protein wurde in IFN- β -vorbehandelten MRC-5-Zellen detektiert. Die anschließende Infektion hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmenge. Eine durch IFN- β -Behandlung erhöhte PARP9-Proteinmenge wurde ebenfalls in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nachgewiesen (Abbildung 4-32). Dies korreliert mit der zuvor nachgewiesenen erhöhten PARP9-Genexpression. Während für IFN- β -behandelte nicht infizierte bzw. HCoV-229E-infizierte Zellen etwa die gleiche Proteinmenge bestimmt wurde, wurde in Zellen, die mit den MacD-Mutanten (HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A oder HCoV-229E_N1357Q) infiziert wurden, mehr PARP9-Protein detektiert. Die katalytische Aktivität und Funktion von PARP9 ist umstritten [Hottiger *et al.*, 2010, Morales *et al.*, 2014, Challa *et al.*, 2021]. Es gibt jedoch Hinweise, dass PARP9 die innate Immunantwort, wie beispielsweise die STAT1-vermittelte ISG-Aktivierung durch die Komplexbildung mit anderen zellulären Proteinen (z. B. mit DTX3L) beeinflussen kann [Zhang *et al.*, 2015, Kar *et al.*, 2024]. Die gefundene vermehrte Expression von DTX3L in IFN- β -behandelten MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen könnte ein Indiz für diese Komplexbildung sein (Abbildung 4-24, Abbildung 4-25).

In MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden ausgewählte Proteine antiviraler Signalwege bzw. deren posttranslationale Modifikation analysiert. Der Nachweis von ADP-ribosylierten Proteinen erfolgte mit Hilfe eines Antikörpers, der MAR- und PARYlierung detektieren kann (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32). Durch die Vorbehandlung mit IFN- β wurde die Virusreplikation gehemmt, sodass weniger virales MacD-Protein für De-ADP-Ribosylierungen von Proteinsubstraten zur Verfügung steht, wodurch ein stärkeres Signal für ADP-ribosylierte Proteine erwartet wurde. Diese Annahme konnte in MRC-5-Zellen bestätigt werden (Abbildung 4-30). Eine gesteigerte ADP-Ribosylierung könnte auch durch Aktivitäten IFN-induzierter PARPs, wie beispielsweise PARP9, verursacht werden. Dafür ergaben sich keine Anhaltspunkte, da eine IFN- β -Vorbehandlung von (nicht infizierten) Zellen keine Erhöhung der Steady-state-Level ADP-ribosylierter Proteine zur Folge hatte. Auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte keine wesentliche Veränderung des Musters zellulärer ADP-ribosylierter Proteine in Abhängigkeit von einer IFN- β -Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 4-32). Eine Ausnahme bildete ein prominentes Protein von etwa 50 kDa, das in beiden Zelltypen in infizierten Zellen nachgewiesen wurde und dessen Menge in IFN- β -

Diskussion

vorbehandelten Zellen stark reduziert war. Angesichts des Molekulargewichts dieses Proteins und im Einklang mit früheren Studien zur ADP-Ribosylierung anderer Coronavirus-N-Proteine handelt es sich bei diesem 50-kDa-Protein sehr wahrscheinlich um das HCoV-229E-N-Protein (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32) [Grunewald *et al.*, 2018]. Während in MRC-5-Zellen eine deutlich reduzierte N-Proteinmenge durch die Vorbehandlung mit IFN- β beobachtet wurde, konnte in vorbehandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach HCoV-229E-Infektion (oder HCoV-229E-MacD-Mutanten) nahezu kein N-Protein detektiert werden. Die stark verringerte Detektion des N-Proteins in diesen Zellen ist am ehesten auf die reduzierte Virusreplikation nach IFN- β -Vorbehandlung in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (Abbildung 4-4) zurückzuführen. Weitere Unterschiede hinsichtlich der (De-) ADP-Ribosylierung viraler Proteine und mögliche Interaktionspartner könnten mittels Massenspektrometrie analysiert werden.

Sowohl virale als auch zelluläre Proteine, wie beispielsweise einige PARPs, FRA1 oder TBK1 können ADP-ribosyliert werden [Masaoka *et al.*, 2012, Yamada *et al.*, 2016, Manetsch *et al.*, 2023]. Eine mögliche Regulation durch PARP7 wurde in dieser Arbeit für ausgewählte Signalwege der innate Immunantwort näher betrachtet. Ein wichtiger Signalweg betrifft das Zusammenspiel von TBK1 und IRF3, wodurch IFNs und ISGs induziert werden. TBK1- und IRF3-Proteinlevel wurden in IFN- β -behandelten und/oder HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen analysiert. Sowohl die Stabilität als auch die Aktivität von TBK1 können durch posttranslationale Modifikationen, einschließlich ADP-Ribosylierung, beeinflusst werden. Diese Modifikation von TBK1 konnte im Rahmen dieser Arbeit in keinem (IFN- β -behandelten) Zelltyp nachgewiesen werden. Veränderung der TBK1-Genexpression und Proteinmenge wurde in vorbehandelten und/oder HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen bzw. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nicht detektiert (Abbildung 4-20, Abbildung 4-24, Abbildung 4-30, Abbildung 4-32). Jedoch konnte ein veränderter Phosphorylierungszustand von IRF3 in MRC-5-Zellen und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen abhängig von der IFN- β -Vorbehandlung detektiert werden (Abbildung 4-30, Abbildung 4-32). Intrazellulär liegt IRF3 in nicht-phosphorylierter, hypo- und/oder hyperphosphorylierter Form vor. Die durch Stress aktivierte Form entspricht dem hyperphosphorylierten IRF3 [Servant *et al.*, 2001, Clément *et al.*, 2008]. Nach der IFN- β -Behandlung wurde hyperphosphoryliertes IRF3 verglichen mit unbehandelten MRC-5-Zellen vermehrt nachgewiesen. Eine zusätzliche HCoV-229E-Infektion führte zu einer weiter verstärkten Phosphorylierung, sodass nun deutlich weniger hypo- als hyperphosphoryliertes IRF3 nachweisbar war. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die IRF3-Phosphorylierung unabhängig von der TBK1-Proteinmenge stattfindet, und sie zur Aktivierung von ISGs und IFNs führt. Diese Annahme befindet sich im Einklang mit der beobachteten reduzierten Replikation von HCoV-229E in IFN- β -vorbehandelten MRC-5-Zellen (Abbildung 4-3). Durch die gesteigerte IRF3-Phosphorylierung, wodurch dessen Aktivierung, Dimerisierung und Transport in den Zellkern erfolgt, wird die Expression induziert von Interferonen und, als Konsequenz, von IFN-stimulierten Genen. Dies inhibiert die Replikation und resultiert in geringeren Virustitern. Au *et al.* konnten zeigen, dass die IRF3-Expression unabhängig von einer IFN-Behandlung oder Infektion konstant in HeLa-Zellen erfolgt. Allerdings wurde die Versuchsreihe mit IFN- α und/oder Newcastle-Disease-Virus (NDV) in einem Zeitraum von bis zu 24 hpi durchgeführt [Au *et al.*, 1995]. Dies könnte

Diskussion

die ähnlichen nicht-phosphorylierten IRF3-Proteinmengen in MRC-5-Zellen erklären. Die Behandlung mit IFN- β von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zeigte eine verringerte IRF3-Proteinmenge in mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten Zellen. Auffällig war dabei, dass in IFN- β -behandelten, nicht infizierten oder HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen mehr IRF3 nachgewiesen werden konnte als in allen anderen behandelten virusinfizierten Zellen. Die HCoV-229E_N1357Q-Infektion führte zu einer erhöhten Proteinmenge für nicht-phosphoryliertes und hyperphosphoryliertes IRF3 in IFN- β -vorbehandelten Zellen. Ein verringerter Nachweis von hyperphosphoryliertem IRF3 in HCoV-229E_N1357Q-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nach IFN- β -Behandlung deutet auf eine geringere IFN-assozierte Immunantwort hin. Gleichzeitig nimmt HCoV-229E_N1357Q im Vergleich mit HCoV-229E und anderen HCoV-229E-MacD-Mutanten eine besondere Rolle ein, da in den anderen Infektionen weniger (hypo- und hyperphosphoryliertes) IRF3 detektiert wurde.

In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurde außerdem FRA1, bedingt durch die erhöhte mRNA-Expression, auf Proteinebene nachgewiesen. Mittels NGS wurde eine erhöhte FRA1-Expression (mit Ausnahme von IFN- β -behandelten HCoV-229E- bzw. HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen) in allen Infektionsexperimenten mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen detektiert (Kapitel 4.3.2). Insbesondere nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S konnte eine signifikant vermehrte Expression im Vergleich mit HCoV-229E in IFN- β -vorbehandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen bestätigt werden. Auf Proteinebene konnten keine Unterschiede zwischen IFN- β -behandelten, nicht infizierten Zellen einerseits und IFN- β -behandelten, infizierten Zellen andererseits detektiert werden (Abbildung 4-32). Allerdings wurde eine gesteigerte FRA1-Proteinmenge für IFN- β -behandelte, infizierte Zellen im Vergleich mit unbehandelten infizierten Zellen nachgewiesen. Die alleinige IFN- β -Behandlung führte hingegen zu keiner erkennbaren Veränderung der FRA1-Menge in diesen Zellen. Die vermehrte FRA1-mRNA-Expression in IFN- β -behandelten MacD-Mutanten-infizierten Zellen (im Vergleich mit unbehandelten infizierten Zellen), korreliert demnach mit einer gesteigerten Proteinmenge durch die IFN- β -Behandlung in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. Dies ist in Übereinstimmung mit anderen Studien, die FRA1 den ISGs zuordnen [Der *et al.*, 1998, OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen PARP7 bzw. mit PARP7-assozierten Genen/ Proteinen und der viralen MacD im Kontext der HCoV-229E-Infektion näher zu analysieren, wurde in weiteren Experimenten angestrebt, die Genexpression bzw. Proteinmenge von PARP7 in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zu verringern (Kapitel 4.5, Kapitel 5.4).

5.8 Auswirkungen eines PARP7-Knockdowns auf die HCoV-229E-Infektion in Abhängigkeit von IFN- β

Die erzeugten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurden hinsichtlich der Replikation von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten in Abhängigkeit von IFN- β mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD verglichen (Abbildung 4-34, Abbildung 4-4). Für beide Zelllinien konnten übereinstimmend reduzierte Virustiter durch die Vorbehandlung mit IFN- β detektiert werden. In mit

Diskussion

HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne bzw. mit PARP7-KD wurden reduzierte Virustiter 48 hpi als Ergebnis der IFN- β -Vorbehandlung bestätigt. Die Virustiter behandelte Zellen waren für beide Zelllinien ähnlich. Signifikante Verringerungen durch die IFN- β -Zugabe wurden für MacD-Mutanten in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen und/oder A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD ermittelt. Der PARP7-KD spielt bei der Virusreplikation offenbar keine entscheidende Rolle, da die Virustiter lediglich geringfügige Abweichungen zeigten. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass einige im Infektionskontext relevante Funktionen von PARP7 durch andere PARPs übernommen werden. Um mögliche Effekte auf die Expression anderer PARPs zu analysieren, wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mittels NGS ausgewertet.

5.8.1 PARP-Expression in Abhängigkeit von IFN- β und HCoV-229E-Infektion

247 differentiell regulierte Gene konnten in IFN- β -behandelten HCoV-229E-infizierten Zellen identifiziert werden (Abbildung 4-35). Analog der A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD erfolgte eine Gruppierung von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten. Die Auswirkungen einer IFN- β -Behandlung auf die Genexpression nach Infektion waren für beide Zelltypen ähnlich. Besonders auffällig war die ähnliche Expression nach einer Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E_N1305A. Sowohl in IFN- β -behandelten als auch in unbehandelten Zellen unterschieden sich diese Genregulationen eindeutig von denen aller anderen Experimente die mit den MacD-Mutanten durchgeführt wurden. Für HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- und HCoV-229E_N1357S-infizierte Zellen konnte ein (untereinander) weitgehend übereinstimmendes Expressionsprofil bestimmt werden. Eine ähnliche Regulation zeigten auch HCoV-229E_ΔMacD-infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD. Allerdings unterschied sich die Genexpression insbesondere in IFN- β -behandelten Zellen. Sowohl in HCoV-229E als auch in allen Infektionen mit MacD-Mutanten konnte nach der Behandlung eine verringerte Anzahl differentiell exprimierter Gene erfasst werden. Vor allem signifikant verringert exprimierte Gene konnten kaum nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine IFN- β -induzierte Genexpression hin. A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD zeigten nach der Infektion mit den MacD-Mutanten in IFN- β -behandelten Proben 151 Gene, die auch in HCoV-229E-infizierten Proben detektiert wurden. Allerdings konnte in Übereinstimmung mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD eine Vielzahl regulierter Gene in HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S bzw. in Kombination mit HCoV-229E_ΔMacD gezeigt werden (Abbildung 4-35D). Diese vier Mutanten exprimieren 196 identische Gene differentiell nach einer Vorbehandlung mit IFN- β . Eine besondere Relevanz der Position N1357 wurde durch die gefundene vermehrte Expression von 121 Genen in IFN- β -behandelten Proben erneut herausgestellt. Für eine detailliertere Analyse der Genexpression abhängig von IFN- β und/oder HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten wurden PARPs bzw. PARP7-assoziierte Gene separat betrachtet.

Für PARP7 erfolgte die Analyse zusätzlich mittels RT-qPCR (Abbildung 4-36, Abbildung 4-38). Eine IFN- β -Vorbehandlung führte in HCoV-229E-, HCoV-229E_ΔMacD- oder HCoV-229E_N1305A-infizierten Zellen zu einer etwas geringeren PARP7-Expression im Vergleich mit unbehandelten infizierten Proben. Nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und

Diskussion

HCoV-229E_N1357S konnte eine gesteigerte PARP7-Expression durch die IFN- β -Behandlung nachgewiesen werden. Diese MacD-Mutanten-abhängige PARP7-Expression konnte mittels NGS und RT-qPCR bestätigt werden. Im Gesamtkontext ist zu beachten, dass (bedingt durch die *KD*-assoziierte Veränderung des PARP7-Leserasters) die gebildeten mRNAs unvollständige und deshalb dysfunktionale PARP7-Proteine kodieren. Die Zellen könnten versuchen, dies durch eine vermehrte (Protein-) Synthese zu kompensieren. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass PARP7 infektionsspezifisch und zelltypunabhängig vermehrt exprimiert wird und ein PARP7-*KD* keinen signifikanten Einfluss auf die Replikation von HCoV-229E in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nimmt.

Unabhängig von einer HCoV-229E-Infektion konnte eine vermehrte PARP10-Expression durch die IFN- β -Zugabe nachgewiesen werden (Abbildung 4-36). Andere IFN-induzierte PARPs konnten 48 h nach einer 16-stündigen IFN- β -Behandlung nicht detektiert werden. Jeltema *et al.* konnten einen signifikanten mRNA-Anstieg einiger IFN-induzierter PARPs in einem Zeitraum von 2-8 h nach der Behandlung detektieren [Jeltema *et al.*, 2025]. Die Ergebnisse lassen einerseits vermuten, dass die Auswirkungen einer IFN- β -Behandlung nach weiteren 48 h nicht (bzw. nicht mehr) messbar sind, aber PARP10 scheinbar eine wichtige Rolle zum Beispiel beim Ausgleich des PARP7-*KD* oder zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion einnimmt. Ein Zusammenspiel dieser PARPs konnte bisher nicht gezeigt werden. Allerdings wurde in *In-vivo*-Krebsstudien gezeigt, dass bei einem PARP7-*KO* andere PARPs, wie beispielsweise PARP9, PARP10 und PARP14 vermehrt exprimiert werden [Rasmussen *et al.*, 2023, Kannen *et al.*, 2024]. IFN- β -spezifisch wurden in HCoV-229E-infizierten Zellen PARP9, PARP10, PARP12 und PARP14 vermehrt exprimiert. Wie bereits erwähnt, zählen diese Gene zu den IFN-induzierten PARPs. Übereinstimmend wurden in IFN- β -behandelten und mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-PARP7-*KD*-Zellen einige PARPs vermehrt exprimiert. Dazu gehörten PARP7, PARP9, PARP10, PARP12, PARP13S und PARP14. In Zellen, die mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert wurden, wurde zusätzlich PARP8 vermehrt detektiert (Abbildung 4-37, Anhang Abbildung 7-25). Im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten und IFN- β -vorbehandelten Zellen konnte eine signifikant gesteigerte Expression für PARP7 und PARP8 in HCoV-229E_N1357Q- und HCoV-229E_N1357S-infizierten Proben, sowie PARP8 in HCoV-229E_ΔMacD- und HCoV-229E_N1357H-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Anhang Abbildung 7-14, Abbildung 7-25). Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut eine besondere Relevanz von N1357. Im Vergleich mit A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-*KD* fällt auf, dass die vermehrt exprimierten PARPs vollständig übereinstimmen, aber in einigen Fällen weitere PARPs vermehrt detektiert wurden. Letzteres trifft sowohl auf unbehandelte als auch IFN- β -behandelte Proben nach Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten zu. Diskutiert wird, ob fehlende PARPs durch die vermehrte Expression anderer PARPs ausgeglichen werden können. Ein solches Zusammenspiel wurde für PARP9 und PARP14 bereits gezeigt [Iwata *et al.*, 2016].

Diskussion

5.8.2 Expression PARP7-assoziiierter Gene in Abhängigkeit von IFN- β und HCoV-229E-Infektion

PARP7-assoziierte Gene wurden analog analysiert, um die Auswirkungen eines PARP7-KD zu charakterisieren. Während durch IFN- β keine Regulation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen erfolgte, konnte nach einem PARP7-KD IRF7 vermehrt detektiert werden (Abbildung 4-39B). Dieses Gen wurde auch in HCoV-229E-infizierten Zellen unabhängig von der IFN- β -Vorbehandlung detektiert. IRF7 zählt zu den ISGs und steht damit im direkten Zusammenhang mit einer IFN-Stimulation. Zusätzlich werden IRF7 und IRF3 als Teil der Immunantwort aktiviert [Yamada *et al.*, 2016, Rasmussen *et al.*, 2023]. Eine HCoV-229E-Infektion IFN- β -vorbehandelter Zellen mit PARP7-KD führte zu einer vermehrten Expression von MDA5, RIG-I, DTX3L, IRF7, FRA1 und p50 (Abbildung 4-39C). Mit Ausnahme von FRA1 und p50 wurden diese Gene auch in Zellen ohne PARP7-KD detektiert. Auch für die MacD-Mutanten konnten Abweichungen zwischen A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD detektiert werden. Verglichen mit HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD konnte eine signifikant vermehrte Expression von FRA1, p50 und IKBKE nach Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S detektiert werden (Anhang Abbildung 7-15, Abbildung 7-26). Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen niedriger ist als in den gleichen Zellen mit PARP7-KD. Das weist darauf hin, dass eine fehlerhafte PARP7-Expression, welche zu einer geringeren Proteinmenge und/oder nicht funktionsfähigen Proteinen führt, einen Einfluss auf die Immunantwort nimmt. Möglicherweise werden PARP7-assoziierte Funktionen wie beispielsweise Proteinmodifikationen von anderen Proteinen übernommen und/oder andere PARP7-unabhängige Signalwege verstärkt aktiviert. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde die Regulation ausgewählter Proteine mittels Western Blot analysiert.

5.8.3 IFN- β -abhängige Proteinregulation in HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD

ADP-ribosylierte Proteine konnten über die gesamte Lauffront (Abbildung 4-41) nachgewiesen werden. Die stärksten Signale konnten, wie in den zuvor beschriebenen Experimenten, bei 70 bzw. 50 kDa detektiert werden. Letzteres zeigt mit hoher Wahrscheinlichkeit die ADP-Ribosylierung des HCoV-229E-N-Proteins, wobei durch die IFN- β -Behandlung eine geringere Proteinmenge detektiert wurde. Die Ergebnisse zeigen, dass PARP7 keinen signifikanten Einfluss auf die ADP-Ribosylierung des viralen N-Proteins hat. Das bedeutet, dass die ADP-Ribosylierung nicht (allein) durch PARP7 erfolgt. Die Identifizierung von Interaktionspartnern oder weiteren ADP-ribosylierten Proteinen könnte mit Hilfe der Massenspektrometrie erfolgen.

Unabhängig von einem PARP7-KD in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte eine IFN- β -Induktion von PARP9 bestätigt werden. In mit HCoV-229E-MacD-Mutanten infizierten Zellen wurde ein stärkeres Signal (im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen) detektiert. Zusätzlich wurde in IFN- β -behandelten Zellen vermehrte FRA1 (ein ISG [OhAinle *et al.*, 2018, Roesch *et al.*, 2018]) detektiert.

Diskussion

In unbehandelten infizierten Zellen konnte eine geringere Proteinmenge als in nicht infizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies deutet, neben einer IFN- β -abhängig gesteigerten FRA1-Proteinmenge, auf eine reduzierte Proteinmenge durch eine Infektion mit HCoV-229E bzw. HCoV-229E-MacD-Mutanten (in unbehandelten Proben) hin. Dieses Ergebnis bestätigt, dass FRA1 Teil der antiviralen wirtszellulären Immunantwort ist. Bei einer hohen FRA1-Proteinmenge wurde eine höhere Menge von nicht-phosphoryliertem IRF3 nach der IFN- β -Behandlung detektiert. Das bedeutet, dass durch die Behandlung weniger IRF3-Phosphorylierung stattfindet. Gleichzeitig konnte durch die IFN- β -Vorbehandlung eine reduzierte Replikation beobachtet werden, wodurch ebenfalls eine geringere antivirale Reaktion zu erwarten ist. Die Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation ist Teil der Immunantwort und trägt zur IFN-Produktion bei, welche durch eine Vorbehandlung möglicherweise nicht weiter aktiviert werden muss. Allerdings könnten modifizierte Proteine auch transloziert bzw. degradiert werden. Darüber hinaus kann die erhöhte FRA1-Proteinmenge in IFN- β -behandelten Proben die Phosphorylierung von IRF3 beeinflussen. Cai *et al.* konnten zeigen, dass dabei die IRF3-Proteinproduktion nicht verändert, aber dessen Phosphorylierung beeinflusst wird [Cai *et al.*, 2017]. Unter der Annahme, dass eine Zelle versucht, eine IRF3-induzierte Immunantwort zu aktivieren, wird z. Bsp. TBK1 zur Phosphorylierung von IRF3 benötigt. Weder auf mRNA- noch auf Proteinebene konnte eine vermehrte TBK1-Expression bzw. Proteinmenge nach IFN- β -Behandlung detektiert werden (Abbildung 4-40, Anhang Abbildung 7-26). Dies könnte ein Anzeichen dafür sein, dass die Zelle andere Signalwege zur Aktivierung von ISGs bzw. IFNs bevorzugt. Unklar ist, welche Rolle der PARP7-KD dabei spielt. Eine mögliche Erklärung wäre beispielsweise, dass durch eine ausbleibende oder verringerte PARP7-induzierte ADP-Ribosylierung von TBK1 die IRF3-Phosphorylierung stattfinden könnte. Allerdings ist auch eine Interaktion mit anderen (IFN-induzierten) PARPs denkbar. Ein Hinweis dafür könnte die gesteigerte Genexpression von PARP13S, PARP9, PARP14, PARP10, PARP7 und PARP12 in IFN- β -behandelten HCoV-229E-infizierten Zellen sein. Durch die Infektion mit ausgewählten MacD-Mutanten wurde zusätzlich PARP8 (signifikant) vermehrt exprimiert (Abbildung 4-36, Abbildung 4-37, Anhang Abbildung 7-23). Abschließend wurde die Auswirkung der MacD-Mutanten auf die Produktion von IFNs analysiert.

5.9 Einfluss der MacD-Mutanten auf die Interferonfreisetzung in IFN- β -behandelten HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Die Freisetzung von IFN- β und IFN- λ wurde in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD analysiert. IFN- λ -Protein konnte in keinem Zelltyp nachgewiesen werden. In MRC-5-Zellen erfolgte außerdem keine Detektion von IFN- β 48 hpi. Arai *et al.* konnten geringe Mengen in HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen detektieren, wobei kein signifikanter Anstieg im Zeitraum von 24-120 hpi erfolgte [Arai *et al.*, 2023]. Allerdings wurde IFN- β in vorbehandelten und HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q-, HCoV-229E_N1357S-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD detektiert. Geringe Mengen konnten in Zellen mit PARP7-KD nach IFN- β -Vorbehandlung und Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A gemessen werden. Ausgeschlossen werden kann, dass es sich bei der

Diskussion

detektierten IFN- β -Konzentration um das während der Vorbehandlung zugefügte IFN- β handelt, da keine Detektion in allen vorbehandelten Zellen erfolgte. In Abbildung 4-42A lässt sich deutlich erkennen, dass die drei MacD-Mutanten HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S zu einer erhöhten IFN- β -Freisetzung in vorbehandelten Proben führen. Vergleicht man die Genexpression in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD für IFN- β -vorbehandelte und HCoV-229E-infizierte Proben, fällt auf, dass in Proben mit IFN- β -Freisetzung eine signifikant vermehrte Expression von FRA1 und p50 im Vergleich mit behandelten und HCoV-229E-infizierten Proben vorliegt (Kapitel 4.3). Beide Gene sind Regulatoren der Immunreaktion. Der Transkriptionsfaktor FRA1 reguliert die Typ-I-IFN-induzierte Immunantwort. Cai *et al.* zeigten, dass diese IFN-vermittelte Immunantwort während einer Infektion negativ beeinflusst wird. FRA1 reduziert die Ubiquitylierung von TRAF3/TRIF und blockiert deren Interaktion mit TBK1. Außerdem inhibiert FRA1 die Phosphorylierung von IRF3, aber nicht dessen Proteinproduktion [Cai *et al.*, 2017]. Das bedeutet, dass HCoV-229E-MacD-N1357-Mutanten beispielsweise durch die gesteigerte Expression von FRA1 zu einer verstärkten Immunantwort führen können. Allerdings sollte dabei auch ein mögliches Zusammenspiel verschiedener antiviraler Signalwege in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse auf Proteinebene deuten, insbesondere in IFN- β -behandelten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD, auf eine Aktivierung der Immunantwort unabhängig von der IRF3-Phosphorylierung hin.

Bei einer Analyse von A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, die mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert wurden, konnten in IFN- β -behandelten Zellen 134 Gene, darunter 61 verstärkt exprimierte ISGs (Abbildung 4-42B, Abbildung 4-42C) identifiziert werden. Sehr auffällig war dabei eine vermehrte Expression von Genen wie FRA1, NFKBIA (NF- κ B Inhibitor Alpha), NFKBIZ (NF- κ B Inhibitor Zeta) und KLK10 (Kallikrein-10, engl. *Kallikrein related peptidase 10*). Andere Studien konnten zeigen, dass NFKBIA und NFKBIZ als Teil des NF- κ B-Signalwegs und FRA1 die Produktion von IFNs beeinflussen können [Lenardo *et al.*, 1989, Pfeffer, 2011, Cai *et al.*, 2017]. Die Rolle von KLK10 ist bisher nicht bekannt. Allerdings wird angenommen, dass das Immunsystem bei einer SARS-CoV-2-Infektion unter anderem durch Kallikrein-(Brady)kinin-Signalwege aktiviert wird [Diamond *et al.*, 2020]. Bei einer Überrepräsentationsanalyse (engl. *Over-Representation Analysis*, ORA) wurden Signalwege identifiziert, deren Gene häufiger vorkommen als zufällig zu erwarten ist. Dabei wurden in IFN- β -behandelten und HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357Q- oder HCoV-229E_N1357S-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen unter anderem eine verstärkte Regulation von Signalwegen beobachtet, die mit der (antiviralen) Immunantwort assoziiert werden (Abbildung 4-42D). Besonders hervorgehoben werden soll der Signalweg WP5527 (engl. *NF κ B signaling and ARTD family members*, Abbildung 5-1), welcher das Zusammenspiel von NF- κ B und ARTDs bzw. PARPs beschreibt. Verschiedenen PARPs wird dabei eine Rolle in der NF- κ B-assoziierten Signalübertragung zugeordnet.

Diskussion

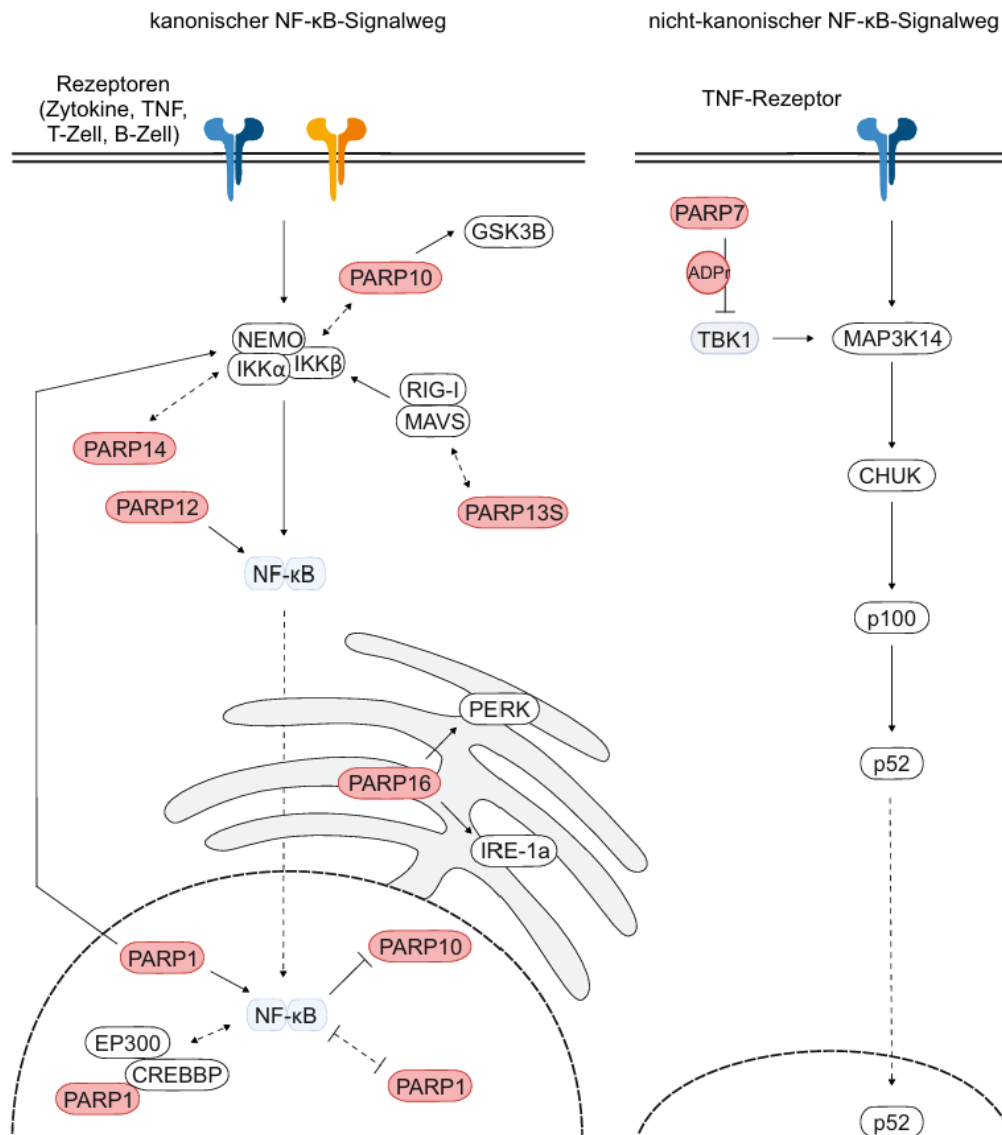


Abbildung 5-1: Vereinfachte schematische Darstellung des NF-κB-Signalwegs mit der Rolle ausgewählter ARTD-Familienmitglieder bzw. PARPs (WP5527). Dargestellt sind der kanonische (links) und der nicht-kanonische (rechts) NF-κB-Signalweg. Die PARPs sind rot hervorgehoben. Aktivierende und hemmende Interaktionen sind mit durchgezogenen Linien und modulierende Funktionen mit gestrichelten Pfeilen gekennzeichnet [modifiziert nach [Weitz, 2025]].

In vorbehandelten und mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen konnte im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen eine vermehrte Expression von PARP7, PARP8 und PARP13S bestätigt werden (Anhang Abbildung 7-10, Abbildung 7-23). PARP13S wird eine stabilisierende Wirkung für den Komplex aus MAVS und RIG-I zugeschrieben, welche zu einer Verstärkung des kanonischen NF-κB-Signalwegs beiträgt [Hayakawa *et al.*, 2011]. Im Gegensatz zu dem kanonischen NF-κB-Signalweg besitzt der nicht-kanonische NF-κB-Signalweg eine hemmende Wirkung auf die Typ-I-IFN-Produktion. Für die Aktivierung wird die Kinase MAP3K14 (engl. *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 14*) benötigt. Diese kann durch TBK1 phosphoryliert und degradiert werden [Yu *et al.*, 2020]. Die Phosphorylierung kann durch eine PARP7-induzierte mono-ADP-Ribosylierung von TBK1 [Yamada *et al.*, 2016, Rasmussen *et al.*, 2023] verhindert werden. Dadurch nimmt PARP7 einen Einfluss auf

Diskussion

den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg, welcher in einer verringerten IFN-Produktion resultiert. Während PARP13S einen steigernden Einfluss auf die NF- κ B-induzierte Immunantwort hat, kann PARP7 zu einem späteren Infektionszeitpunkt eine verringere Wirkung auf die IFN-Produktion zugeordnet werden. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD wurde eine geringere IFN- β -Konzentration im Überstand infizierter Proben festgestellt (Abbildung 4-42A). Allerdings wurde PARP7 und PARP8 analog zu Zellen ohne PARP7-KD vermehrt exprimiert (Anhang Abbildung 7-14). Für PARP8 konnte bisher kein Zusammenhang mit dem Signalweg nachgewiesen werden. Neben der veränderten Genexpression (Abbildung 4-14A, Abbildung 4-42B, Abbildung 4-42C) und den damit regulierten Signalwegen könnte auch die (signifikant) verringerte De-ADP-Ribosylierungsaktivität von HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S [Hartmann, 2023] eine Ursache für die erhöhte IFN- β -Freisetzung sein. Auffällig ist, dass HCoV-229E_N1357H zu einer geringeren IFN- β -Freisetzung führt. Da Histidin in MERS-CoV, SARS-CoV und SARS-CoV-2 an dieser Position vorzufinden ist (Abbildung 1-4), könnten die Ergebnisse darauf hindeuten, dass N1357 bzw. H1357 in CoVs einen Einfluss auf die Unterdrückung der antiviralen Immunantwort besitzen. Andere Studien ordnen der MacD eine inhibierende Wirkung auf die IFN-Antwort zu, wobei der Mechanismus bisher nicht bekannt ist [Alhammad *et al.*, 2023, Pfannenstiel *et al.*, 2025]. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der IFN- β -Synthese und der Genexpression bei Infektionen mit einer HCoV-229E-MacD-Mutante, insbesondere im Zusammenhang mit N1357, sollte näher analysiert werden. Die Charakterisierung dieser Mutanten könnte beispielsweise von Bedeutung für die Entwicklung antiviraler Medikamente in Form weiterer MacD-Inhibitoren sein. Dafür sollten die Analysen auch auf klinisch relevante CoVs erweitert werden, da für eine SARS-CoV-2_ΔMacD1-Mutante eine mindestens doppelt so hohe IFN- β - und IFN- λ -mRNA-Expression verglichen mit SARS-CoV-2-infizierten Calu-3-Zellen und A549^{ACE2+}-Zellen 48 hpi gezeigt werden konnte [Alhammad *et al.*, 2023]. Diese Studie verdeutlicht ebenfalls, welchen großen Einfluss die Auswahl des Zelltyps bzw. der verwendeten Viren bei der Erforschung von MacD-Funktionen hat.

5.10 Effekt des PARP7-Inhibitors RBN-2397 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen

Um die Rolle von PARP7 näher zu analysieren, wurde ein PARP7-Inhibitor verwendet, der an PARP7 bindet und dadurch dessen Funktion blockiert. Dabei wurden A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mitgeführt, um gegebenenfalls durch blockiertes und fehlerhaftes PARP7 stärkere Auswirkungen zu detektieren. In einem ersten Schritt wurde die mögliche Toxizität von RBN-2397 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit und ohne PARP7-KD mittels MTT-Assay analysiert (Anhang Abbildung 7-16). Im Konzentrationsbereich von 2 bis 1000 nM waren keine signifikanten toxischen Nebenwirkungen nachweisbar. Gu *et al.* konnten bei einer Konzentration bis 7,8 nM eine spezifisch inhibitorische Wirkung für PARP7 gegenüber den anderen PARPs zeigen [Gu *et al.*, 2023]. Auf der Grundlage dieser beiden Datensätze wurde eine Konzentration von 7,8 nM verwendet. Durch die RBN-2397-Behandlung konnten keine Unterschiede in den Virustitern nach Infektion mit HCoV-229E oder den HCoV-229E-MacD-Mutanten beobachtet werden (Abbildung 4-43). Die

Diskussion

Virustiter in Zellen mit PARP7-KD waren analog zu den vorherigen Versuchen etwa eine log-Stufe geringer als in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass blockiertes bzw. inaktives PARP7-Protein keine signifikante Auswirkung auf die Replikation von HCoV-229E hat. Mögliche Änderungen der mRNA-Expression durch den PARP7-Inhibitor wurden mittels NGS analysiert.

Durch die Zugabe von RBN-2397 wurden weniger als 30 Gene signifikant reguliert. Dies lässt darauf schließen, dass der Inhibitor einen begrenzten Einfluss auf die Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD besitzt. Eine zusätzliche Infektion mit HCoV-229E zeigte eine vermehrte Expression von PARP10, PARP9, PARP8 und PARP7 in Zellen ohne PARP7-KD. In Zellen mit PARP7-KD wurden PARP7, PARP9 und PARP13S vermehrt detektiert. Auch für mit PARP7-assoziierte Gene konnte eine Regulation einzelner Gene beobachtet werden. Während in Zellen ohne *Knockdown* eine gesteigerte Expression von FRA1, IRF7, MDA5, RIG-I und p50 detektiert wurde, zeigte sich in Zellen mit PARP7-KD zusätzlich eine gesteigerte Expression von DTX3L. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine fehlerhafte PARP7-Produktion einen Einfluss auf die Genexpression der A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen unabhängig von einer Behandlung mit RBN-2397 aufweist. Das bedeutet, dass der PARP7-Inhibitor im Vergleich mit einem PARP7-KD geringere Auswirkungen auf die Genexpression hat. Um zusätzlich den Einfluss der MacD-Mutante in diesem Kontext zu analysieren, wurden RBN-2397-vorbehandelte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S infiziert.

In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD konnte nach einer Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD oder HCoV-229E_N1305A eine gesteigerte Expression von PARP7 detektiert werden. In HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357S- oder HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen wurde hingegen eine gesteigerte Expression von PARP7, PARP13S, PARP9, PARP10, PARP12, PARP14 und PARP8 detektiert (Abbildung 4-48, Anhang Abbildung 7-27). PARP6 wurde in HCoV-229E_N1357S-infizierten Zellen gesteigert exprimiert. Allerdings konnten (im Vergleich mit HCoV-229E) keine signifikanten Unterschiede detektiert werden (Anhang Abbildung 7-18, Abbildung 7-27). In Zellen mit PARP7-KD wurde ebenfalls eine gesteigerte Expression von PARPs (PARP7, PARP13S, PARP9, PARP14, PARP12, PARP10, PARP8, PARP5a und PARP6) abhängig von der für die Infektion verwendeten MacD-Mutante identifiziert (Abbildung 4-50, Anhang Abbildung 7-20). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten Zellen nachgewiesen (Anhang Abbildung 7-20, Abbildung 7-29).

PARP7-assoziierte Gene wurden ebenfalls reguliert. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen wurden in den MacD-Mutanten die gleichen (und einige zusätzliche) Gene wie in HCoV-229E-infizierten Proben verstärkt exprimiert. Zu den zusätzlich differentiell exprimierten Genen zählten unter anderem FRA1, p50, IKBKE und/oder MDA5 (Abbildung 4-49, Anhang Abbildung 7-28). Allerdings wurde deren Genexpression zum Teil auch in nicht behandelten Proben abhängig von der jeweiligen MacD-Mutante induziert. Nichtsdestotrotz konnten signifikante Unterschiede im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in der verstärkten Expression von FRA1 und p50

Diskussion

(HCoV-229E_N1357H), FRA1, p50 und IKBKE (HCoV-229E_N1357S) bzw. FRA1, p50 und MDA5 (HCoV-229E_N1357Q) erfasst werden (Anhang Abbildung 7-19, Abbildung 7-28). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD detektiert. Während die Gesamtanzahl signifikant regulierter Gene in diesen Zellen höher war als ohne PARP7-KD, wurde lediglich eine erhöhte Expression von FRA1 in HCoV-229E_N1357H-, HCoV-229E_N1357S- und HCoV-229E_N1357Q-infizierten Zellen detektiert. Diese konnte jedoch auch unabhängig von einer RBN-2397-Behandlung nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Inhibition von PARP7 in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen – unabhängig von einem PARP7-KD – keine direkten Auswirkungen auf den Verlauf der HCoV-229E-Infektion hat. Darüber hinaus war die Genregulation weitgehend unbeeinträchtigt durch die RBN-2397-Behandlung. Auch ein Vergleich der Genexpression nach der Infektion mit HCoV-229E und den HCoV-229E-MacD-Mutanten zeigte kaum Veränderungen. Interessanterweise konnte eine signifikant gesteigerte FRA1-Expression unabhängig von einem PARP7-KD und unabhängig von der Behandlung nach der Infektion mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_N1357S nachgewiesen werden. Neben einer differentiellen Genregulation könnte auch eine veränderte Translation den Infektionsverlauf beeinflussen. Um diese Möglichkeit zu adressieren, wurden in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit und ohne PARP7-KD mögliche Effekte der RBN-2397-Behandlung auf die Steady-state-Levels ausgewählter Proteine analysiert (Abbildung 4-52).

Neben ADP-ribosylierten Proteinen wurden das HCoV-229E-N-Protein, PARP9, TBK1, IRF3 und FRA1 nachgewiesen. Als interne Kontrolle wurde Beta-Aktin mitgeführt. ADP-ribosylierte Proteine konnten über den gesamten Trennbereich detektiert werden, wobei die auffälligsten Signalintensitäten bei einer Größe von 50 bzw. 70 kDa detektiert wurden. Letzterem Signal konnte bisher kein Protein zugeordnet werden. Eine Proteingröße von etwa 50 kDa kann mit dem viralen N-Protein assoziiert werden. Diese Modifikation scheint in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD unabhängig von einer RBN-2397-Behandlung stattzufinden (Kapitel 4.4.2, Kapitel 4.5.4). Auch für andere unbekannte ADP-ribosylierte Proteine konnte kein deutlicher Unterschied zwischen nicht behandelten und behandelten Proben festgestellt werden. Für PARP9, dessen IFN- β -induzierte Produktion gezeigt werden konnte (Abbildung 4-32), wurde in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen keine signifikant veränderte Proteinmenge nach RBN-2397-Zugabe beobachtet. In Zellen, welche einen PARP7-KD aufwiesen, wurde kein bzw. kaum PARP9-Protein detektiert. Dies weist darauf hin, dass bei der verwendeten Konzentration von 7,8 nM PARP9 wie erwartet weder auf mRNA- noch auf Proteinebene beeinflusst wird.

PARP7 kann zu einer ADP-Ribosylierung von FRA1 führen [Manetsch *et al.*, 2023]. Im Vergleich mit nicht infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit bzw. ohne PARP7-KD wurde in allen infizierten Zellen eine geringere FRA1-Proteinmenge nachgewiesen. In Übereinstimmung mit vorherigen Ergebnissen (Abbildung 4-14) fällt erneut ein Unterschied zwischen den MacD-Mutanten auf, der diese in drei Gruppen einteilt. Im Vergleich mit HCoV-229E erscheint HCoV-229E_N1305A erneut ähnlicher als HCoV-229E_N1357Q bzw. HCoV-229E_ΔMacD. Letztere sind beispielsweise in Bezug auf die FRA1-Proteinmenge ähnlich. Das heißt, dass sowohl die Genexpression als auch die Proteinmenge durch die MacD-Mutationen verändert wird. Dennoch zeigen sich Abweichungen

Diskussion

zwischen HCoV-229E_N1357Q und HCoV-229E_ΔMacD. Weshalb die Unterschiede auf Proteinebene in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne Behandlung, aber in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD mit RBN-2397-Behandlung beobachtet werden konnten, sollte weiter analysiert werden. TBK1, ein weiteres Protein, das PARP7-induziert ADP-ribosyliert werden kann, konnte in unbehandelten und RBN-2397-behandelten HCoV-229E-MacD-Mutanten-infizierten Zellen detektiert werden. Andere Studien zeigten, dass die PARP7-assoziierte MARYlierung von TBK1 durch RBN-2397 (200 nM) vollständig unterdrückt wird [Gozgit *et al.*, 2021]. Allerdings konnte gezeigt werden, dass RBN-2397 ab einer Konzentration von über 7,8 nM unspezifisch (unter anderem andere PARPs) inhibiert [Gu *et al.*, 2023]. Im weiteren Verlauf bewirkt TBK1 die Phosphorylierung von IRF3. In A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen ohne PARP7-KD konnte unabhängig von der Behandlung IRF3 detektiert werden. Im Vergleich konnten in Zellen mit PARP7-KD in unbehandelten und RBN-2397-behandelten Proben geringere IRF3-Proteinlevel nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass möglicherweise keine Phosphorylierung trotz vorhandenem TBK1 und weniger bzw. inhibiertem PARP7 oder ein konstanter Transport in den Zellkern stattfindet, sodass keine Akkumulation der Proteine stattfindet. Diese Hypothesen sollten durch weiterführende Experimente überprüft werden.

Abschließend kann festgehalten werden, dass die hoch konservierte MacD während der CoV-Infektion einen Einfluss auf die (antivirale) Immunantwort der Wirtszelle hat. Die verwendeten HCoV-229E-MacD-Mutanten, welche unterschiedliche De-ADP-Ribosylierungsaktivitäten aufweisen [Hartmann, 2023], zeigten im Vergleich mit HCoV-229E reduzierte Virustiter, abweichende Genexpressionslevel, sowie unterschiedliche Proteinmengen bzw. posttranslationale Modifikationen. Eine detailliertere Analyse der 17 humanen PARPs, die zelluläre und virale Proteine ADP-ribosylieren können, zeigte eine zelltypunabhängig gesteigerte PARP7-Expression nach der Infektion mit HCoV-229E oder HCoV-229E-MacD-Mutanten. Obwohl potentielle Funktionen der PARPs im Kontext von Virusinfektionen bisher nur wenig erforscht sind, gibt es aus früheren Studien erste Hinweise auf eine indirekte Regulation der IFN-Produktion durch PARP7 [Yamada *et al.*, 2016, Manetsch *et al.*, 2023, Rasmussen *et al.*, 2023, Naulin *et al.*, 2024]. Für eine reduzierte PARP7-Proteinmenge (CRISPR-Cas9-basierter *Knockdown*) oder inhibierte PARP7-Aktivität (RBN-2397) konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine signifikante Änderung der Virusreplikation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse und andere Studien deuten darauf hin, dass antivirale Signalwege unabhängig voneinander reguliert werden und fehlende/reduzierte PARPs möglicherweise durch andere PARPs ersetzt werden können [Iwata *et al.*, 2016].

Einige der bisher bekannten PARPs werden den ISGs zugeordnet. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein IFN-β-induzierter Anstieg von PARP9 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit IFN-β führte zu reduzierten Virustitern und einer lokal begrenzten Ausbreitung von HCoV-229E und HCoV-229E-MacD-Mutanten in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen. MacD-Mutanten mit einer Substitution an Position N1357 (HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q, HCoV-229E_N1357S) zeigten im Vergleich mit HCoV-229E eine stärkere Abweichung der differentiellen Genexpression als eine Deletion der

Diskussion

viralen MacD (HCoV-229E_ΔMacD) oder eine Alaninsubstitution an Position N1305 (HCoV-229E_N1305A). Darüber hinaus konnte in IFN-β-behandelten und mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen eine gesteigerte IFN-β-Konzentration im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Austausch einzelner konservierter Aminosäuren (wie N1357) im erweiterten aktiven Zentrum der MacD einen (noch) stärkeren Effekt auf bestimmte Virus-Wirt-Interaktionen haben kann als die Deletion der gesamten MacD. Dies unterstützt die These, dass eine möglicherweise leicht veränderte Faltung benachbarter nsp3-Domänen oder Änderungen der Struktur der Substratbindungstasche (und damit auch der MacD-Substratspezifität) signifikante Auswirkungen auf die virale Replikation und/oder bestimmte Virus-Wirt-Interaktionen haben können. Die Konservierung der MacD bei allen bekannten Coronaviren (und einigen anderen RNA-Viren) macht sie auch zu einem möglichen Angriffspunkt für die Entwicklung neuer antiviraler Therapeutika. In den vergangenen Jahren wurden insbesondere für die MacDs von SARS-CoV-2 verschiedene Inhibitoren entwickelt [Li & Song, 2024]. Dabei müssen jedoch mögliche toxische Nebenwirkungen durch Interaktionen mit zellulären MacDs ausgeschlossen oder minimiert werden. Ein weiteres Anwendungsgebiet könnte die Impfstoffentwicklung sein. Neben chemisch inaktivierten bzw. mittels Hitze oder Bestrahlung inaktivierten Viren können auch attenuierte Lebendimpfstoffe entwickelt werden. Ziel einer Impfung mit einem abgeschwächten, aber replikationskompetenten (Corona-) Virus ist die Induktion einer ausgewogenen zellulären und humoralen Immunantwort, die vor einer durch das jeweilige Virus ausgelösten (schweren) Erkrankung schützt. Andere Studien haben in einem ähnlichen Kontext gezeigt, dass die genetische Inaktivierung der Deubiquitylierungsaktivität der PLpro im MERS-CoV nsp3 für die Herstellung attenuierter Lebendimpfstoffe genutzt werden kann [Myeni *et al.*, 2023]. Möglicherweise ist eine Inaktivierung mehrerer Domänen, wie auch der MacD, erforderlich, um die Sicherheit solcher Impfstoffe weiter zu erhöhen. Dafür ist ein detaillierteres Verständnis für die verschiedenen Domänen und deren Zusammenspiel erforderlich.

Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Coronaviren kodieren in ihren Replikase-Genen insgesamt 16 Nichtstrukturproteine (nsp). Diese werden als nsp1 bis nsp16 bezeichnet und durch viruskodierte Proteasen aus zwei Polyproteinen freigesetzt. Das größte dieser Nichtstrukturproteine ist nsp3, welches zahlreiche funktionelle Domänen enthält, zu denen auch die Makrodomäne (MacD) gehört. Die MacD besitzt unter anderem eine De-ADP-Ribosylierungsaktivität und kann somit Einfluss auf Art und Umfang der ADP-Ribosylierung viraler und/oder zellulärer Proteine in der infizierten Zelle nehmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung einer Infektion mit HCoV-229E WT bzw. MacD-Mutanten auf die Virusreplikation, Genexpression und Proteinregulation in verschiedenen Zelltypen analysiert. Zusätzlich wurde der Einfluss einer IFN- β -Vorbehandlung auf die HCoV-229E-Infektion charakterisiert. Dabei wurde eine IFN- β -induzierte Verringerung der Virustiter und eine auf dem Zellrasen lokal begrenzte Infektion in MRC-5- und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen gezeigt. Darüber hinaus konnte eine differentielle Genregulation durch IFN- β -Zugabe und/oder HCoV-229E-Infektion nachgewiesen werden. Bei der Genexpressionsanalyse wurden Poly-(ADP-Ribose)-Polymerasen (PARPs) näher betrachtet, da diese eine ADP-Ribosylierungsaktivität aufweisen und damit als Gegenspieler der viralen MacD agieren können. Anhand ihrer jeweiligen Expressionscharakteristika erfolgte eine Einteilung in infektiions- (PARP7) bzw. IFN- β -spezifisch (PARP9) vermehrt exprimierte PARPs. Eine reduzierte PARP7-Proteinmenge bzw. eine pharmakologisch inhibierte PARP7-Aktivität zeigten überraschenderweise keine signifikante Änderung der Virusreplikation in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen, obwohl ein PARP7-*Knockdown* die IFN- β -Synthese beeinflusst. Diese Ergebnisse deuten auf ein komplexes Zusammenspiel verschiedener PARPs hin. Ausgewählte PARP7-assoziierte Gene, die an der antiviralen Immunantwort beteiligt sind, zeigten zelltypabhängig eine veränderte Genexpression und Proteinregulation in infizierten Zellen. Eine Analyse verschiedener HCoV-229E-MacD-Mutanten ergab, dass der Austausch einer einzelnen MacD-Aminosäure (N1357) einen stärkeren Einfluss auf die zelluläre Genexpression hat als andere MacD-Mutanten, bei denen die MacD vollständig deletiert oder katalytisch inaktiv war. IFN- β -vorbehandelte sowie mit HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infizierte A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen zeigten eine erhöhte IFN- β -Synthese.

Die Daten zeigen HCoV-229E-MacD als einen Regulator der antiviralen Abwehr des Wirts, der die PARP-Expression, die IRF3- und FRA1-assoziierte Signalwege sowie die ADP-Ribosylierung moduliert. MacD-Mutanten, insbesondere solche mit Veränderungen an N1357, lösten eine stärkere Immunaktivierung aus als katalytisch inaktive oder Deletionsmutanten, was auf spezifische Funktionen einzelner MacD-Aminosäuren zur Modulation der angeborenen Immunantwort hinweist. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse die vielseitige Rolle der MacD in Coronavirus-Wirt-Interaktionen und deuten darauf hin, dass ihre strukturellen Eigenschaften die Immunregulation entscheidend beeinflussen können. Damit könnten virale MacDs ein potenzielles Target für die Entwicklung neuer antiviraler Therapeutika und attenuierter Lebendimpfstoffe gegen Coronavirusinfektionen sein.

Anhang

7. Anhang

Tabelle 7-1: Primereffizienzen der verwendeten RT-qPCR-Primersets für alle 17 humanen PARPs, IRF3, IRF7, TBK1 und GAPDH

Genbezeichnung	Primereffizienz
PARP1	1,86
PARP2	1,84
PARP3	1,89
PARP4	1,88
PARP5a	1,89
PARP5b	1,89
PARP6	1,83
PARP7	1,88
PARP8	1,99
PARP9	1,98
PARP10	1,87
PARP11	1,93
PARP12	1,82
PARP13	1,98
PARP14	1,95
PARP15	1,97
PARP16	1,98
IRF3	1,98
IRF7	1,89
TBK1	1,97
GAPDH	1,95

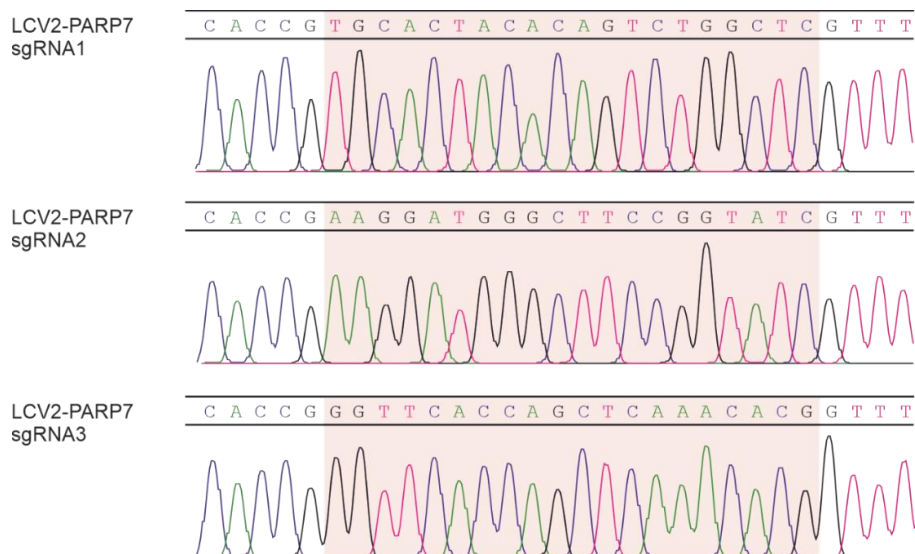


Abbildung 7-1: Sequenzierung klonierter LCV2-Plasmide mit je einer der drei PARP7 sgRNAs. Abgebildet sind die verwendeten sgRNAs (rot hinterlegt) und die entsprechenden Überhänge, die für die Klonierung in das LCV2-Plasmid benötigt wurden.

Anhang

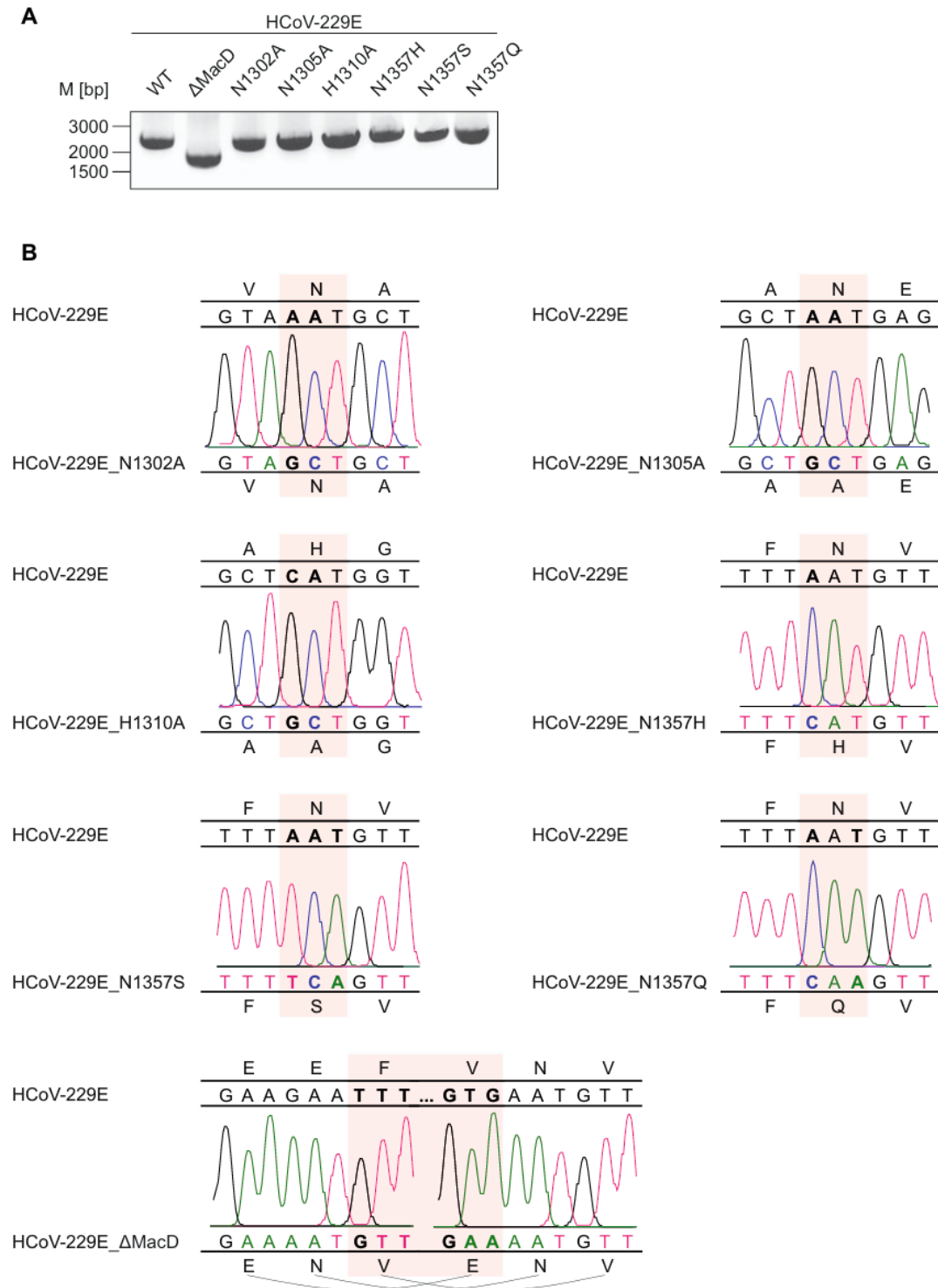


Abbildung 7-2: Validierung der HCoV-229E-MacD-Mutanten. Die HCoV-229E-MacD-Mutanten wurden mittels reverser Genetik innerhalb der Arbeitsgruppe Ziebuhr generiert. Virale Stocklösungen wurden vor Beginn der Experimente erneut mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Dafür wurde RNA infizierter Zellen isoliert, in cDNA transkribiert und die aufgereinigten PCR-Produkte (A) an die Firma LGC für die Sanger-Sequenzierung (B) versendet. Mutierte Nuklein- bzw. Aminosäuren sind rot hinterlegt.

Anhang

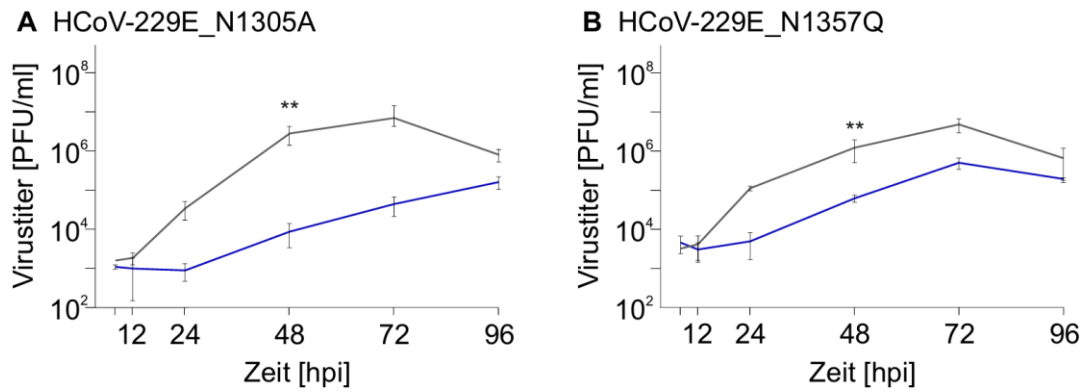


Abbildung 7-3: Replikation von HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in MRC-5-Zellen abhängig von einer Vorbehandlung mit IFN- β . MRC-5-Zellen wurden infiziert (grau) bzw. 16 h IFN- β -vorbehandelt und infiziert (blau). Die Infektion erfolgte mit HCoV-229E_N1305A (A) oder HCoV-229E_N1357Q (B) jeweils mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die Virustiterbestimmung [PFU/ml] erfolgte mit Hilfe von Plaque-Assays über einen Zeitraum von 8 bis 96 hpi. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchsansätzen (Mittelwert \pm SEM). Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test ermittelt (** $p \leq 0,005$).

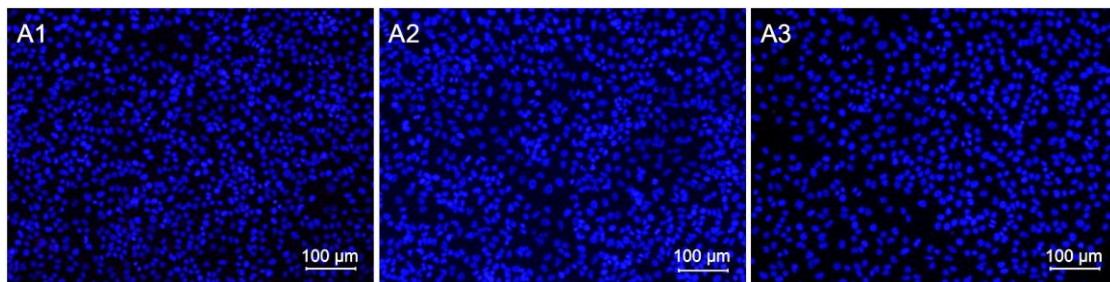


Abbildung 7-4: Immunfluoreszenzanalyse von A549-Zellen, die mit HCoV-229E MOI 0,1 (A2) oder MOI 5,0 (A3) infiziert wurden. Die Zellen wurden 48 hpi fixiert und permeabilisiert. Eine nicht infizierte Kontrolle (A1) wurde analog mitgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt (blau). Infizierte Zellen wurden mit einem gegen das virale N-Protein gerichteten Primärantikörper angefärbt. Als Sekundärantikörper wurde ein AlexaFluor 594 F(ab')₂ Fragment *goat- α -mouse*- IgG (rot) verwendet.

Anhang

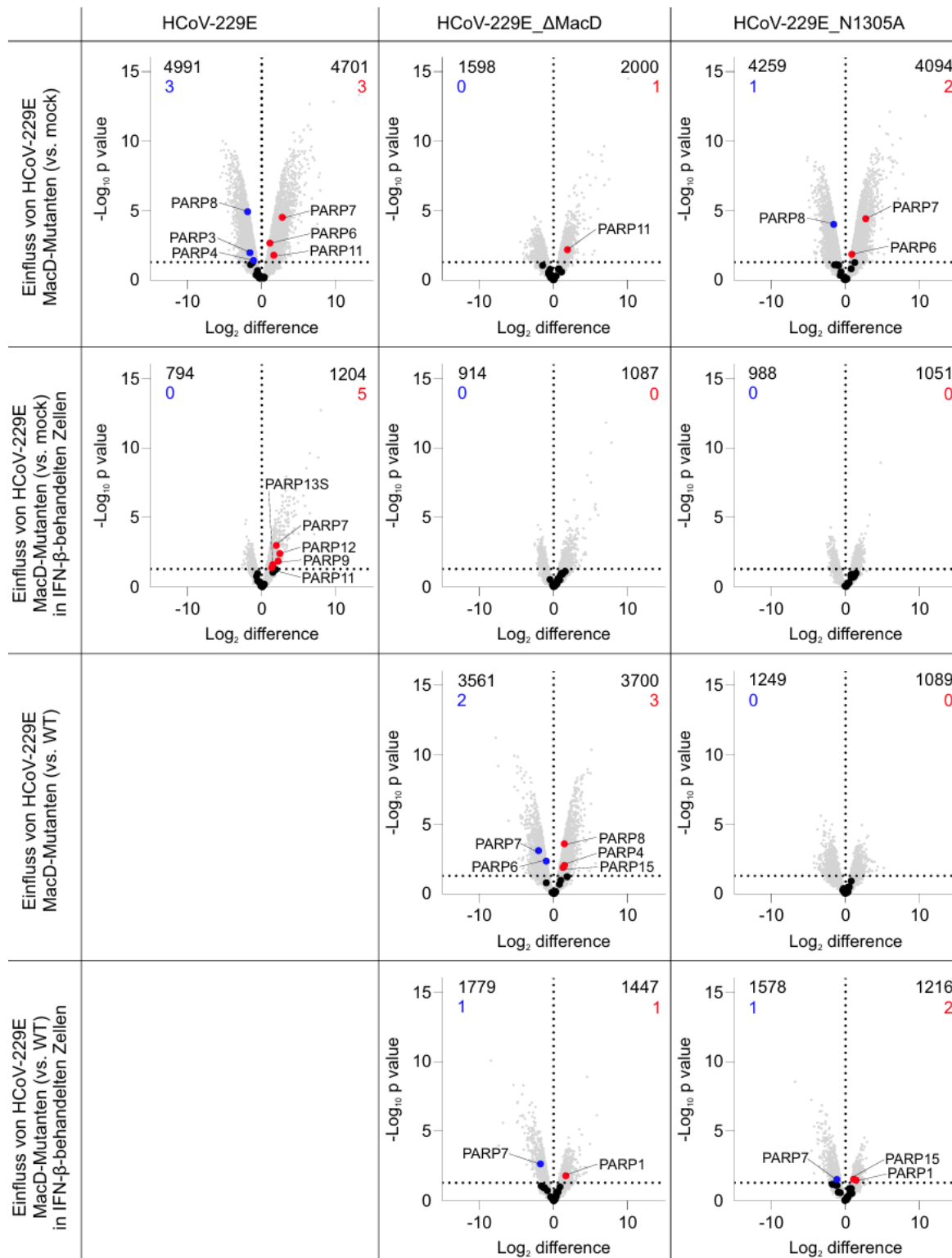


Abbildung 7-5: PARP-Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung dargestellt. Die Genexpression wurde im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Kontrollzellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) ermittelt.

Anhang

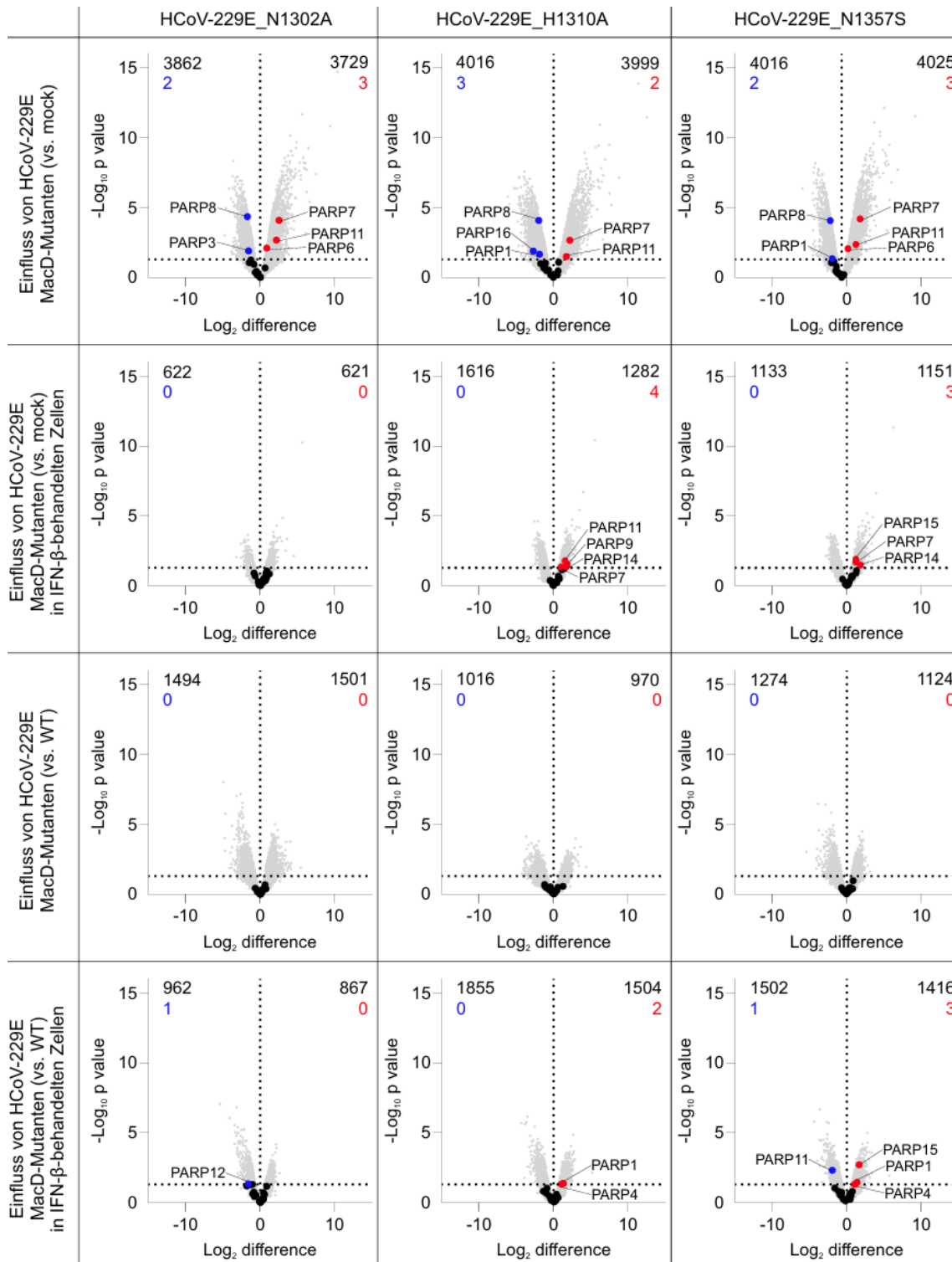


Abbildung 7-6: PARP-Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung dargestellt. Die Genexpression wurde im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Kontrollzellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) ermittelt.

Anhang

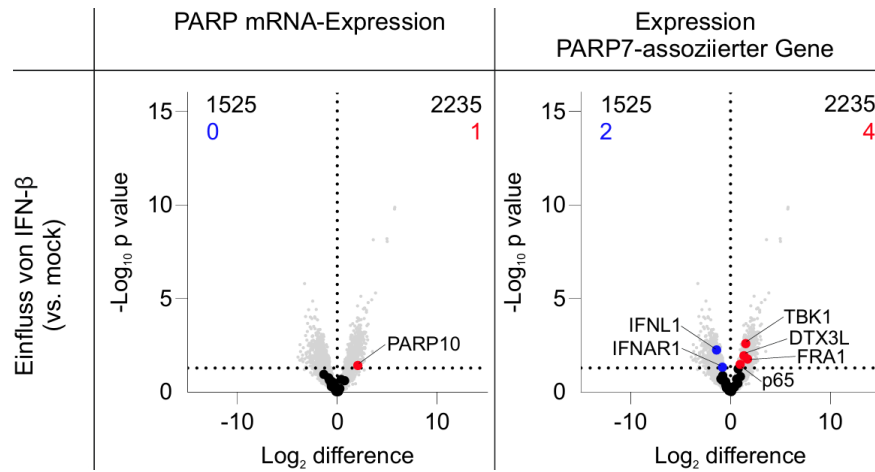


Abbildung 7-7: Genexpression von PARPs und mit PARP7 im Zusammenhang stehenden antiviralen Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von IFN- β . In den Vulkanplots ist der Einfluss von IFN- β nach der Behandlung für 16 h dargestellt. Die Zellen wurden weitere 48 h bei 33 °C in IFN- β -freiem Medium kultiviert. Anschließend wurde die RNA isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs (links) und die Regulation von mit PARP7-assozierten antiviralen Genen (rechts).

Anhang

Auszug aus dem für die statistische Auswertung der NGS-Genexpression verwendeten Programmiercode aus R. Die Analyse erfolgte im folgenden Code beispielhaft für eine der Zelllinien, die mit IFN- β -vorbehandelt und mit HCoV-229E (WT oder MacD-Mutanten) infiziert wurde. Verwendet wurden die folgenden (Bioconductor) Arbeitspakete: *DESeq2*, *clusterProfiler*, *ggplot2*, *openxlsx*, *tidyverse*, *org.Hs.eg.db*, *ReactomePA*, *ComplexHeatmap*, *EnhancedVolcano*, *RColorBrewer*, *circlize* und *magrittr*.

```
## Datenvorbereitung
# Datenimport Genomannotation
myorgdb <- "org.Hs.eg.db"
# Datenimport KEGG
myorganism <- "hsa"
# Datenimport von nf-core RNA-Seq Pipeline (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Bartkuhn)
load("deseq2.dds.RData")
# Datenimport Probenübersicht
defs2 <- read.xlsx("samples.xlsx")
# Datenüberprüfung und Strukturierung
defs <- colData(dds)
defs$sample <- sapply(strsplit(defs$sample, "_LMS_0225"), function(x) x[1])
defs3 <- merge(defs, defs2, by.x="sample", by.y="Sample.name")
rownames(defs3) <- defs3$sample
defs3 <- defs3[,c(1,5,7,8)]
colnames(dds) <- sapply(strsplit(colnames(dds), "_LMS_0225"), function(x) x[1])
# Erstellen eines DESeqDatensets unter Einbindung weiterer Probeninformationen
defs3$combined <- paste(defs3$virus, defs3$treatment, sep="_")
ddstest <- DESeqDataSetFromMatrix(countData = counts(dds)[,rownames(defs3)],
                                colData = defs3,
                                design = ~ combined)
ddstest <- DESeq(ddstest)

## Datenanalyse mittels Einzelvergleichen
# Auswahl relevanter Vergleiche
mycontrasts <- list(
  # Vergleich Virus vs mock ohne Behandlung
  c("combined", "WT_ctrl", "mock_ctrl"),
  c("combined", "deltaMacD_ctrl", "mock_ctrl"),
  c("combined", "N1305A_ctrl", "mock_ctrl"),
  c("combined", "N1357H_ctrl", "mock_ctrl"),
  c("combined", "N1357Q_ctrl", "mock_ctrl"),
  c("combined", "N1357S_ctrl", "mock_ctrl"),
  # Vergleich MacD-Mutanten vs WT ohne Behandlung
  c("combined", "deltaMacD_ctrl", "WT_ctrl"),
  c("combined", "N1305A_ctrl", "WT_ctrl"),
  c("combined", "N1357H_ctrl", "WT_ctrl"),
  c("combined", "N1357Q_ctrl", "WT_ctrl"),
  c("combined", "N1357S_ctrl", "WT_ctrl"),
```

Anhang

```
# Vergleich von Virus vs mock mit IFN-β-Behandlung
c("combined", "mock_IFN", "mock_ctrl"),
c("combined", "WT_IFN", "mock_IFN"),
c("combined", "deltaMacD_IFN", "mock_IFN"),
c("combined", "N1305A_IFN", "mock_IFN"),
c("combined", "N1357H_IFN", "mock_IFN"),
c("combined", "N1357Q_IFN", "mock_IFN"),
c("combined", "N1357S_IFN", "mock_IFN"),
# Vergleich MacD-Mutanten vs WT mit IFN-β-Behandlung
c("combined", "deltaMacD_IFN", "WT_IFN"),
c("combined", "N1305A_IFN", "WT_IFN"),
c("combined", "N1357H_IFN", "WT_IFN"),
c("combined", "N1357Q_IFN", "WT_IFN"),
c("combined", "N1357S_IFN", "WT_IFN"),
# Vergleich Virus vs Virus mit bzw. ohne IFN-β-Behandlung
c("combined", "WT_IFN", "WT_ctrl"),
c("combined", "deltaMacD_IFN", "deltaMacD_ctrl"),
c("combined", "N1305A_IFN", "N1305A_ctrl"),
c("combined", "N1357H_IFN", "N1357H_ctrl"),
c("combined", "N1357Q_IFN", "N1357Q_ctrl"),
c("combined", "N1357S_IFN", "N1357S_ctrl"),
# Vergleich von Virus vs mock mit RBN-2397-Behandlung
c("combined", "mock_RBN", "mock_ctrl"),
c("combined", "WT_RBN", "mock_RBN"),
c("combined", "deltaMacD_RBN", "mock_RBN"),
c("combined", "N1305A_RBN", "mock_RBN"),
c("combined", "N1357H_RBN", "mock_RBN"),
c("combined", "N1357Q_RBN", "mock_RBN"),
c("combined", "N1357S_RBN", "mock_RBN"),
# Vergleich von Virus vs WT mit RBN-2397-Behandlung
c("combined", "deltaMacD_RBN", "WT_RBN"),
c("combined", "N1305A_RBN", "WT_RBN"),
c("combined", "N1357H_RBN", "WT_RBN"),
c("combined", "N1357Q_RBN", "WT_RBN"),
c("combined", "N1357S_RBN", "WT_RBN"),
# Vergleich von Virus vs Virus mit bzw. ohne RBN-2397-Behandlung
c("combined", "WT_RBN", "WT_ctrl"),
c("combined", "deltaMacD_RBN", "deltaMacD_ctrl"),
c("combined", "N1305A_RBN", "N1305A_ctrl"),
c("combined", "N1357H_RBN", "N1357H_ctrl"),
c("combined", "N1357Q_RBN", "N1357Q_ctrl"),
c("combined", "N1357S_RBN", "N1357S_ctrl")
)
```

Anhang

```
# Benennung relevanter Vergleiche
names(mycontrasts)<-lapply(mycontrasts,function(x) paste(x,collapse = "_"))
# Analyse relevanter Vergleiche (als Liste speichern)
resL <- list()
for ( i in names(mycontrasts)) {
  print(i)
  resL[[i]] <- results(ddstest,contrast=mycontrasts[[i]])
}
# Anpassen von Threshold und Log2FoldChange (p-Werte ungleich Null)
resL <- list()
resLalt <- list()
for ( i in names(mycontrasts)) {
  print(i)
  resL[[i]] <- results(ddstest,contrast=mycontrasts[[i]])
  resLalt[[i]] <- results(ddstest,contrast=mycontrasts[[i]],lfcThreshold=1,altHypothesis="greaterAbs")
  resLalt[[i]] <- lfcShrink(ddstest,contrast=mycontrasts[[i]],res=resLalt[[i]],type="normal")
}
# Dataframe-Anpassung
resL.genes <- as.data.frame(resLalt$combined_mock_IFN_mock_ctrl@rownames)
colnames(resL.genes) <- c("gene")
resLalt.df <- as.data.frame(resLalt)
resL_total <- cbind(resL.genes, resLalt.df)
resL_total.df <- as.data.frame(resL_total)
# Umbenennung ausgewählter Gene (beispielhaft dargestellt PARP7)
resL_total_renamed <- data.frame(apply(resL_total, 2,
  function(x) gsub("TIPARP", "PARP7",x)), stringAsFactors = FALSE)

## Datenexport als Exceldateien
# Export Gesamtdatensatz
write.xlsx(resL_total_renamed,
  "C:/.../contrasts_total_renamed.xlsx")
# Export PARPs
resL_total_renamed_PARPs <- filter(resL_total_renamed, gene %in%
  c("PARP1", "PARP2", "PARP3", "PARP4", "PARP5a", "PARP5b", "PARP6", "PARP7",
  "PARP8", "PARP9", "PARP10", "PARP11", "PARP12", "PARP13_ZAPS",
  "PARP13_ZAPL", "PARP14", "PARP15", "PARP16"))
write.xlsx(resL_total_renamed_PARPs, "C:/.../contrasts_renamed_PARPs.xlsx")
# Export PARP7-assoziierter Gene
resL_total_renamed_PARPrelated <- filter(resL_total_renamed, gene %in%
  c("RIG-I", "DTX3L", "FRA1", "MDA5", "IFNAR1", "IFNAR2", "IFNLR1", "IKBKE", "NEMO",
  "IRF3", "IRF7", "p50", "p65", "TBK1", "MAVS"))
write.xlsx(resL_total_renamed_PARPrelated, "C:/.../contrasts_renamed_PARPrelated.xlsx")
```

Anhang

Auszug aus dem für die Signalweganalyse und Darstellung der mittels NGS ermittelten Genexpression verwendeten Programmiercode aus R. Verwendet wurden die zusätzlich folgende Arbeitspakete: *org.Hs.eg.db*, *clusterProfiler*, *biomaRt*, *openxlsx*, *enrichplot* und *ggplot2*.

```
## Datenvorbereitung für Signalweganalysen
# Spalte mit Genbezeichnungen isolieren
genes_input <- unique(resL_total.df$gene)
# Basisannotation für ENTREZ, Ensemble, Genbezeichnung aus org.Hs.eg.db ergänzen
annot_basic <- AnnotationDbi::select(org.Hs.eg.db,
  keys = genes_input,
  columns = c("ENTREZID", "ENSEMBL", "GENENAME", "SYMBOL"),
  keytype = "SYMBOL") %>%
  distinct(SYMBOL, .keep_all = TRUE) %>%
  rename(gene = SYMBOL, Ensembl_Gene_ID = ENSEMBL, ENTREZ_ID = ENTREZID,
  Gene_Name = GENENAME)

# GO-Terms anhand der Entrez-ID zufügen
valid_entrez <- na.omit(unique(annot_basic$ENTREZ_ID))
go_map <- if(length(valid_entrez) > 0) { AnnotationDbi::select(org.Hs.eg.db,
  keys = valid_entrez, columns = "GO", keytype = "ENTREZID") %>%
  group_by(ENTREZ_ID) %>%
  summarise(GO_IDS = paste(unique(na.omit(GO)), collapse = ";", .groups = "")) } else {
  tibble(ENTREZ_ID = character(), GO_IDS = character()) }
names(go_map)[1] <- paste("ENTREZ_ID")

# KEGG-Zuordnung mittels clusterProfiler ergänzen
kegg_map <- if (length(valid_entrez) > 0) {
  kegg_enrich <- enrichKEGG(gene = valid_entrez, organism = "hsa", pvalueCutoff = 1)
  kegg_df <- as.data.frame(kegg_enrich)[, c("geneID", "ID")]
  kegg_long <- strsplit(kegg_df$geneID, "/|,")
  data.frame(ENTREZ_ID = unlist(kegg_long),
  KEGG_ID = rep(kegg_df$ID, lengths(kegg_long))) %>%
  group_by(ENTREZ_ID) %>%
  summarise(KEGG_IDS = paste(unique(KEGG_ID), collapse = ";", .groups = "drop")) } else {
  tibble(ENTREZ_ID = character(), KEGG_IDS = character()) }

# Biotype mittels biomaRt zufügen
mart <- useMart("ensembl", dataset = "hsapiens_gene_ensembl")
biomart_data <- getBM(attributes = c("hgnc_symbol", "ensembl_gene_id", "gene_biotype"),
  filters = "hgnc_symbol", values = genes_input, mart = mart)
```

Anhang

```
biomart_data <- biomart_data %>%
  rename(gene = hgnc_symbol, Ensembl_Gene_ID_biomart = ensembl_gene_id,
         Biotype = gene_biotype)
biomart_data <- biomart_data[c("gene", "Biotype")]

# Zusammenführen der Annotationen und Dopplungen entnehmen
annot_combined <- annot_basic %>%
  full_join(biomart_data, by = "gene") %>%
  mutate(Ensembl_Gene_ID = coalesce(Ensembl_Gene_ID)) %>%
  left_join(go_map, by = "ENTREZ_ID") %>%
  left_join(kegg_map, by = "ENTREZ_ID")
annot_combined <- unique(annot_combined)
df_gene <- resL_total.df["gene"]
df_values <- resL_total.df[, 2:ncol(resL_total.df)]
resL_total_annotated <- df_gene %>% left_join(annot_combined, by = "gene")
resL_total_annotated <- merge(resL_total_annotated, resL_total.df, by = "gene")

## Datenexport als Exceldatei
write.xlsx(resL_total_annotated,
          "C:/.../contrasts_total_annotated.xlsx")
```

Anhang

Auszug aus dem für die statistische Auswertung der mittels RT-qPCR ermittelten Genexpression verwendeten Programmiercode aus R. Die Analyse erfolgte im folgenden Code beispielhaft für PARP7 in MRC-5-Zellen, die mit IFN- β -vorbehandelt und mit HCoV-229E (WT oder MacD-Mutanten) infiziert wurden. Verwendet wurden die folgenden Arbeitspakete: *readxl*, *writeexl*, *magrittr*, *tidyverse*, *dplyr*, *car*, *rstatix*, *ggpubr*, *gvlma*, *graphics*, *ggplot2*, *Hmisc* und *broom*.

```
## Datenvorbereitung
# Anzahl der Messreihen (WH) bzw. doppelte Messreihenanzahl (ZweiWH)
WH <- 5
ZweiWH <- 10

# Datenimport als Dataframe
PARP7_CT <- read_excel("PARPs_CT.xlsx", sheet = 8, col_names = TRUE, na = "k. A.")
# Dataframe nach Viren sortieren und in Listen aufteilen (hier für mock und HCoV-229E WT)
# analog für alle HCoV-229E-MacD-Mutanten analysiert
PARP7_CT_mock_WT <- PARP7_CT %>%
  filter("HCoV-229E" == "mock" | "HCoV-229E" == "WT")
PARP7_listereg <- split(PARP7_CT_mock_WT, PARP7_CT_mock_WT$"sample ohne MR")

## Berechnung der regulären Expression für unbehandelte mock Proben
# analog für IFN-beta-behandelte und infizierte Proben durchgeführt
Smatrix7reg_mock_ohneIFN <- sapply(PARP7_listereg,
  function(X, GAPDH_referenz, PARP_referenz, GAPDH_sample, PARP_sample,
    Primereffizienz_GAPDH, Primereffizienz_PARP7)
  {
    (Primereffizienz_GAPDH**GAPDH_sample / Primereffizienz_PARP7**PARP_sample)/
    (Primereffizienz_GAPDH**GAPDH_referenz / Primereffizienz_PARP7**PARP_referenz)
  },
  GAPDH_referenz = PARP7_listereg$P7_mock_ohneIFN$mean_GAPDH,
  PARP_referenz = PARP7_listereg$P7_mock_ohneIFN$mean_PARP7,
  GAPDH_sample = PARP7_listereg$P7_mock_ohneIFN$mean_GAPDH,
  PARP_sample = PARP7_listereg$P7_mock_ohneIFN$mean_PARP7,
  Primereffizienz_PARP7 = 1.88,
  Primereffizienz_GAPDH = 1.95
)

## Dataframes zusammenfügen für mock und WT (behandlungs-(un)abhängig)
# Datensatz normalisiert auf mock und GAPDH, gerundet auf 2 Nachkommastellen
# Matrix in Dataframe überführen
ddCT_PARP7_regexp_mock_ohneIFN.df <- as.data.frame(Smatrix7reg_mock_ohneIFN) %>%
  select(P7_mock_ohneIFN) %>% round(digits = 2)
ddCT_PARP7_regexp_mock_ohneIFN.df <- cbind(PARPs = "PARP7",
  sample = "mock_ohneIFN", ddCT_PARP7_regexp_mock_ohneIFN.df)
names(ddCT_PARP7_regexp_mock_ohneIFN.df) [3] = "ddCT"
```

Anhang

```
## Identifizierung von Ausreißern
# Datensatz zusammenfügen für alle (un-) behandelten (un-) infizierten Proben
# Matrix normalisiert auf mock und GAPDG, gerundet auf zwei Nachkommastellen in Dataframe
# Berechnung mittels Interquartilsabstand (Ausreißer besitzen Abweichung > bzw. < 1.5x IQR)
PARPs_regexp_Outliers <- PARPs_regexp.df %>% group_by(ID) %>%
  mutate(Outlier = ddCT < quantile(ddCT, 0.25) - IQR(ddCT)*1.5 |
  ddCT > quantile(ddCT, 0.75) + IQR(ddCT)*1.5) %>%
  ungroup()
# Ausreißer aus Gesamtdatensatz entfernen und durch NA ersetzen, wenn "Outliers" == TRUE
PARPs_regexp_Outliers_NA <- function(df) {
  if (!("ddCT" %in% names(df)) || !("Outlier" %in% names(df))) {
    stop("'ddCT' und 'Outliers' müssen in Dataframe enthalten sein")
  }
  df$ddCT[df$Outlier == TRUE] <- NA
  return(df)
}
PARPs_regexp_Outliers_NA <- PARPs_regexp_Outliers_NA(PARPs_regexp_Outliers)

## Two-way ANOVA und Post-hoc Test
# Explorative Datenanalyse (EDA) durchgeführt, um Datensatz auf Normalverteilung bzw.
# Inhomogenität der Varianzen (Heterogenität) zu prüfen
# Erstellung von Boxplots bzw. Normal-QQ-Plots --> keine Normalverteilung
# log10-Transformation der ddCT-Daten, um Two-way ANOVA durchführen zu können
ANOVA_PARP7_final <- summary(fm <- aov(log10(ddCT) ~ Virus*treatment, data =
ANOVA_PARP7, subset = Virus != "mock"))
# Post-hoc Test (Tukey's Honestly-Significant-Difference test)
Post_Hoc_PARP7 <- TukeyHSD(fm <- aov(log10(ddCT) ~ Virus*treatment, data =
ANOVA_PARP7))
Post_Hoc_PARP7 <- tidy(Post_Hoc_PARP7)
```

Anhang

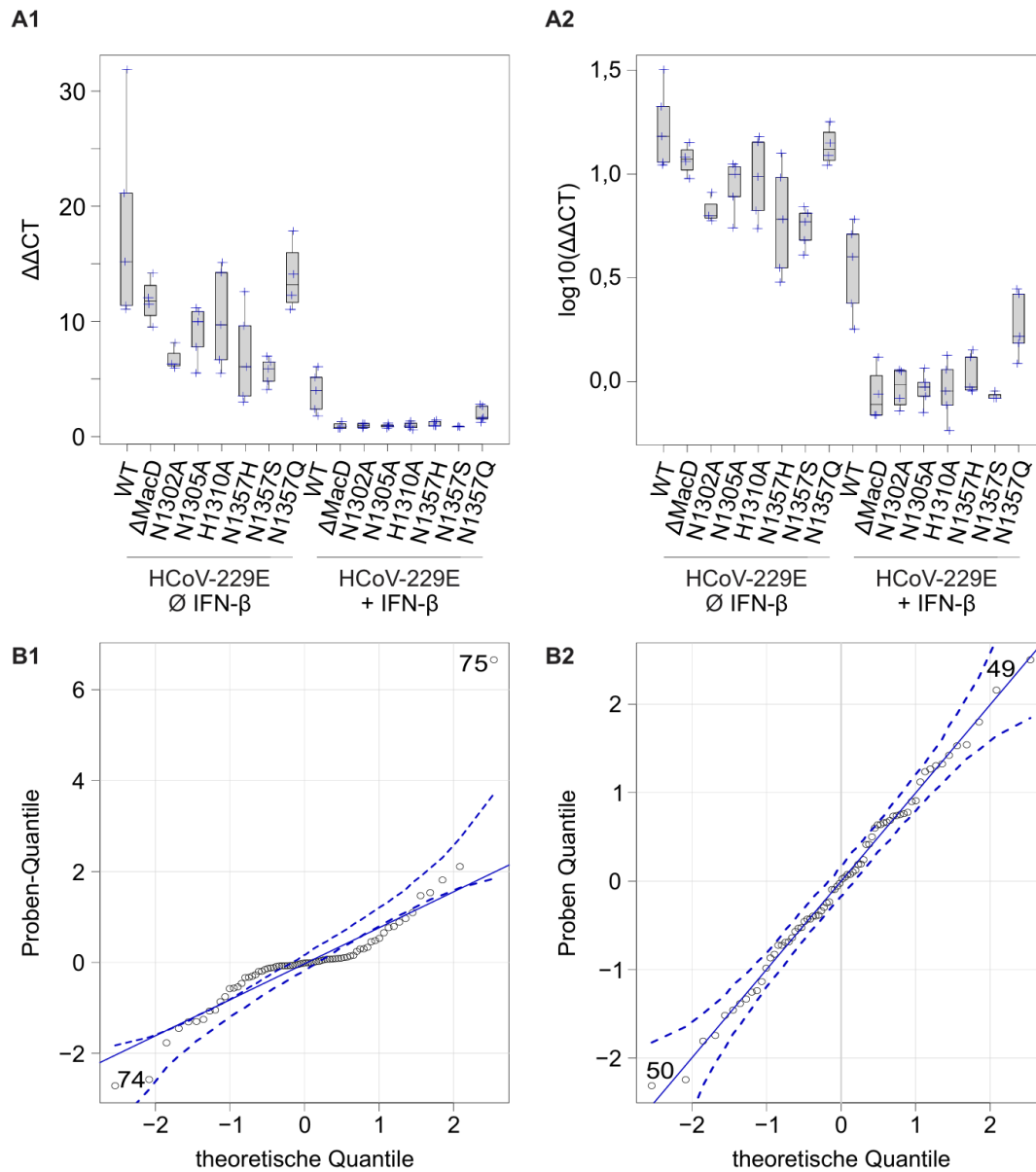


Abbildung 7-8: Explorative Datenanalyse mittels Boxplot (A) und QQ-Plot (B) der PARP7-Expression des raw Datensatzes (A1, B1) bzw. des log10-transformierten Datensatzes (A2, B2). Den QQ-Plots sind die Referenzlinien zugefügt und die 95 % Konfidenzintervalle mittels Strichlinien gekennzeichnet. Die Daten zeigen MRC-5-Zellen welche mit HCoV-229E (WT) oder MacD-Mutanten (MOI von 0,1, 33 °C) infiziert wurden. Die Proben wurden in Abhängigkeit von einer 16-stündigen Vorbehandlung mit IFN-β analysiert. Die RNA wurde 48 hpi isoliert.

Anhang

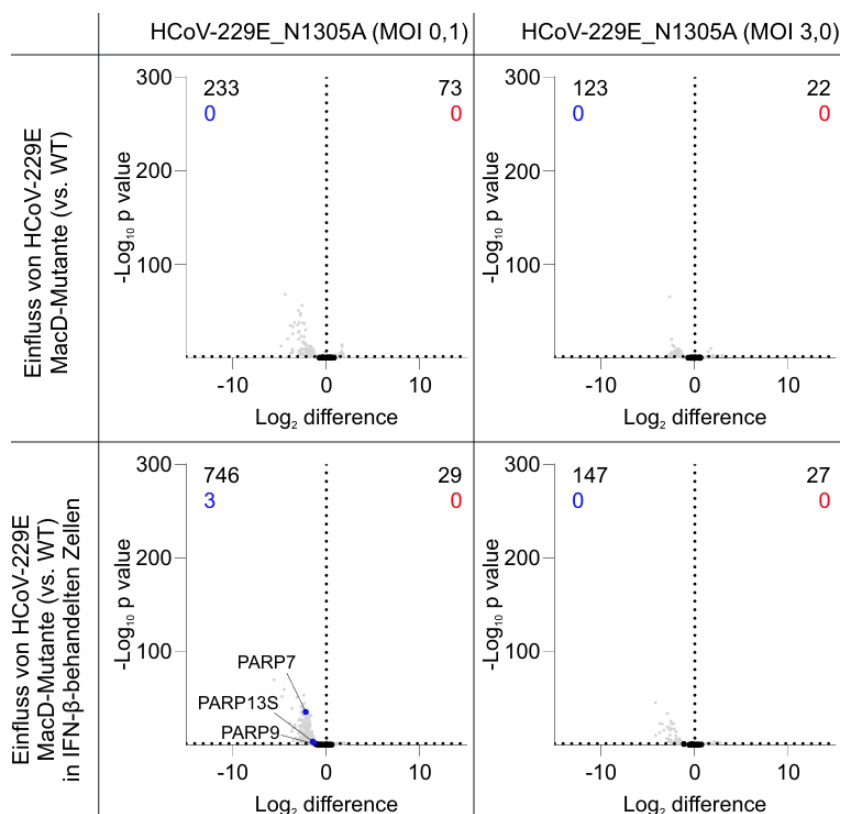


Abbildung 7-9: Genexpression in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN- β -Vorbehandlung und/oder HCoV-229E_N1305A-Infektion. Eine Behandlung mit IFN- β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 (links) bzw. 3,0 (rechts) bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E_N1305A. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die IFN- β -Zugabe (unten) jeweils im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten MRC-5-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Anhang

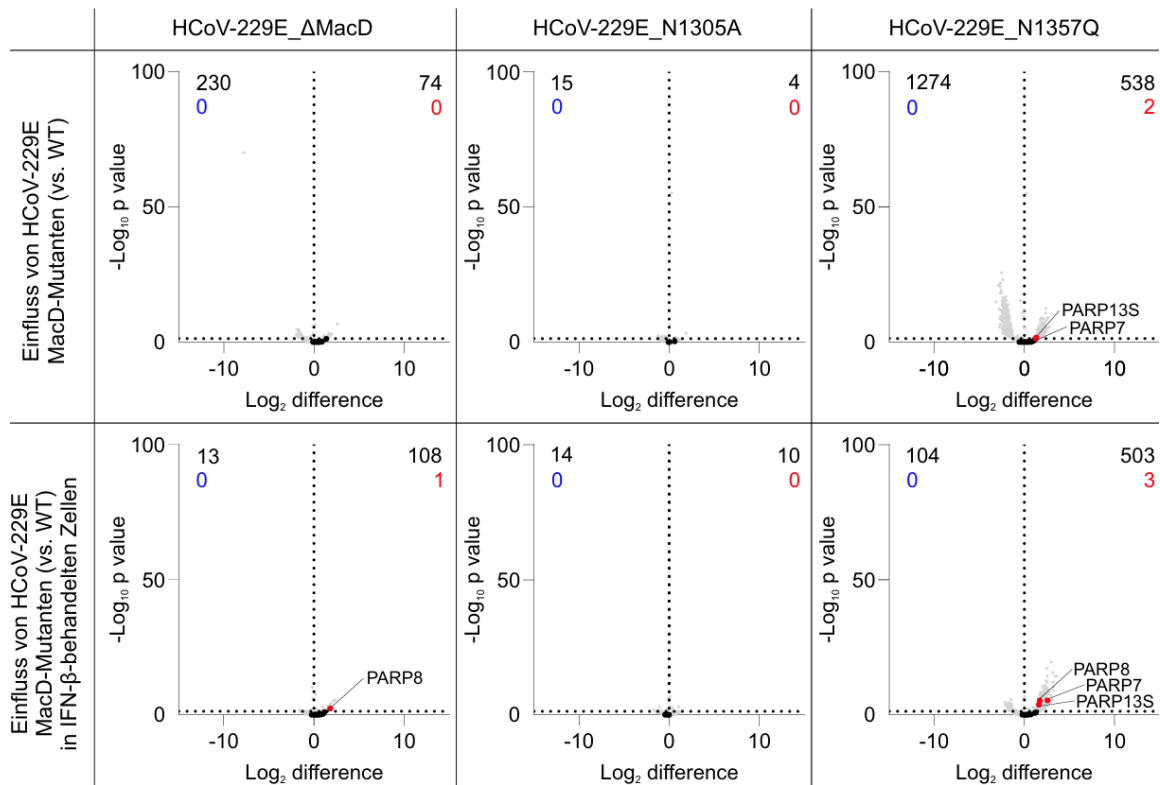


Abbildung 7-10: Genexpression in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E-MacD-Mutanten. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs für die Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A bzw. HCoV-229E_N1357Q. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion (oben) und die Regulation durch die IFN-β-Zugabe (unten) im Vergleich mit HCoV-229E-infizierten A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen dargestellt. Die (Gesamt-) Anzahl signifikant hoch- bzw. herunterregulierter Gene ist am oberen Abbildungsrand vermerkt.

Anhang

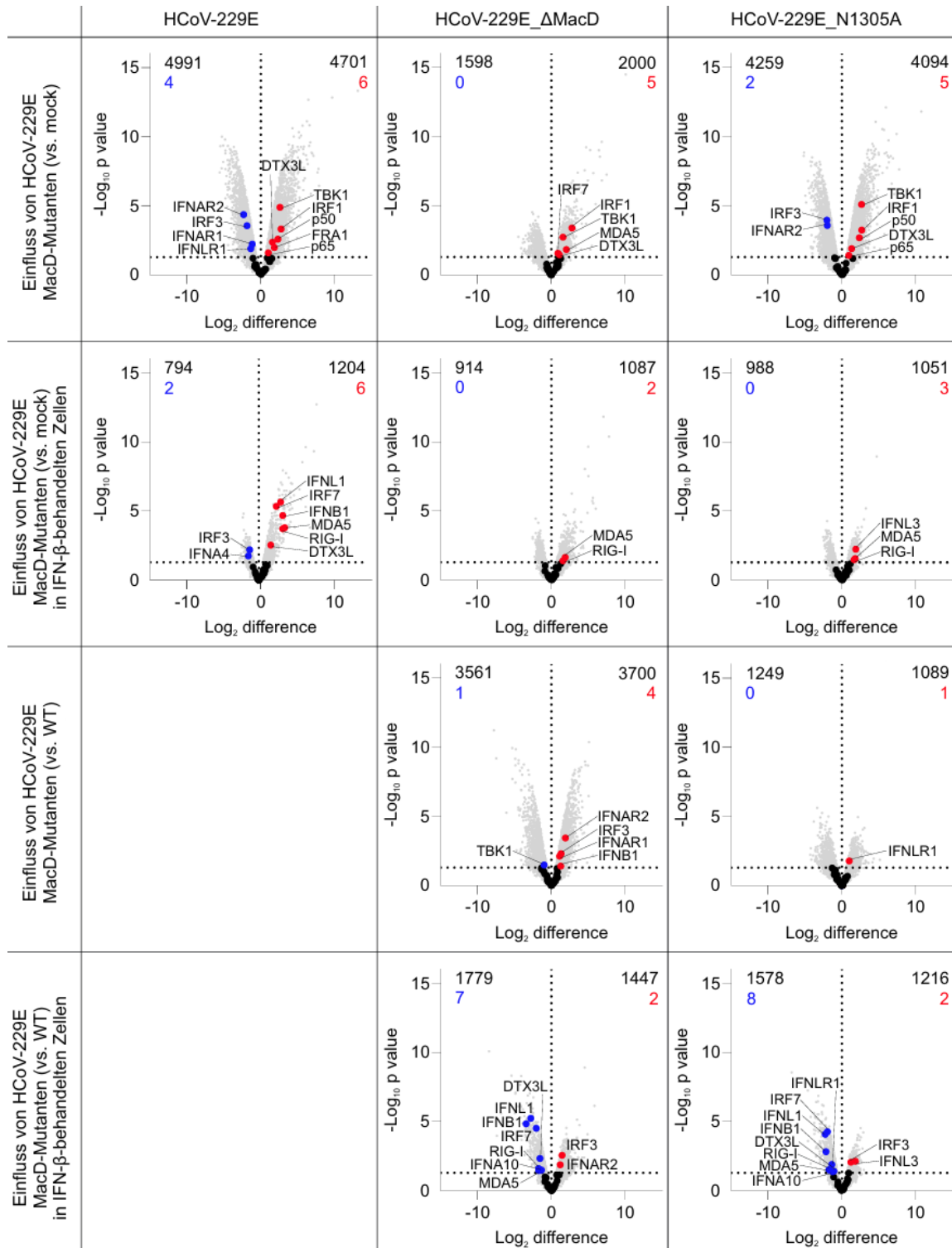


Abbildung 7-11: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A. Eine Vorbehandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD und HCoV-229E_N1305A in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung dargestellt. Die Genexpression wurde im Vergleich mit nicht infizierten Kontrollzellen (mock) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen ermittelt.

Anhang

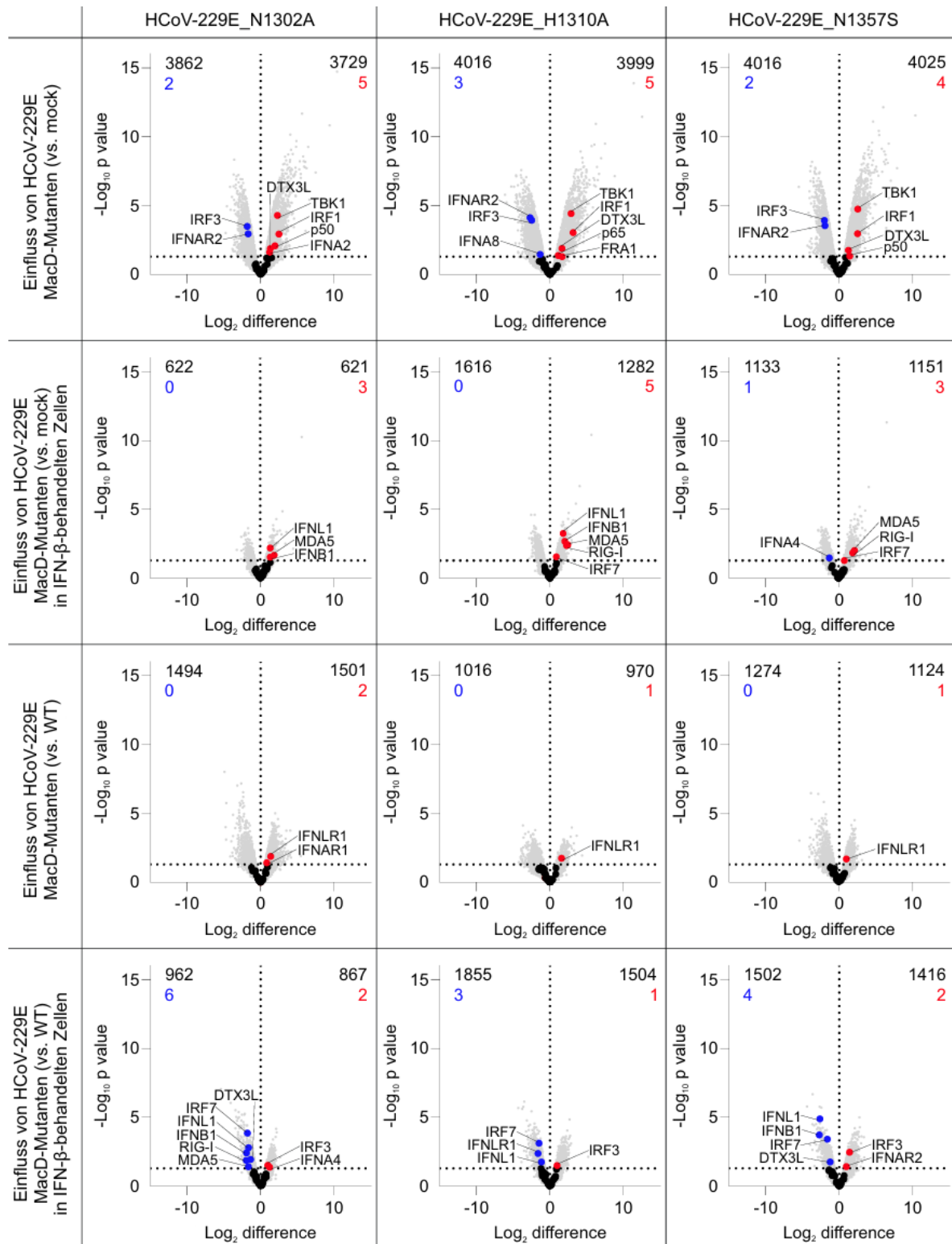


Abbildung 7-12: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in MRC-5-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_N1302A, HCoV-229E_H1310A und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β Vorbehandlung dargestellt. Die Genexpression wurde im Vergleich mit nicht infizierten Kontrollzellen (mock) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen ermittelt.

Anhang

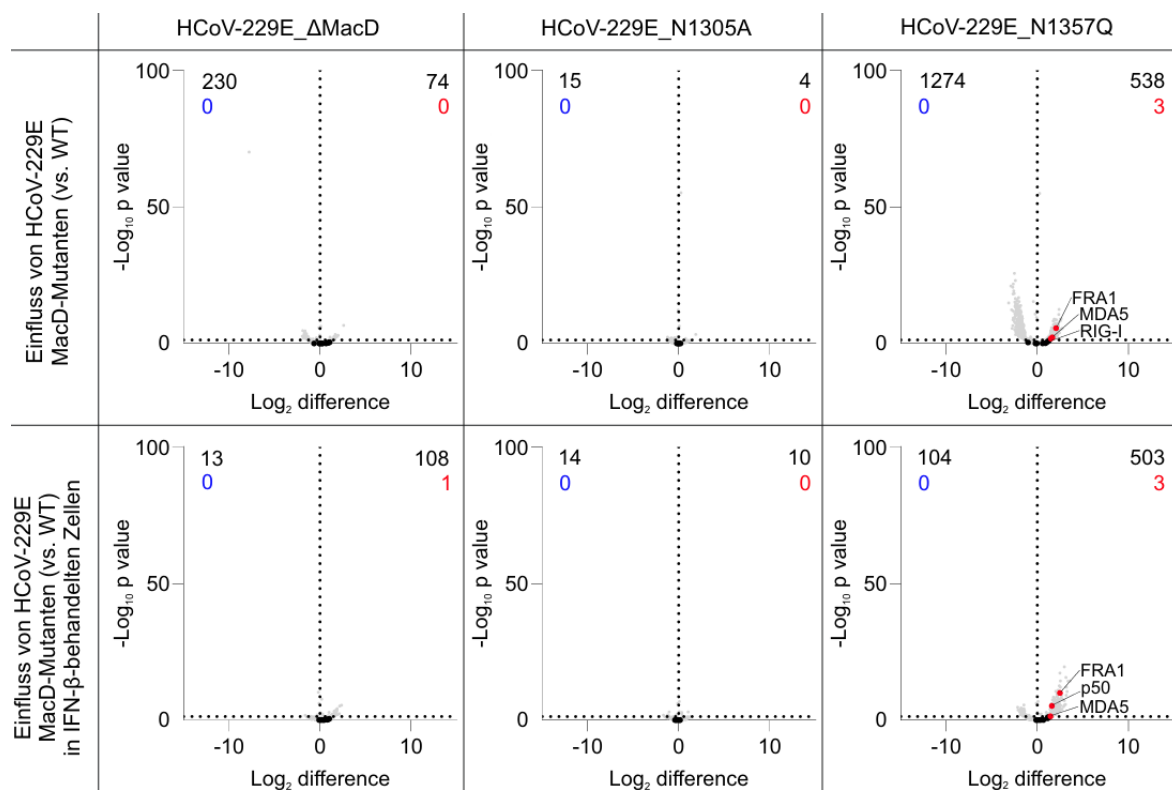


Abbildung 7-13: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

Anhang

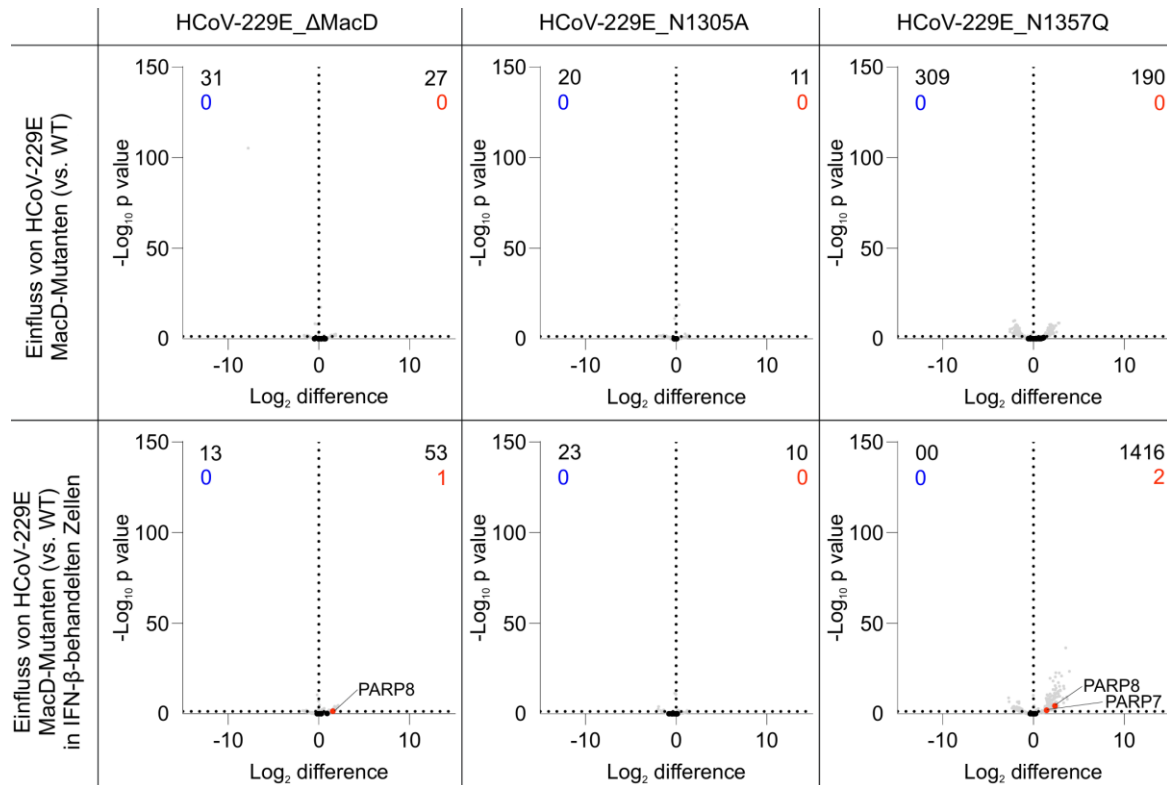


Abbildung 7-14: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

Anhang

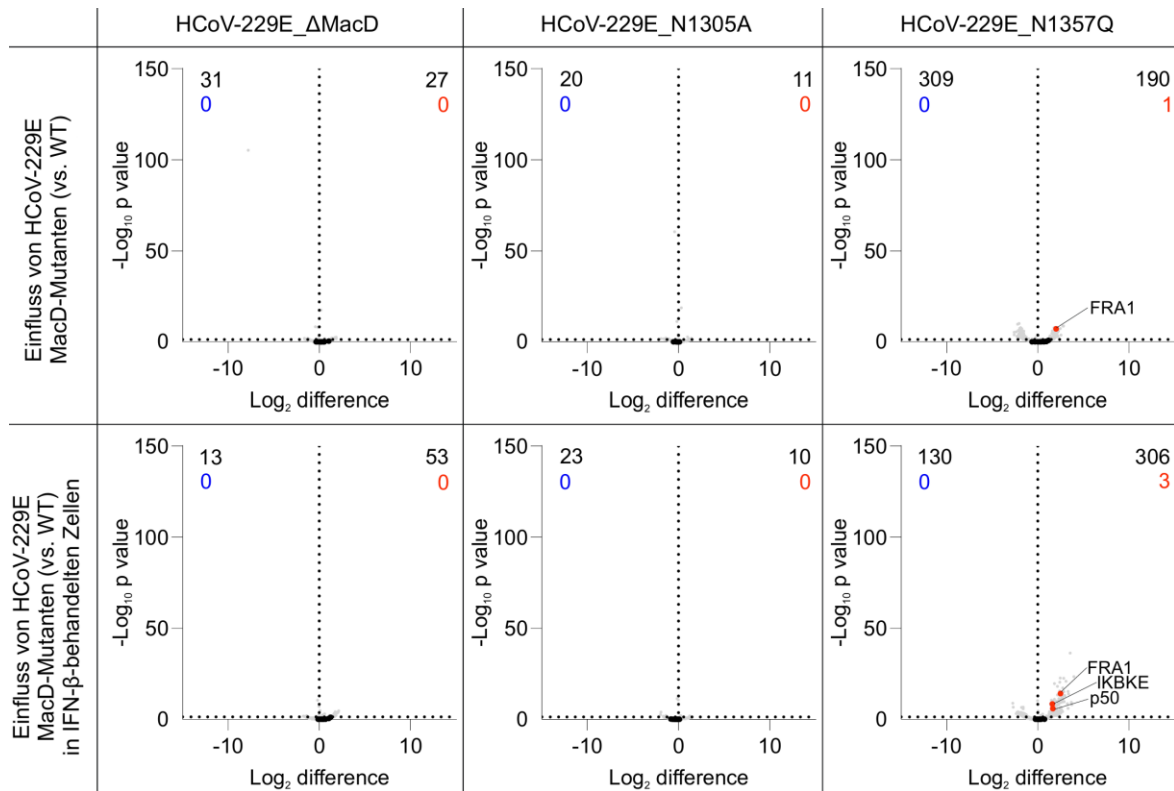


Abbildung 7-15: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

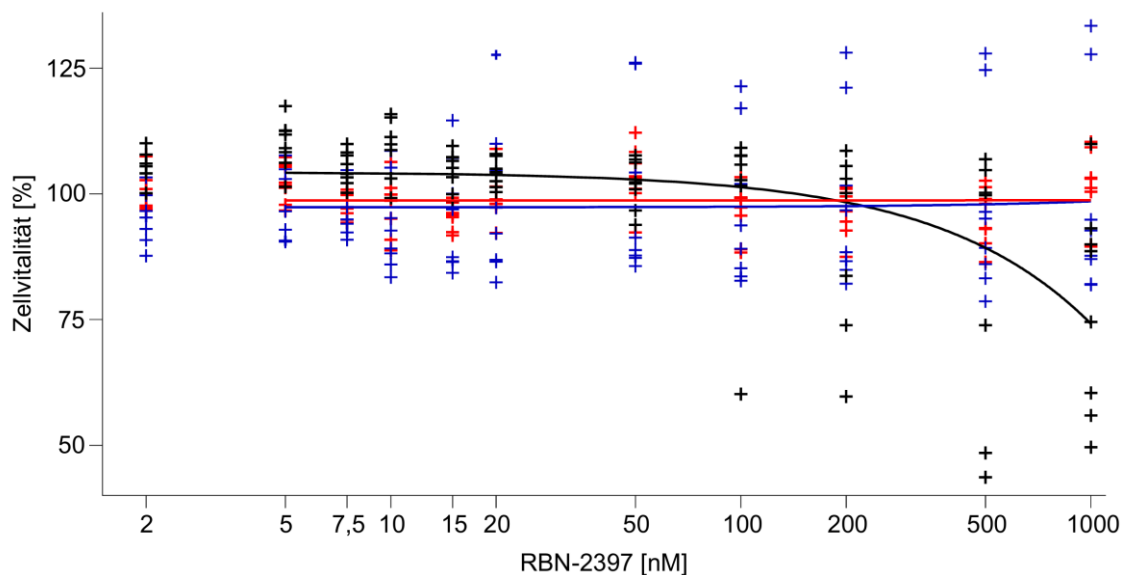


Abbildung 7-16: Zellvitalität in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung. Verschiedene Konzentrationen zwischen 2 und 1000nM des PARP7-Inhibitors wurden mittels MTT-Assay in MRC-5-Zellen (schwarz), A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen (blau) und A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD (rot) getestet.

Anhang

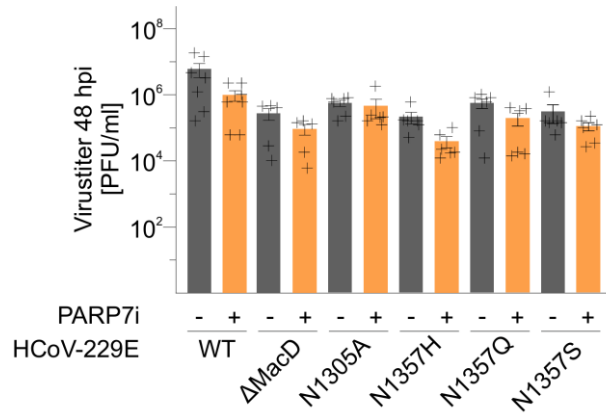


Abbildung 7-17: Virusreplikation von HCoV-229E (WT) und MacD-Mutanten in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung. MRC-5-Zellen wurden mit HCoV-229E, HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A, HCoV-229E_N1357H, HCoV-229E_N1357Q oder HCoV-229E_N1357S infiziert (grau) oder 24 hpi mit 7,8 nM PARP7i vorbehandelten und infiziert (orange). Die Infektion erfolgte mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Der Zellkulturüberstand wurde 48 hpi auf Huh-7-Zellen titriert. Dargestellt sind fünf unabhängige Versuchsansätze (Mittelwert ± SEM).

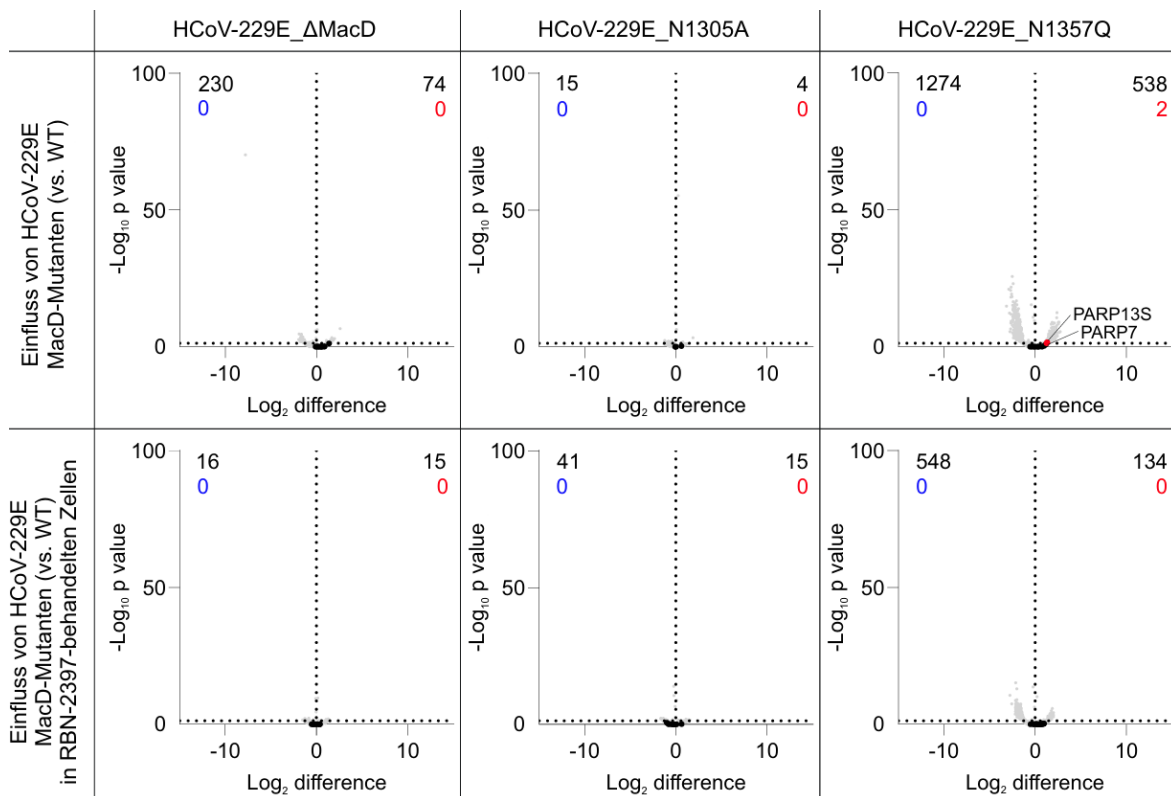


Abbildung 7-18: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (oben) in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung (unten) im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

Anhang

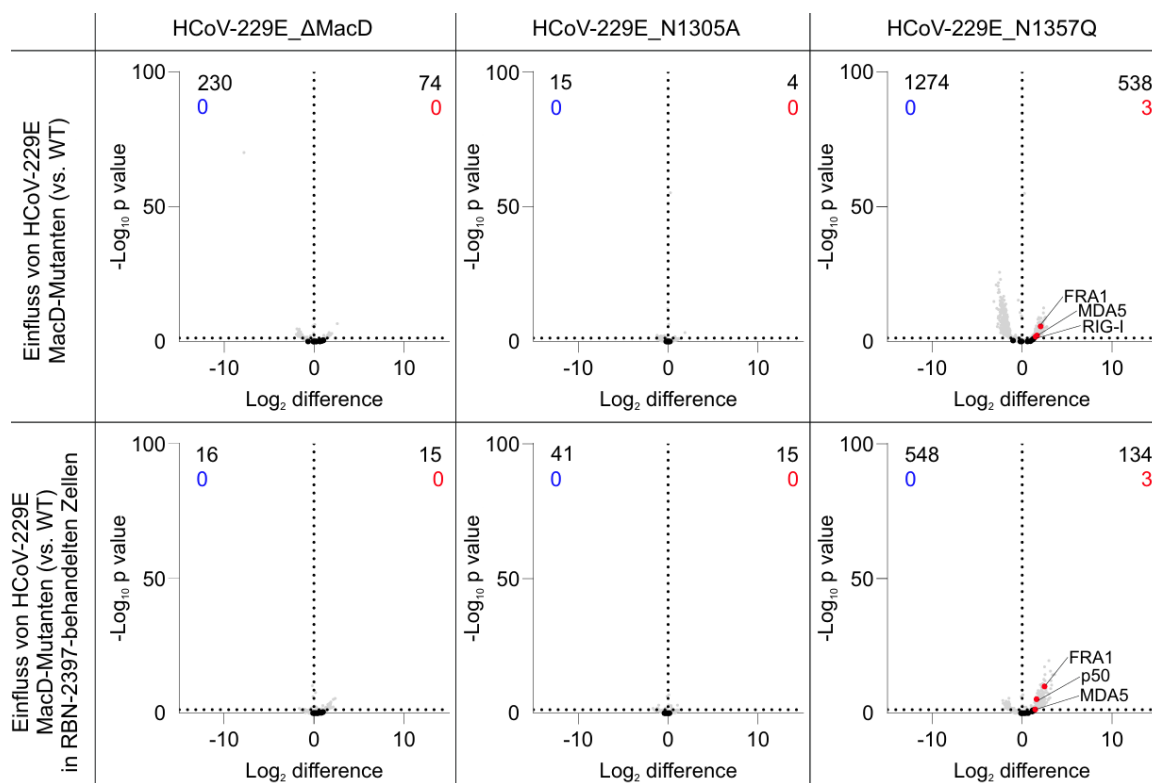


Abbildung 7-19: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (oben) in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung (unten) im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

Anhang

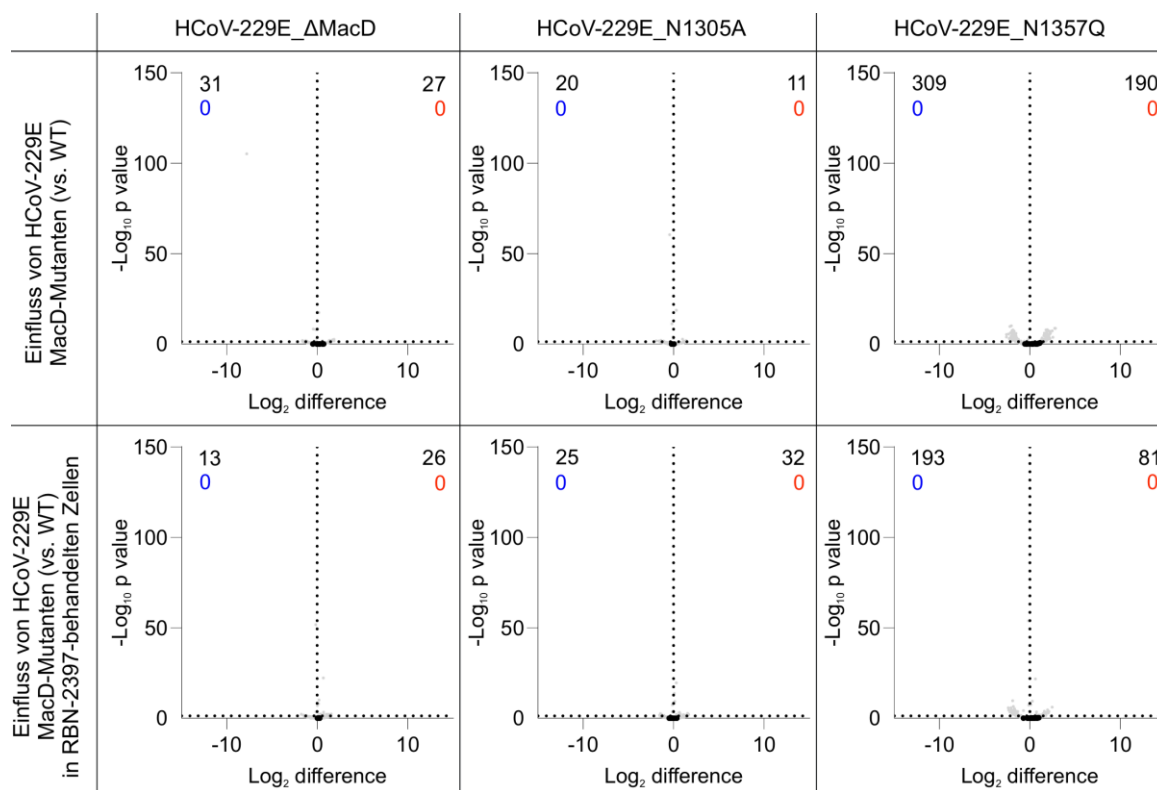


Abbildung 7-20: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33°C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (oben) in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung (unten) im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

Anhang

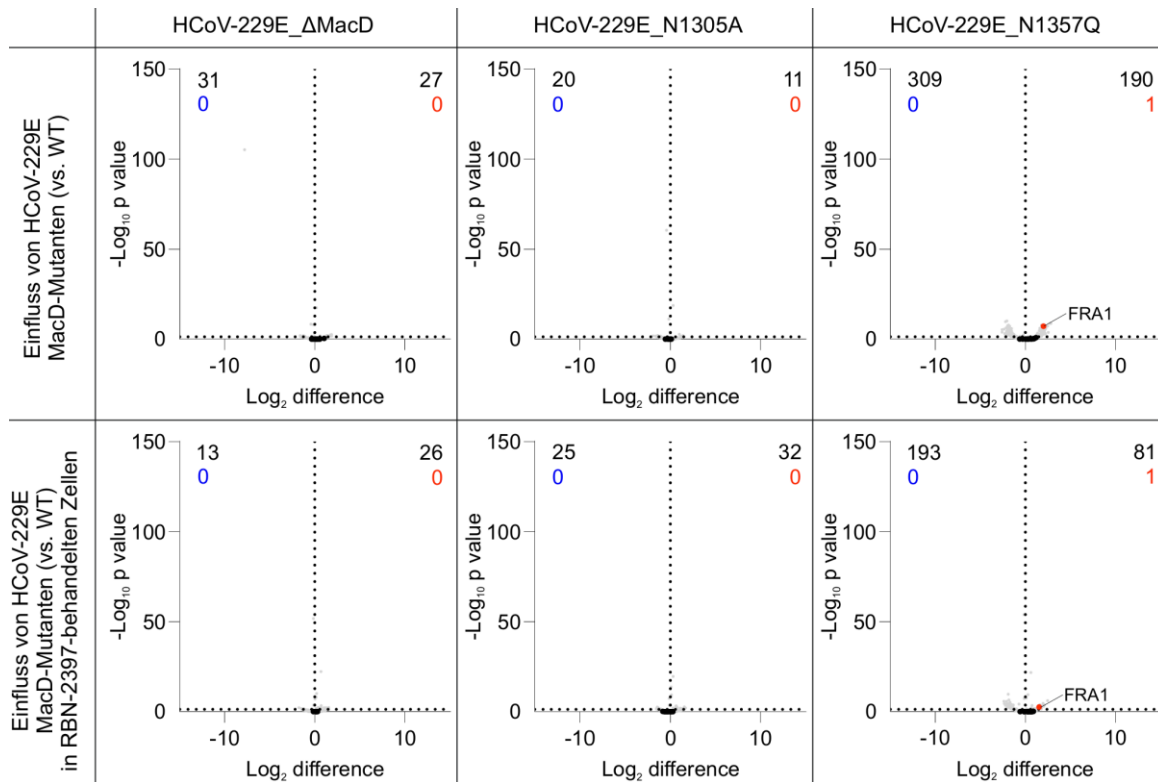


Abbildung 7-21: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E_ΔMacD, HCoV-229E_N1305A und HCoV-229E_N1357Q (oben) in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung (unten) im Vergleich mit HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen dargestellt.

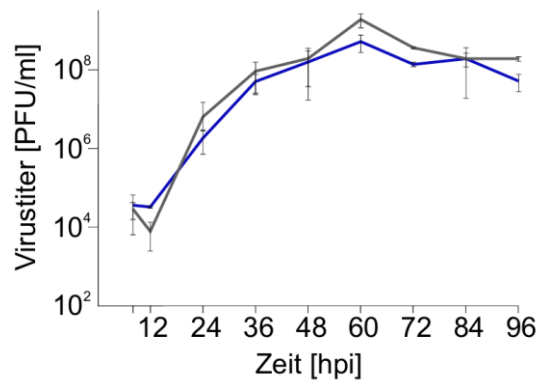


Abbildung 7-22: Replikationskinetik von HCoV-229E in Huh-7-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung. Huh-7-Zellen wurden mit HCoV-229E infiziert (grau) bzw. IFN-β-vorbehandelt (16h) und infiziert (blau). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Infektion [hpi] mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C wurde der Virustiter [PFU/ml] mit Hilfe von Plaque-Assays in Huh-7-Zellen ermittelt. Die Proben wurden 8- 96 hpi genommen. Aufgetragen sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchsansätzen (Mittelwert ± SEM).

Anhang

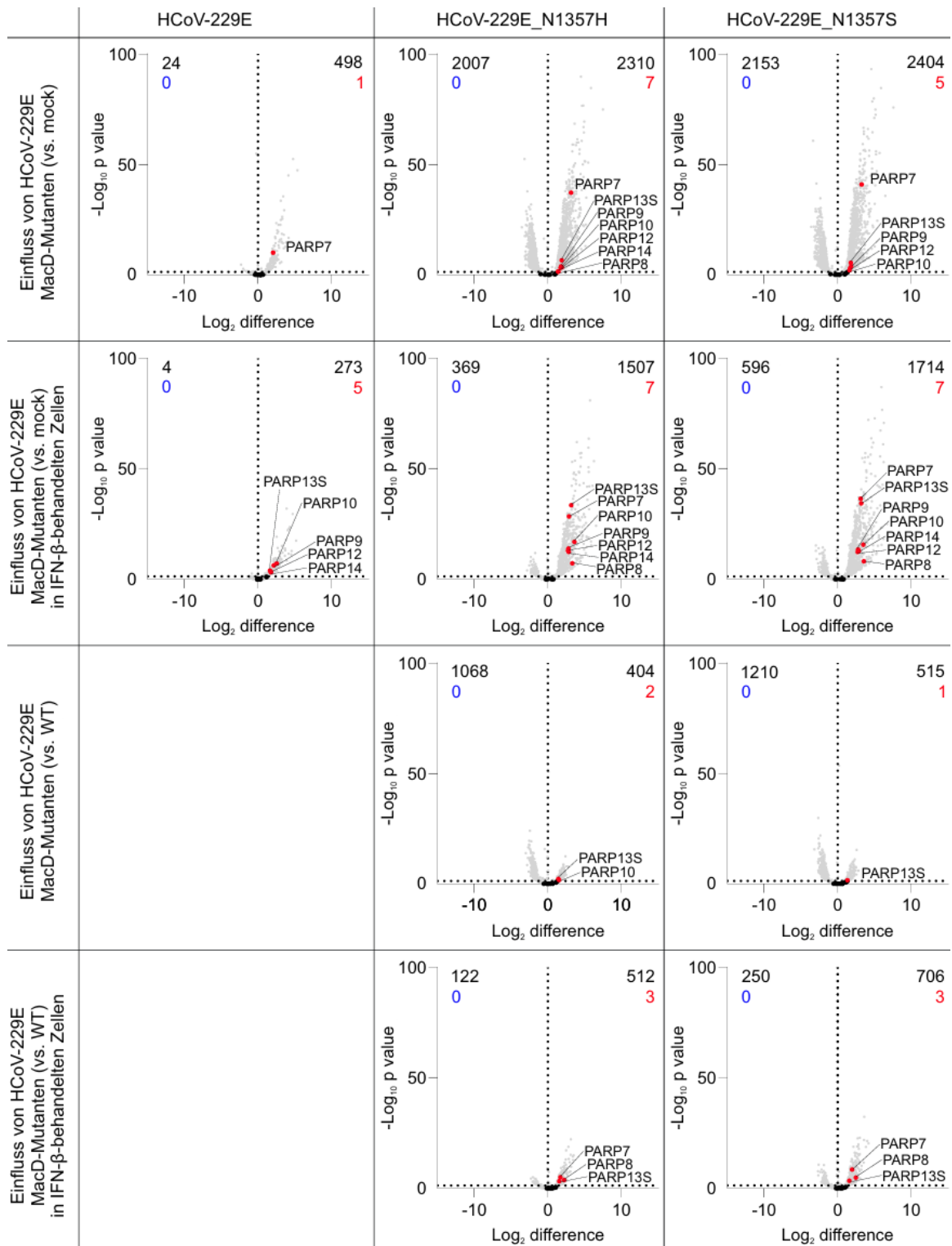


Abbildung 7-23: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

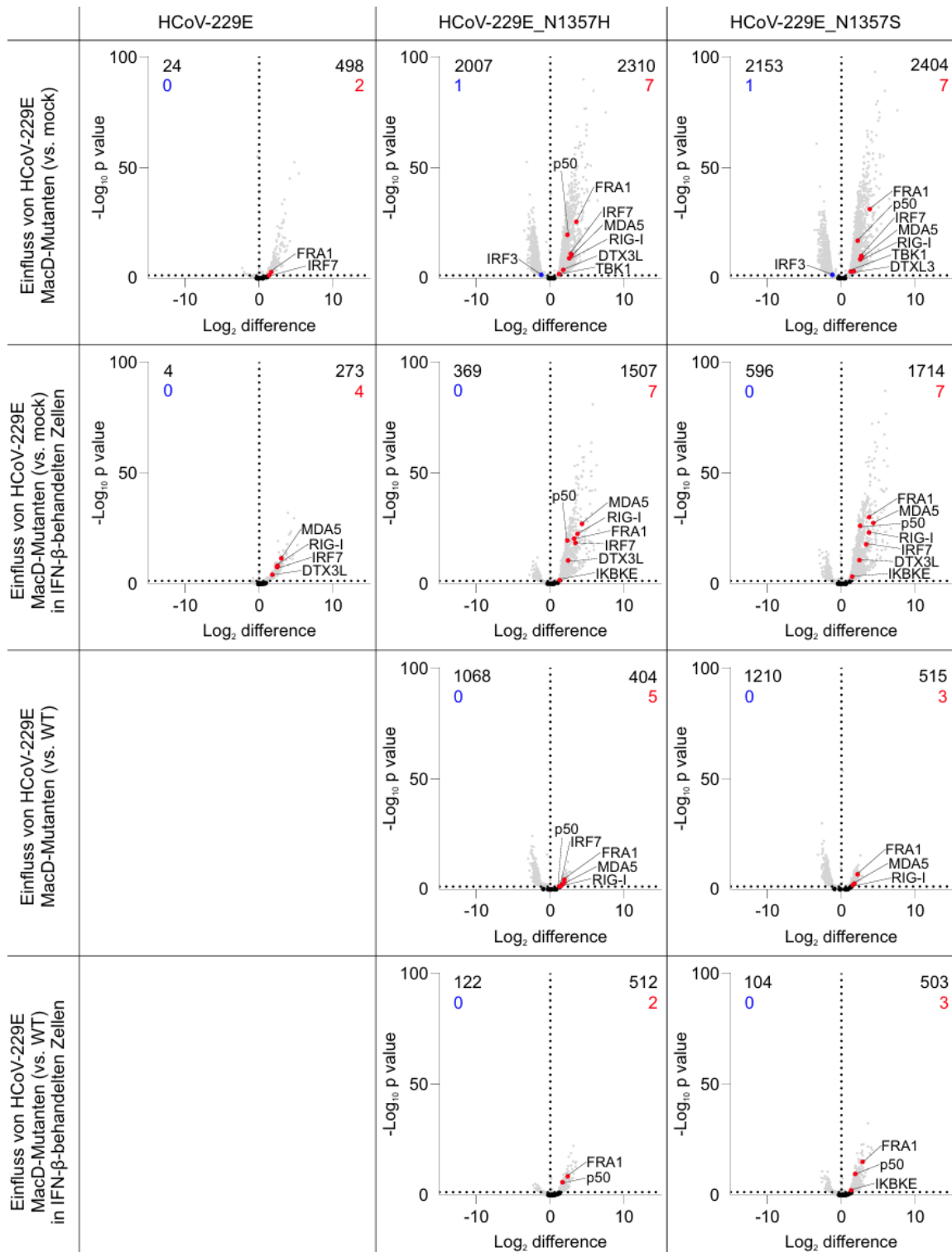


Abbildung 7-24: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer IFN-β-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

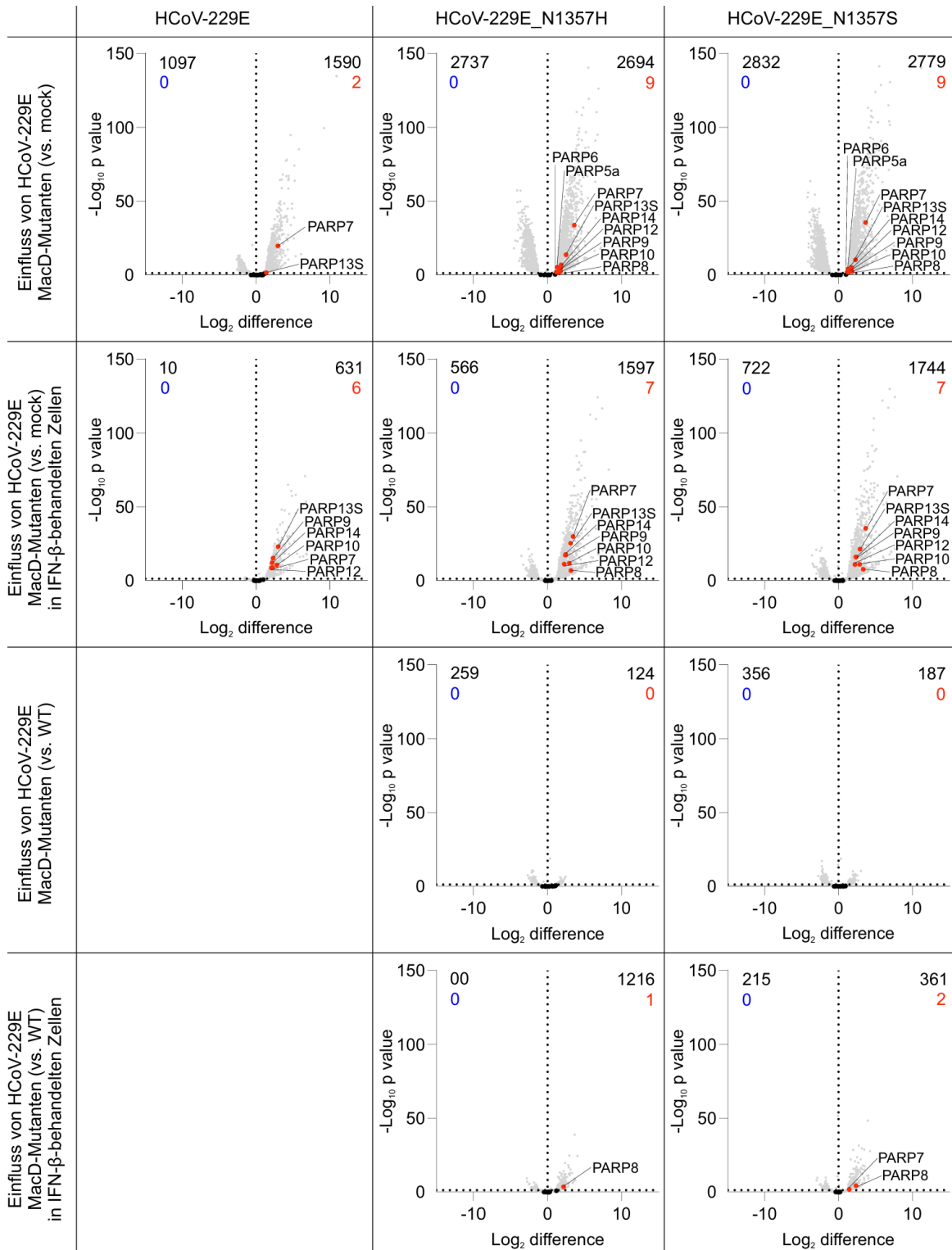


Abbildung 7-25: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

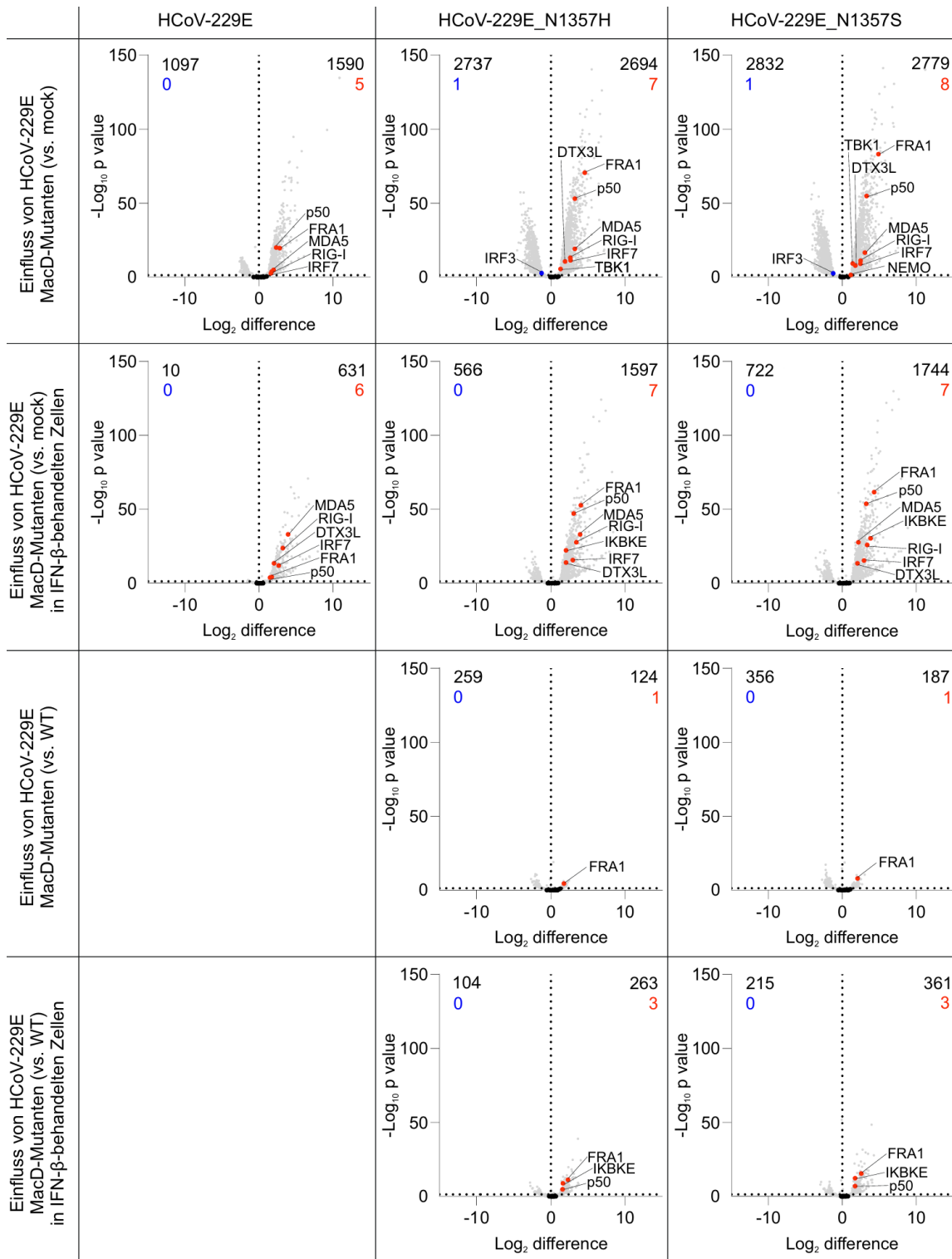


Abbildung 7-26: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Behandlung mit IFN-β erfolgte 16 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer IFN-β-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

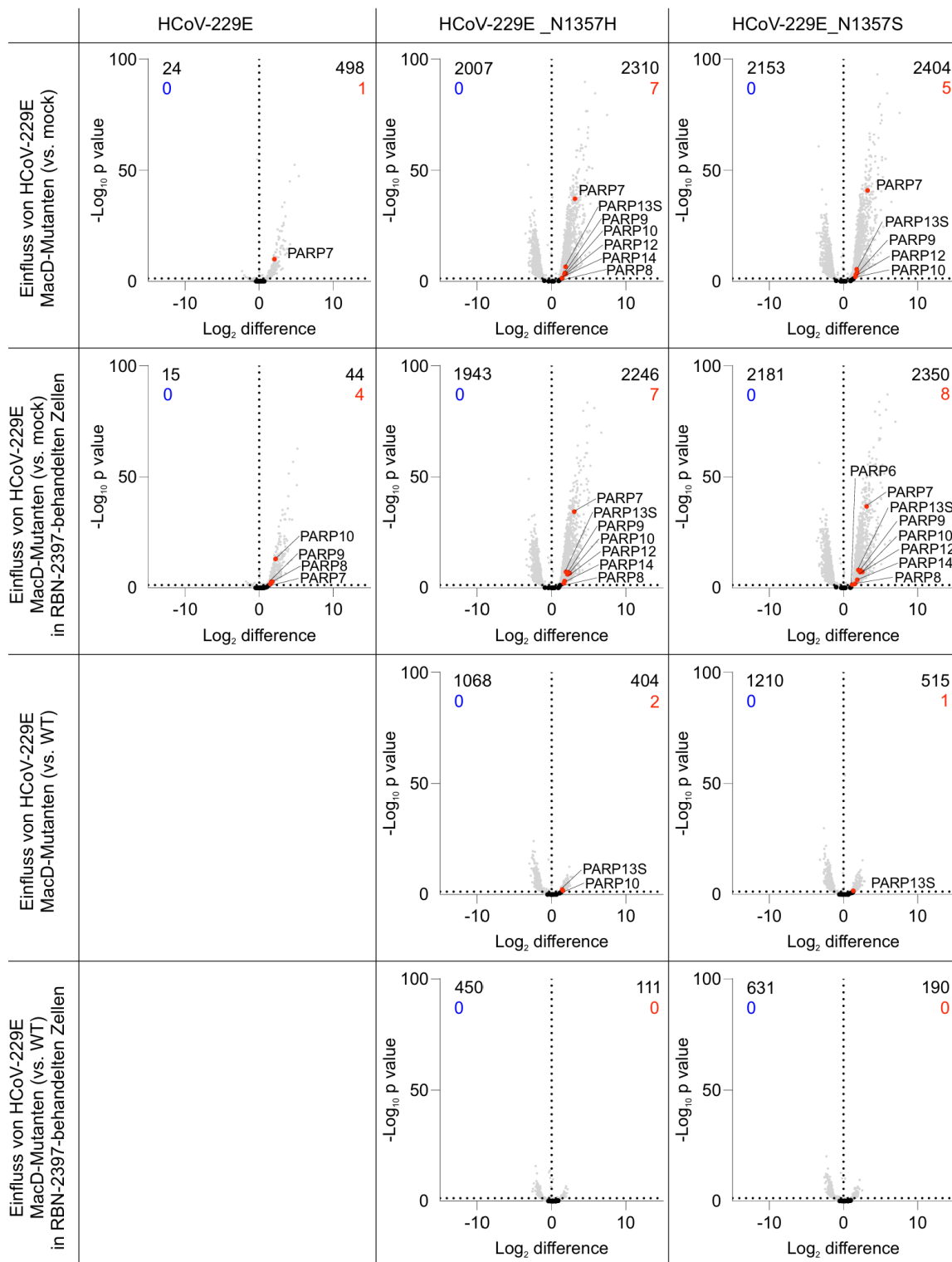


Abbildung 7-27: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

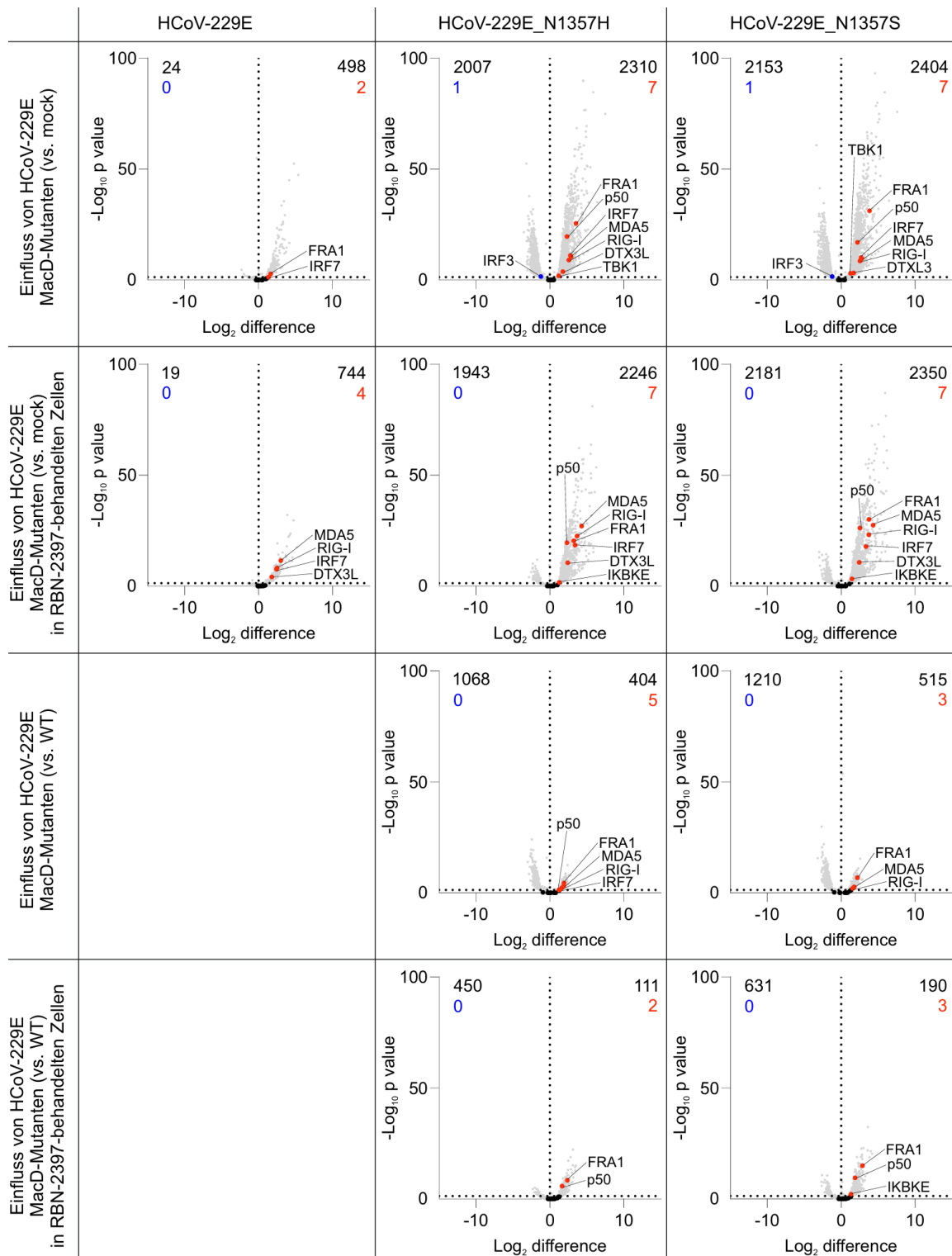


Abbildung 7-28: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13⁺/TMPRSS2⁺}-Zellen in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

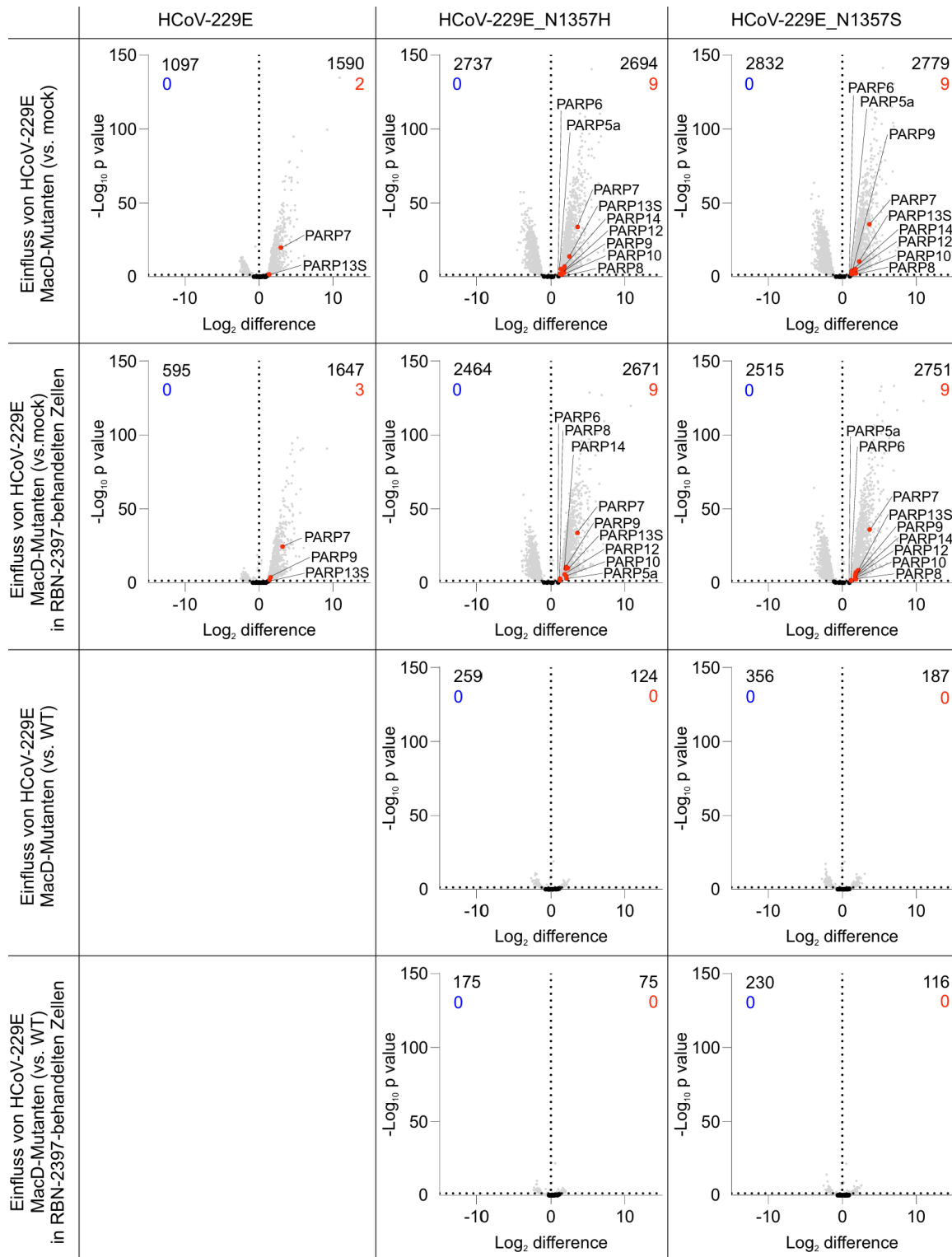


Abbildung 7-29: Genexpression von PARPs in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die regulierten PARPs. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Anhang

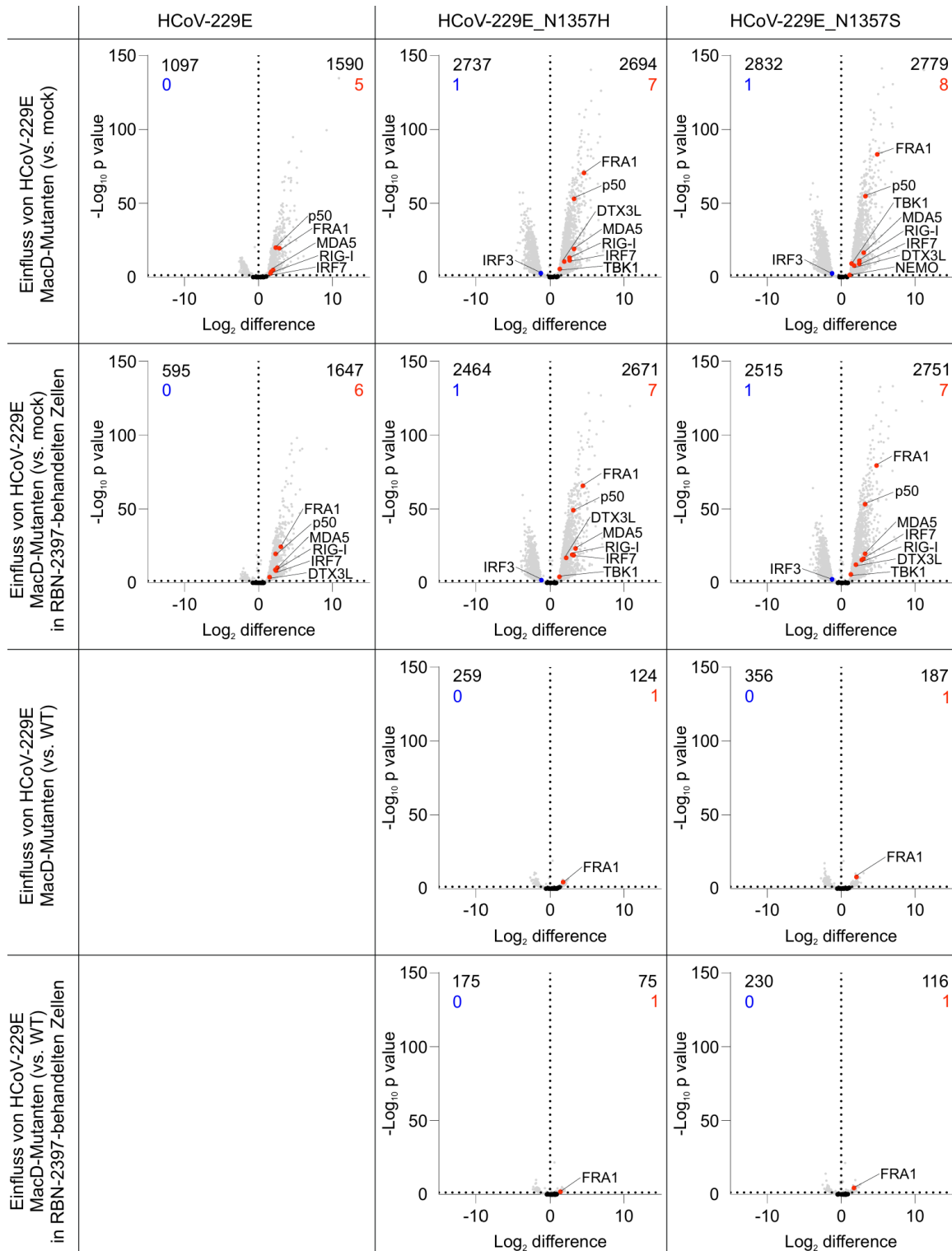


Abbildung 7-30: Genexpression mit PARP7 im Zusammenhang stehenden Genen in A549^{CD13+/TMPRSS2+}-Zellen mit PARP7-KD in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Behandlung und/oder Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S. Eine Vorbehandlung mit RBN-2397 erfolgte 24 h vor der Infektion mit einer MOI von 0,1 bei 33 °C. Die RNA wurde 48 hpi isoliert und analysiert. Dargestellt sind die mit PARP7-assoziierten Gene. In den Vulkanplots ist der Einfluss der Infektion mit HCoV-229E, HCoV-229E_N1357H und HCoV-229E_N1357S in Abhängigkeit von einer RBN-2397-Vorbehandlung im Vergleich mit nicht infizierten (mock) Zellen (oben) bzw. HCoV-229E (WT)-infizierten Zellen (unten) dargestellt.

Literaturverzeichnis

8. Literaturverzeichnis

Alalem M, Dabous E, Awad AM, Alalem N, Guirgis AA, El-Masry S & Khalil H. Influenza A virus regulates interferon signaling and its associated genes; MxA and STAT3 by cellular miR-141 to ensure viral replication. 2023. *Virology*. 20:12985-13023.

Alhammad YM, Parthasarathy S, Ghimire R, Kerr CM, O'Connor JJ, Pfannenstiel JJ, Chanda D, Miller CA, Baumlin N, Salathe M, Unckless RL, Zuñiga S, Enjuanes L, More S, Channappanavar R & Fehr AR. SARS-CoV-2 Mac1 is required for IFN antagonism and efficient virus replication in cell culture and in mice. 2023. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120:535927.

Alhammad YMO & Fehr AR. The viral macrodomain counters host antiviral ADP-ribosylation. 2020. *Viruses*. 12:384.

Alspach E, Lussier DM & Schreiber RD. Interferon γ and its important roles in promoting and inhibiting spontaneous and therapeutic cancer immunity. 2019. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 11:a028480.

Alvarez-Gonzalez R & Althaus FR. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents. 1989. *Mutat Res*. 218:67-74.

Amicone M, Borges V, Alves MJ, Isidro J, Zé-Zé L, Duarte S, Vieira L, Guiomar R, Gomes JP & Gordo I. Mutation rate of SARS-CoV-2 and emergence of mutators during experimental evolution. 2022. *Evol Med Public Health*. 10:142-155.

Andreu S, Ripa I, López-Guerrero JA & Bello-Morales R. Human coronavirus 229E uses clathrin-mediated endocytosis as a route of entry in huh-7 cells. 2024. *Biomolecules*. 14:1232.

Arai Y, Yamanaka I, Okamoto T, Isobe A, Nakai N, Kamimura N, Suzuki T, Daidoji T, Ono T, Nakaya T, Matsumoto K, Okuzaki D & Watanabe Y. Stimulation of interferon- β responses by aberrant SARS-CoV-2 small viral RNAs acting as retinoic acid-inducible gene-I agonists. 2023. *iScience*. 26:105742.

Atasheva S, Frolova E I & Frolov I. Interferon-stimulated poly(ADP-Ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. 2014. *J Virol*. 88:2116-2130.

Atri C, Guerfali FZ & Laouini D. Role of human macrophage polarization in inflammation during infectious diseases. 2018. *Int J Mol Sci*. 19:1801.

Au WC, Moore PA, Lowther W, Juang YT & Pitha PM. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. 1995. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:11657-11661.

Literaturverzeichnis

Berton G, Sorio C, Laudanna C, Menegazzi M, Carcereri De Prati A & Suzuki H. Activation of human monocyte-derived macrophages by interferon gamma is accompanied by increase of poly(ADP-ribose) polymerase activity. 1991. *Biochim Biophys Acta*. 1091:101-109.

Bertram S, Dijkman R, Habjan M, Heurich A, Gierer S, Glowacka I, Welsch K, Winkler M, Schneider H, Hofmann-Winkler H, Thiel V & Pöhlmann S. TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. 2013. *J Virol*. 87:6150-6160.

Biaesch K, Knapp S & Korn P. IFN-induced PARPs-sensors of foreign nucleic acids? 2023. *Pathogens*. 12:457.

Brian DA & Baric RS. Coronavirus genome structure and replication. 2005. *Curr Top Microbiol Immunol*. 287:1-30.

Brownell J, Wagoner J, Lovelace ES, Thirstrup D, Mohar I, Smith W, Giugliano S, Li K, Crispe IN, Rosen HR & Polyak SJ. Independent, parallel pathways to CXCL10 induction in HCV-infected hepatocytes. 2013. *J Hepatol*. 59:701-708.

Busa VF, Ando Y, Aigner S, Yee BA, Yeo GW & Leung AKL. Transcriptome regulation by PARP13 in basal and antiviral states in human cells. 2024. *iScience*. 27:109251.

Cai B, Wu J, Yu X, Su XZ & Wang RF. FOSL1 inhibits type I interferon responses to malaria and viral infections by blocking TBK1 and TRAF3/TRIF interactions. 2017. *mBio*. 8:e02161-02116.

Cavanagh D. Nidovirales: A new order comprising coronaviridae and arteriviridae. 1997. *Arch Virol*. 142:629-633.

Challa S, Stokes MS & Kraus WL. MARTs and MARYlation in the cytosol: Biological functions, mechanisms of action, and therapeutic potential. 2021. *Cells*. 10:313.

Chambon P, Weill JD & Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme. 1963. *Biochem Biophys Res Commun*. 11:39-43.

Chen X, Saccon E, Appelberg KS, Mikaeloff F, Rodriguez JE, Vinhas BS, Frisan T, Végvári Á, Mirazimi A, Neogi U & Gupta S. Type-I interferon signatures in SARS-CoV-2 infected huh7 cells. 2021. *Cell Death Discov*. 7:114.

Cheng KW, Li S, Wang F, Ruiz-Lopez NM, Huerbi N & Chou TF. Impacts of p97 on proteome changes in human cells during coronaviral replication. 2021. *Cells*. 10:2953.

Cheng N, Liu M, Li W, Sun B, Liu D, Wang G, Shi J & Li L. Protein post-translational modification in SARS-CoV-2 and host interaction. 2022. *Front Immunol*. 13:1068449.

Literaturverzeichnis

Clément JF, Bibeau-Poirier A, Gravel SP, Grandvaux N, Bonneil E, Thibault P, Meloche S & Servant MJ. Phosphorylation of IRF-3 on Ser 339 generates a hyperactive form of IRF-3 through regulation of dimerization and CBP association. 2008. *J Virol.* 82:3984-3996.

Cytion. 2025. MRC-5-Zelllinie: Fötale Lungenfibroblasten des Menschen in der Virusforschung. <https://www.cytion.com/de/Wissenszentrum/Einblicke-in-Zelllinien/MRC-5-Zelllinie-Foetale-menschliche-Lungenfibroblasten-in-der-Virusforschung/> (letzter Aufruf: 09.09.2025).

Dalman MR, Deeter A, Nimishakavi G & Duan ZH. Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. 2012. *BMC Bioinformatics.* 13 Suppl 2:S11.

Dalskov L, Gad HH & Hartmann R. Viral recognition and the antiviral interferon response. 2023. *Embo j.* 42:e112907.

Davis HE, Morgan JR & Yarmush ML. Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. 2002. *Biophys Chem.* 97:159-172.

Der SD, Zhou A, Williams BR & Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. 1998. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:15623-15628.

Desforges M, Miletti TC, Gagnon M & Talbot PJ. Activation of human monocytes after infection by human coronavirus 229E. 2007. *Virus Res.* 130:228-240.

Devarkar SC, Vetick M, Balaji S, Lomakin IB, Yang L, Jin D, Gilbert WV, Chen S & Xiong Y. Structural basis for translation inhibition by MERS-CoV nsp1 reveals a conserved mechanism for betacoronaviruses. 2023. *Cell Rep.* 42:113156.

Diamond B, Volpe BT, VanPatten S & Al Abed Y. SARS-CoV-2 and interferon blockade. 2020. *Mol Med.* 26:103.

Ding Y, Bei C, Xue Q, Niu L, Tong J, Chen Y, Takiff HE, Gao Q & Yan B. Transcriptomic analysis of mycobacterial infected macrophages reveals a high moi specific type I IFN signaling. 2023. *Infect Immun.* 91:e0015523.

Doceul V, Chauveau E, Lara E, Bréard E, Sailleau C, Zientara S & Vitour D. Dual modulation of type I interferon response by bluetongue virus. 2014. *J Virol.* 88:10792-10802.

Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RAM, Berger AM, Burgière A, Cinatl J, Eickmann M, Escriou N, Grywna K, Kramme S, Manuguerra JC, Müller S, Rickerts V, Stürmer M, Vieth S, Klenk HD, Osterhaus ADME, Schmitz H & Doerr HW. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. 2003. *NEJM.* 348(20):1967-76.

Literaturverzeichnis

Duncan JKS, Xu D, Licursi M, Joyce MA, Saffran HA, Liu K, Gohda J, Tyrrell DL, Kawaguchi Y & Hirasawa K. Interferon regulatory factor 3 mediates effective antiviral responses to human coronavirus 229E and OC43 infection. 2023. *Front Immunol.* 14:930086.

Egloff MP, Malet H, Putics A, Heinonen M, Dutartre H, Frangeul A, Gruez A, Campanacci V, Cambillau C, Ziebuhr J, Ahola T & Canard B. Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. 2006. *J Virol.* 80:8493-8502.

Eichner G. (2020). An introduction to statistics with R as part of the "Refresher/Crash Course on Biostatistics (with R)".

Eriksson KK, Cervantes-Barragán L, Ludewig B & Thiel V. Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1"-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. 2008. *J Virol.* 82:12325-12334.

Escors D, Ortego J, Laude H & Enjuanes L. The membrane M protein carboxy terminus binds to transmissible gastroenteritis coronavirus core and contributes to core stability. 2001. *J Virol.* 75:1312-1324.

Fallah Vastani Z, Ahmadi A, Abounoori M, Rouhi Ardeshiri M, Masoumi E, Ahmadi I, Davodian A, Kaffashian M, Kenarkoochi A, Falahi S, Mami S & Mami S. Interleukin-29 profiles in COVID-19 patients: Survival is associated with IL-29 levels. 2022. *Health Sci Rep.* 5:e544.

Fauquet, C. M, Mayo, M. A, Maniloff, J, Desselberger, U, Ball, L. A. Virus taxonomy, eighth report of the international committee on taxonomy of viruses. 2005. Elsevier, Academic Press.

Fehr, A. R, Channappanavar, R, Jankevicius, G, Fett, C, Zhao, J, Athmer, J, Meyerholz, D. K, Ahel, I. & Perlman, S. The conserved coronavirus macrodomain promotes virulence and suppresses the innate immune response during severe acute respiratory syndrome coronavirus infection. 2016. *mBio.* 7:e01721-01716.

Fehr AR, Jankevicius G, Ahel I & Perlman S. Viral macrodomains: Unique mediators of viral replication and pathogenesis. 2018. *Trends Microbiol.* 26:598-610.

Felgenhauer U, Schoen A, Gad HH, Hartmann R, Schaubmar AR, Failing K, Drosten C & Weber F. Inhibition of SARS-CoV-2 by type I and type III interferons. 2020. *J Biol Chem.* 295:13958-13964.

Finkel Y, Mizrahi O, Nachshon A, Weingarten-Gabbay S, Morgenstern D, Yahalom-Ronen Y, Tamir H, Achdout H, Stein D, Israeli O, Beth-Din A, Melamed S, Weiss S, Israely T, Paran N, Schwartz M & Stern-Ginossar N. The coding capacity of SARS-CoV-2. 2021. *Nature.* 589:125-130.

Forrester MA, Wassall HJ, Hall LS, Cao H, Wilson HM, Barker RN & Vickers MA. Similarities and differences in surface receptor expression by THP-1 monocytes and differentiated macrophages polarized using seven different conditioning regimens. 2018. *Cell Immunol.* 332:58-76.

Literaturverzeichnis

Funk CJ, Wang J, Ito Y, Travanty EA, Voelker DR, Holmes KV & Mason RJ. Infection of human alveolar macrophages by human coronavirus strain 229E. 2012. *J Gen Virol.* 93:494-503.

Gaajetaan GR, Geelen TH, Vernooy JH, Dentener MA, Reynaert NL, Rohde GG, Beuken EV, Grauls GE, Bruggeman CA & Stassen FR. Interferon- β induces a long-lasting antiviral state in human respiratory epithelial cells. 2013. *J Infect.* 66:163-169.

Geller C, Varbanov M & Duval RE. Human coronaviruses: insights into environmental resistance and its influence on the development of new antiseptic strategies. 2012. *Viruses.* 4:3044-3068.

GeneCards. 2025. TIPARP Gene – TCDD inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TIPARP> (letzter Aufruf: 09.09.2025).

Genin M, Clement F, Fattaccioli A, Raes M & Michiels C. M1 and M2 macrophages derived from THP-1 cells differentially modulate the response of cancer cells to etoposide. 2015. *BMC Cancer.* 15:577.

Gibson BA & Kraus WL. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. 2012. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13:411-424.

Git A, Dvinge H, Salmon-Divon M, Osborne M, Kutter C, Hadfield J, Bertone P & Caldas C. Systematic comparison of microarray profiling, real-time PCR, and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. 2010. *Rna.* 16:991-1006.

Gobillot TA, Humes D, Sharma A, Kikawa C & Overbaugh J. The robust restriction of Zika virus by type-I interferon in A549 cells varies by viral lineage and is not determined by IFITM3. 2020. *Viruses.* 12:503.

Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, Haagmans BL, Lauber C, Leontovich AM, Neuman BW, Penzar D, Perlman S, Poon LLM, Samborskiy DV, Sidorov IA, Sola I & Ziebuhr J. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. 2020. *Nature.* 5(4):536-544.

Gozgit JM, Vasbinder MM, Abo RP, Kunii K, Kuplast-Barr KG, Gui B, Lu AZ, Molina JR, Minissale E, Swinger KK, Wigle TJ, Blackwell DJ, Majer CR, Ren Y, Niepel M, Varsamis ZA, Nayak SP, Bamberg E, Mo JR, Church WD, Mady ASA, Song J, Utley L, Rao PE, Mitchison TJ, Kuntz KW, Richon VM & Keilhack H. PARP7 negatively regulates the type I interferon response in cancer cells and its inhibition triggers antitumor immunity. 2021. *Cancer Cell.* 39:1214-1226.

Grunewald ME, Chen Y, Kuny C, Maejima T, Lease R, Ferraris D, Aikawa M, Sullivan CS, Perlman S & Fehr AR. The coronavirus macrodomain is required to prevent PARP-mediated inhibition of virus replication and enhancement of IFN expression. 2019. *PLoS Pathog.* 15:e1007756.

Literaturverzeichnis

Grunewald ME, Fehr AR, Athmer J & Perlman S. The coronavirus nucleocapsid protein is ADP-ribosylated. 2018. *Virology*. 517:62-68.

Grunewald ME, Shaban MG, Mackin SR, Fehr AR & Perlman S. Murine coronavirus infection activates the aryl hydrocarbon receptor in an indoleamine 2,3-dioxygenase-independent manner, contributing to cytokine modulation and proviral TCDD-inducible-PARP expression. 2020. *J Virol*. 94:e01743-01719.

Gu H, Yan W, Wang Y, Xu W, Huang L, Yang J, Zhai B, Wang H, Su Y, Zhu Q, Liu B, Hao H, Zou Y & Xu Y. Discovery of the potent and highly selective PARP7 inhibitor as a novel immunotherapeutic agent for tumors. 2023. *J Med Chem*. 66:473-490.

Hamming OJ, Terczyńska-Dyla E, Vieyres G, Dijkman R, Jørgensen SE, Akhtar H, Siupka P, Pietschmann T, Thiel V & Hartmann R. Interferon lambda 4 signals via the IFN λ receptor to regulate antiviral activity against HCV and coronaviruses. 2013. *Embo j*. 32:3055-3065.

Hartmann H. (2023). Virale Makrodomänen: biochemische Charakterisierung und Rolle in der Regulation zellulärer ADP-Ribosyltransferasen. Gießen.

Hassler M, Jankevicius G & Ladurner AG. PARG: a macrodomain in disguise. 2011. *Structure*. 19:1351-1353.

Hayakawa S, Shiratori S, Yamato H, Kameyama T, Kitatsuji C, Kashigi F, Goto S, Kameoka S, Fujikura D, Yamada T, Mizutani T, Kazumata M, Sato M, Tanaka J, Asaka M, Ohba Y, Miyazaki T, Imamura M & Takaoka A. ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. 2011. *Nat Immunol*. 12:37-44.

Heer CD, Sanderson DJ, Voth LS, Alhammad YMO, Schmidt MS, Trammell SAJ, Perlman S, Cohen MS, Fehr AR & Brenner C. Coronavirus infection and PARP expression dysregulate the NAD metabolome: An actionable component of innate immunity. 2020. *J Biol Chem*. 295:17986-17996.

Hemarajata P. SARS-CoV-2 sequencing data: The devil is in the genomic detail. 2020. *American society for microbiology*. <https://asm.org/articles/2020/october/sars-cov-2-sequencing-data-the-devil-is-in-the-gen> (letzter Aufruf: 09.09.2025).

Hermant P & Michiels T. Interferon- λ in the context of viral infections: Production, response and therapeutic implications. 2014. *J Innate Immun*. 6:563-574.

Hiebinger F, Kudulyte A, Chi H, Burbano De Lara S, Ilic D, Helm B, Welsch H, Dao Thi VL, Klingmüller U & Binder M. Tumour cells can escape antiproliferative pressure by interferon- β through immunoediting of interferon receptor expression. 2023. *Cancer Cell Int*. 23:315.

Hottiger MO, Hassa PO, Lüscher B, Schüler H & Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. 2010. *Trends Biochem Sci*. 35:208-219.

Literaturverzeichnis

Hunyadi J, Simon M, Jr, Kenderessy AS & Dobozy A. Expression of monocyte/macrophage markers (CD13, CD14, CD68) on human keratinocytes in healthy and diseased skin. 1993. *J Dermatol.* 20:341-345.

International Committee on Taxonomy of Viruses. Taxonomy browser. <https://ictv.global/taxonomy> (letzter Aufruf: 09.09.2025).

Irigoyen N, Firth AE, Jones JD, Chung BY, Siddell SG & Brierley I. High-resolution analysis of coronavirus gene expression by RNA sequencing and ribosome profiling. 2016. *PLoS Pathog.* 12:e1005473.

Iwata H, Goettsch C, Sharma A, Ricchiuto P, Goh WW, Halu A, Yamada I, Yoshida H, Hara T, Wei M, Inoue N, Fukuda D, Mojcher A, Mattson PC, Barabási AL, Boothby M, Aikawa E, Singh SA & Aikawa M. PARP9 and PARP14 cross-regulate macrophage activation via STAT1 ADP-ribosylation. 2016. *Nat Commun.* 7:12849.

Jeltema D, Knox K, Dobbs N, Tang Z, Xing C, Araskiewicz A, Yang K, Siordia IR, Matthews J, Cohen M & Yan N. PARP7 inhibits type I interferon signaling to prevent autoimmunity and lung disease. 2025. *J Exp Med.* 222:e20241184.

Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, Sanjana NE & Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. 2017. *Nat Protoc.* 12:828-863.

Kamata T, Yang CS, Melhuish TA, Frierson HF, Jr, Wotton D & Paschal BM. Post-transcriptional regulation of PARP7 protein stability is controlled by androgen signaling. 2021. *Cells.* 10:363.

Kannen V, Rasmussen M, Das S, Giuliana P, Izzati FN, Choksi H, Erlingsson LAM, Olafsen NE, Åhring SS, Cappello P, Teino I, Maimets T, Jaudzems K, Gulbinas A, Dambrauskas Z, Edgar LJ, Grant DM & Matthews J. Loss of PARP7 increases type I interferon signalling and reduces pancreatic tumour growth by enhancing immune cell infiltration. 2024. *Front Immunol.* 15:1513595.

Kar P, Chatrin C, Đukić N, Suyari O, Schuller M, Zhu K, Prokhorova E, Bigot N, Baretić D, Ahel J, Elsborg JD, Nielsen ML, Clausen T, Huet S, Niepel M, Sanyal S, Ahel D, Smith R & Ahel I. PARP14 and PARP9/DTX3L regulate interferon-induced ADP-ribosylation. 2024. *Embo j.* 43:2929-2953.

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

Kerr CM, Parthasarathy S, Schwarting N, O'Connor JJ, Pfannenstiel JJ, Giri E, More S, Orozco RC & Fehr AR. PARP12 is required to repress the replication of a Mac1 mutant coronavirus in a cell- and tissue-specific manner. 2023. *J Virol.* 97:e0088523.

Literaturverzeichnis

Kikkert M. Innate immune evasion by human respiratory RNA viruses. 2020. *J Innate Immun.* 12:4-20.

Kozaki T, Komano J, Kanbayashi D, Takahama M, Misawa T, Satoh T, Takeuchi O, Kawai T, Shimizu S, Matsuura Y, Akira S & Saitoh T. Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response. 2017. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:2681-2686.

Kuri T, Eriksson KK, Putics A, Züst R, Snijder EJ, Davidson AD, Siddell SG, Thiel V, Ziebuhr J & Weber F. The ADP-ribose-1"-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. 2011. *J Gen Virol.* 92:1899-1905.

Kuri T & Weber F. Interferon interplay helps tissue cells to cope with SARS-coronavirus infection. 2010. *Virulence.* 1:273-275.

Kuri T, Zhang X, Habjan M, Martínez-Sobrido L, García-Sastre A, Yuan Z & Weber F. Interferon priming enables cells to partially overturn the SARS coronavirus-induced block in innate immune activation. 2009. *J Gen Virol.* 90:2686-2694.

Lauber C, Zhang X, Vaas J, Klingler F, Mutz P, Dubin A, Pietschmann T, Roth O, Neuman BW, Gorbalenya AE, Bartenschlager R & Seitz S. Deep mining of the sequence read archive reveals major genetic innovations in coronaviruses and other nidoviruses of aquatic vertebrates. 2024. *PLoS Pathog.* 20(4):e1012163.

Lee HJ, Shieh CK, Gorbalenya AE, Koonin EV, La Monica N, Tuler J, Bagdzhadzhyan A & Lai MM. The complete sequence (22 kilobases) of murine coronavirus gene 1 encoding the putative proteases and RNA polymerase. 1991. *Virology.* 180:567-582.

Lenardo MJ, Fan CM, Maniatis T & Baltimore D. The involvement of NF-kappa B in beta-interferon gene regulation reveals its role as widely inducible mediator of signal transduction. 1989. *Cell.* 57:287-294.

Lendeckel U, Karimi F, Al Abdulla R & Wolke C. The role of the ectopeptidase APN/CD13 in cancer. 2023. *Biomedicines.* 11:724.

Leung AKL, McPherson RL & Griffin DE. Macrodomein ADP-ribosylhydrolase and the pathogenesis of infectious diseases. 2018. *PLoS Pathog.* 14:e1006864.

Li C, Debing Y, Jankevicius G, Neyts J, Ahel I, Coutard B & Canard B. Viral macro domains reverse protein ADP-ribosylation. 2016. *J Virol.* 90:8478-8486.

Li P, Lei Y, Qi J, Liu W & Yao K. Functional roles of ADP-ribosylation writers, readers and erasers. 2022. *Front Cell Dev Biol.* 10:941356.

Literaturverzeichnis

Li W, Shi Z, Yu M, Ren W, Smith C, Epstein JH, Wang H, Crameri G, Hu Z, Zhang H, Zhang J, McEachern J, Field H, Daszak P, Eaton BT, Zhang S & Wang LF. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. 2005. *Science*. 310:676-679.

Li X & Shong Y. Targeting SARS-CoV-2 non-structural protein 3: function, structure, inhibition, and perspective in drug discovery. 2024. *Drug Discov Today*. 29(1):103832.

Licona-Limón I, Garay-Canales CA, Muñoz-Paletta O & Ortega E. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. 2015. *J Leukoc Biol*. 98:85-98.

Lie LK, Synowiec A, Mazur J, Rabalski L & Pyrc K. An engineered A549 cell line expressing CD13 and TMPRSS2 is permissive to clinical isolate of human coronavirus 229E. 2023. *Virology*. 588:109889.

Mackay IM & Arden KE. MERS coronavirus: Diagnostics, epidemiology and transmission. 2015. *Virol J*. 12:222.

MacPherson L, Tamblyn L, Rajendra S, Bralha F, McPherson JP & Matthews J. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin poly(ADP-ribose) polymerase (TiPARP, ARTD14) is a mono-ADP-ribosyltransferase and repressor of aryl hydrocarbon receptor transactivation. 2013. *Nucleic Acids Res*. 41:1604-1621.

Magalhães VG, Lukassen S, Drechsler M, Loske J, Burkart SS, Wüst S, Jacobsen EM, Röhmel J, Mall MA, Debatin KM, Eils R, Autenrieth S, Janda A, Lehmann I & Binder M. Immune-epithelial cell cross-talk enhances antiviral responsiveness to SARS-CoV-2 in children. 2023. *EMBO Rep*. 24:e57912.

Manetsch P, Böhi F, Nowak K, Leslie Pedrioli DM & Hottiger MO. PARP7-mediated ADP-ribosylation of FRA1 promotes cancer cell growth by repressing IRF1- and IRF3-dependent apoptosis. 2023. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 120:e2309047120.

Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo M, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Gray M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Kraiden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C & Roper RL. The genome sequence of the SARS-associated coronavirus. 2003. *Science*. 300:1399-1404.

Martiáñez-Vendrell X, van Kasteren PB, Myeni SK & Kikkert M. HCoV-229E Mpro suppresses RLR-mediated innate immune signalling through cleavage of NEMO and through other mechanisms. 2025. *Int J Mol Sci*. 26:1197.

Literaturverzeichnis

Mary A, Hénaut L, Macq PY, Badoux L, Cappe A, Porée T, Eckes M, Dupont H & Brazier M. Rationale for COVID-19 treatment by nebulized interferon- β -1b-literature review and personal preliminary experience. 2020. *Front Pharmacol.* 11:592543.

Masaoka A, Gassman NR, Kedar PS, Prasad R, Hou EW, Horton JK, Bustin M & Wilson SH. HMGN1 protein regulates poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) self-PARylation in mouse fibroblasts. 2012. *J Biol Chem.* 287:27648-27658.

Mátrai J, Chuah MK & VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. 2010. *Mol Ther.* 18:477-490.

Meager A, Visvalingam K, Dilger P, Bryan D & Wadhwa M. Biological activity of interleukins-28 and -29: Comparison with type I interferons. 2005. *Cytokine.* 31:109-118.

Melén K, Keskinen P, Lehtonen A & Julkunen I. Interferon-induced gene expression and signaling in human hepatoma cell lines. 2000. *J Hepatol.* 33:764-772.

Mendoza-Coronel E & Ortega E. Macrophage polarization modulates Fc γ R- and CD13-mediated phagocytosis and reactive oxygen species production, independently of receptor membrane expression. 2017. *Front Immunol.* 8:303.

Merad M & Martin JC. Pathological inflammation in patients with COVID-19: A key role for monocytes and macrophages. 2020. *Nat Rev Immunol.* 20:355-362.

Min YQ, Huang M, Sun X, Deng F, Wang H & Ning YJ. Immune evasion of SARS-CoV-2 from interferon antiviral system. 2021. *Comput Struct Biotechnol J.* 19:4217-4225.

Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J & Boothman DA. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. 2014. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 24:15-28.

Munir A, Banerjee A & Shuman S. NAD⁺-dependent synthesis of a 5'-phospho-ADP-ribosylated RNA/DNA cap by RNA 2'-phosphotransferase Tpt1. 2018. *Nucleic Acids Res.* 46:9617-9624.

Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdts S, Gordon S, Hamilton JA, Ivashkiv LB, Lawrence T, Locati M, Mantovani A, Martinez FO, Mege JL, Mosser DM, Natoli G, Saeij JP, Schultze JL, Shirey KA, Sica A, Suttles J, Udalova I, van Ginderachter JA, Vogel SN & Wynn TA. Macrophage activation and polarization: Nomenclature and experimental guidelines. 2014. *Immunity.* 41:14-20.

Myeni SK, Bredenbeek, PJ, Knaap RCM, Dalebout TJ, Morales ST, Sidorov IA, Linger ME, Oreshkova N, van Zanen-Gerhardt S, Zander SAL, Enjuanes L, Sola I, Snijder EJ, Kikkert M. Engineering potent live attenuated coronavirus vaccines by targeted inactivation of the immune evasive viral deubiquitinase. 2023. *Nat Commun.* 14(1):1141.

Literaturverzeichnis

Nakagawa K, Lokugamage KG & Makino S. Viral and cellular mRNA translation in coronavirus-infected cells. 2016. *Adv Virus Res.* 96:165-192.

Nakagawa K & Makino S. Mechanisms of coronavirus nsp1-mediated control of host and viral gene expression. 2021. *Cells.* 10:300.

Naulin F, Guilbaud E & Galluzzi L. PARP7 and nucleic acid-driven oncosuppression. 2024. *Cell Mol Immunol.* 21:1177-1179.

Neuman BW, Smart A, Gilmer O, Smyth RP, Vaas J, Böker N, Samborskiy DV, Bartenschlager R, Seitz S, Gorbalenya AE, Caliskan N & Lauber C. Giant RNA genomes: roles of host, translation elongation, genome architecture, and proteome in nidoviruses. 2025. *Proc Natl Acad Sci USA.* 122(7):e2413675122.

Nomura R, Kiyota A, Suzuki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda T & Fujimoto T. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae. 2004. *J Virol.* 78:8701-8708.

Nowak K, Rosenthal F, Karlberg T, Bütepage M, Thorsell AG, Dreier B, Grossmann J, Sobek J, Imhof R, Lüscher B, Schüler H, Plückthun A, Leslie Pedrioli DM & Hottiger MO. Engineering Af1521 improves ADP-ribose binding and identification of ADP-ribosylated proteins. 2020. *Nat Commun.* 11:5199.

OhAinle M, Helms L, Vermeire J, Roesch F, Humes D, Basom R, Delrow JJ, Overbaugh J & Emerman M. A virus-packageable CRISPR screen identifies host factors mediating interferon inhibition of HIV. 2018. *Elife.* 7:e39823.

Palavalli Parsons LH, Challa S, Gibson BA, Nandu T, Stokes MS, Huang D, Lea JS & Kraus WL. Identification of PARP-7 substrates reveals a role for MARYlation in microtubule control in ovarian cancer cells. 2021. *Elife.* 10:e60481.

Palazzo L, Mikočević P, Mikoč A & Ahel I. ADP-ribosylation signalling and human disease. 2019. *Open Biol.* 9:190041.

Pehrson JR & Fuji RN. Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. 1998. *Nucleic Acids Res.* 26:2837-2842.

Peiris M & Perlman S. Unresolved questions in the zoonotic transmission of MERS. 2022. *Curr Opin Virol.* 52:258-264.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. 2001. *Nucleic Acids Res.* 29:2002-2007.

Pfannenstiel JJ, Duong MTH, Cluff D, Sherrill LM, Colquhoun I, Cadoux G, Thorne D, Pääkkönen J, Schemmel NF, O'Connor J, Saenjamsai P, Feng M, Parthasarathy S, Hageman MJ, Johnson DK,

Literaturverzeichnis

Roy A, Lehtiö L, Ferraris DV & Fehr AR. Identification of a series of pyrrolo-pyrimidine-based SARS-CoV-2 Mac1 inhibitors that repress coronavirus replication. 2025. *mBio*. 16:e0386524.

Pfeffer LM. The role of nuclear factor κ B in the interferon response. 2011. *J Interferon Cytokine Res*. 31:553-559.

Poppe M, Wittig S, Jurida L, Bartkuhn M, Wilhelm J, Müller H, Beuerlein K, Karl N, Bhujra S, Ziebuhr J, Schmitz ML & Kracht M. The NF- κ B-dependent and -independent transcriptome and chromatin landscapes of human coronavirus 229E-infected cells. 2017. *PLoS Pathog*. 13:e1006286.

Prokhorova E, Zobel F, Smith R, Zentout S, Gibbs-Seymour I, Schützenhofer K, Peters A, Gros Lambert J, Zorzini V, Agnew T, Brognard J, Nielsen ML, Ahel D, Huet S, Suskiewicz MJ & Ahel I. Serine-linked PARP1 auto-modification controls PARP inhibitor response. 2021. *Nat Commun*. 12:4055.

Pumeda SB. Comparison between next-generation sequencing and microarrays for miRNA expression in cancer samples. 2024. *Natl. Acad. Sci. Lett*. 47:587-593.

Putics A, Filipowicz W, Hall J, Gorbalenya AE & Ziebuhr J. ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. 2005. *J Virol*. 79:12721-12731.

Rack JG, Perina D & Ahel I. Macrod domains: Structure, function, evolution, and catalytic activities. 2016. *Annu Rev Biochem*. 85:431-454.

Rack JGM, Zorzini V, Zhu Z, Schuller M, Ahel D & Ahel I. Viral macro domains: a structural and evolutionary assessment of the pharmacological potential. 2020. *Open Biol*. 10:200237.

Rajah MM, Bernier A, Buchrieser J & Schwartz O. The mechanism and consequences of SARS-CoV-2 spike-mediated fusion and syncytia formation. 2022. *J Mol Biol*. 434:167280.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA & Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. 2013. *Nat Protoc*. 8:2281-2308.

Rasmussen M, Alvik K, Kannen V, Olafsen NE, Erlingsson LAM, Grimaldi G, Takaoka A, Grant DM & Matthews J. Loss of PARP7 increases type I interferon signaling in EO771 breast cancer cells and prevents mammary tumor growth by increasing antitumor immunity. 2023. *Cancers (Basel)*. 15:3689.

Reed LJ & Muench H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. 1938. *American Journal of Epidemiology*. 27:493-497.

Richter K, Papke RL, Stokes C, Roy DC, Espinosa ES, Wolf PMK, Hecker A, Liese J, Singh VK, Padberg W, Schlüter KD, Rohde M, McIntosh JM, Morley BJ, Horenstein NA, Grau V & Simard AR.

Literaturverzeichnis

Comparison of the anti-inflammatory properties of two nicotinic acetylcholine receptor ligands, phosphocholine and pCF3-diEPP. 2022. *Front Cell Neurosci.* 16:779081.

Robert X & Gouet P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. 2014. *Nucleic Acids Res.* 42:320-324.

Robitaille AC, Mariani MK, Fortin A & Grandvaux N. A high resolution method to monitor phosphorylation-dependent activation of IRF3. 2016. *J Vis Exp.* e53723.

Roesch F, OhAinle M & Emerman M. A CRISPR screen for factors regulating SAMHD1 degradation identifies IFITMs as potent inhibitors of lentiviral particle delivery. 2018. *Retrovirology.* 15:26.

Rosenthal F, Feijs KL, Frugier E, Bonalli M, Forst AH, Imhof R, Winkler HC, Fischer D, Caflisch A, Hassa PO, Lüscher B & Hottiger MO. Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. 2013. *Nat Struct Mol Biol.* 20:502-507.

Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Peñaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen-Rasmussen M, Fouchier R, Günther S, Osterhaus AD, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ & Bellini WJ. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 2003. *Science.* 300:1394-1399.

Saberi A, Gulyaeva AA, Brubacher JL, Newmark PA & Gorbalenya AE. A planarian nidovirus expands the limits of RNA genome size. 2018. *PLoS Pathog.* 14:e1007314.

Saikatendu KS, Joseph JS, Subramanian V, Clayton T, Griffith M, Moy K, Velasquez J, Neuman BW, Buchmeier MJ, Stevens RC & Kuhn P. Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1"-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. 2005. *Structure.* 13:1665-1675.

Sakuma T, Barry MA & Ikeda Y. Lentiviral vectors: Basic to translational. 2012. *Biochem J.* 443:603-618.

Sawicki SG & Sawicki DL. Coronaviruses use discontinuous extension for synthesis of subgenome-length negative strands. 1995. *Adv Exp Med Biol.* 1995:380:499-506.

Sawicki SG, Sawicki DL & Siddell SG. A contemporary view of coronavirus transcription. 2007. *J Virol.* 81(1):20-29.

Schubert K, Karousis ED, Jomaa A, Scaiola A, Echeverria B, Gurzeler LA, Leibundgut M, Thiel V, Mühlemann O & Ban N. SARS-CoV-2 Nsp1 binds the ribosomal mRNA channel to inhibit translation. 2020. *Nat Struct Mol Biol.* 27:959-966.

Literaturverzeichnis

Scott HM, Smith MH, Coleman AK, Apostalo SL, Wagner AR, Watson RO & Patrick KL. Serine arginine-rich splicing factor (SRSF7) cooperates with the histone methyltransferase KMT5a to promote the type I interferon response via transcriptional activation of IRF7. 2023. bioRxiv. 540055.

Seidman CE & Struhl K. Introduction of plasmid DNA into cells. 2001. *Curr Protoc Neurosci*. Appendix 1:Appendix 1L.

Servant MJ, ten Oever B, LePage C, Conti L, Gessani S, Julkunen I, Lin R & Hiscott J. Identification of distinct signaling pathways leading to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3. 2001. *J Biol Chem*. 276:355-363.

Shao H, Lan D, Duan Z, Liu Z, Min J, Zhang L, Huang J, Su J, Chen S & Xu A. Upregulation of mitochondrial gene expression in PBMC from convalescent SARS patients. 2006. *J Clin Immunol*. 26:546-554.

Spiegel M, Pichlmair A, Martínez-Sobrido L, Cros J, García-Sastre A, Haller O & Weber F. Inhibition of Beta interferon induction by severe acute respiratory syndrome coronavirus suggests a two-step model for activation of interferon regulatory factor 3. 2005. *J Virol*. 79:2079-2086.

Stoltz M & Klingström J. Alpha/beta interferon (IFN-alpha/beta)-independent induction of IFN-lambda1 (interleukin-29) in response to Hantaan virus infection. 2010. *J Virol*. 84:9140-9148.

Sturman LS, Holmes KV & Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid. 1980. *J Virol*. 33:449-462.

Sui L, Zhao Y, Wang W, Wu P, Wang Z, Yu Y, Hou Z, Tan G & Liu Q. SARS-CoV-2 Membrane Protein Inhibits Type I Interferon Production Through Ubiquitin-Mediated Degradation of TBK1. 2021. *Front Immunol*. 12:662989.

Sun J, Ye F, Wu A, Yang R, Pan M, Sheng J, Zhu W, Mao L, Wang M, Xia Z, Huang B, Tan W & Jiang T. Comparative transcriptome analysis reveals the intensive early stage responses of host cells to SARS-CoV-2 infection. 2020. *Front Microbiol*. 11:593857.

Tanaka T, Kamitani W, DeDiego ML, Enjuanes L & Matsuura Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus nsp1 facilitates efficient propagation in cells through a specific translational shutoff of host mRNA. 2012. *J Virol*. 86:11128-11137.

Tang G, Liu Z & Chen D. Human coronaviruses: Origin, host and receptor. 2022. *J Clin Virol*. 155:105246.

Telenti A, Arvin A, Corey L, Corti D, Diamond MS, García-Sastre A, Garry RF, Holmes EC, Pang PS & Virgin HW. After the pandemic: perspectives on the future trajectory of COVID-19. 2021. *Nature*. 596(7873):495-504.

Literaturverzeichnis

Thiel V, Herold J, Schelle B & Siddell SG. Infectious RNA transcribed in vitro from a cDNA copy of the human coronavirus genome cloned in vaccinia virus. 2001. *J Gen Virol.* 82:1273-1281.

Thiel V & Siddell SG. Reverse genetics of coronaviruses using vaccinia virus vectors. 2005. *Curr Top Microbiol Immunol.* 287:199-227.

Thiel V & Weber F. Interferon and cytokine responses to SARS-coronavirus infection. 2008. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19:121-132.

Tooze J, Tooze SA & Fuller SD. Sorting of progeny coronavirus from condensed secretory proteins at the exit from the trans-Golgi network of AtT20 cells. 1987. *J Cell Biol.* 105:1215-1226.

Vezzani B, Perrone M, Carinci M, Palumbo L, Tombolato A, Tombolato D, Daminato C, Gentili V, Rizzo R, Campo G, Morandi L, Papi A, Spadarp S, Casolari P, Contoli M, Pinton P, Giorgi C. SARS-CoV-2 infection as a model to study the effect of cinnamaldehyde as adjuvant therapy for viral pneumonia. 2023. *J Inflamm.* 20(1):40.

Vyas S, Chesarone-Cataldo M, Todorova T, Huang YH & Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. 2013. *Nat Commun.* 4:2240.

Weitz E. 2025. Titel. <http://www.wikipathways.org/pathways/WP5527> (letzter Aufruf).

Widagdo W, Raj VS, Schipper D, Kolijn K, van Leenders G, Bosch BJ, Bensaid A, Segalés J, Baumgärtner W, Osterhaus A, Koopmans MP, van den Brand JMA & Haagmans BL. Differential expression of the middle east respiratory syndrome coronavirus receptor in the upper respiratory tracts of humans and dromedary camels. 2016. *J Virol.* 90:4838-4842.

Wielckens K, Schmidt A, George E, Bredehorst R & Hiltz H. DNA fragmentation and NAD depletion. Their relation to the turnover of endogenous mono(ADP-ribosyl) and poly(ADP-ribosyl) proteins. 1982. *J Biol Chem.* 257:12872-12877.

World Health Organization. Middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). 2022. https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_1 (letzter Aufruf: 09.09.2025).

Wollschläger D. Grundlagen der Datenanalyse mit R. Eine anwendungsorientierte Einführung. 2012. Springer Nature.

Wu D, Wu T, Liu Q & Yang Z. The SARS-CoV-2 outbreak: what we know. 2020. *Int J Infect Dis.* 94:44-48.

Wu Y, Jin S, Liu Q, Zhang Y, Ma L, Zhao Z, Yang S, Li YP & Cui J. Selective autophagy controls the stability of transcription factor IRF3 to balance type I interferon production and immune suppression. 2021. *Autophagy.* 17:1379-1392.

Literaturverzeichnis

Xia H, Cao Z, Xie X, Zhang X, Chen JY, Wang H, Menachery VD, Rajsbaum R & Shi PY. Evasion of type I interferon by SARS-CoV-2. 2020. *Cell Rep.* 33:108234.

Xing J, Zhang A, Du Y, Fang M, Minze LJ, Liu YJ, Li XC & Zhang Z. Identification of poly(ADP-ribose) polymerase 9 (PARP9) as a noncanonical sensor for RNA virus in dendritic cells. 2021. *Nat Commun.* 12:2681.

Xu YR, Shi ML, Zhang Y, Kong N, Wang C, Xiao YF, Du SS, Zhu QY & Lei CQ. Tankyrases inhibit innate antiviral response by PARylating VISA/MAVS and priming it for RNF146-mediated ubiquitination and degradation. 2022. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 119:e2122805119.

Yamada T, Horimoto H, Kameyama T, Hayakawa S, Yamato H, Dazai M, Takada A, Kida H, Bott D, Zhou AC, Hutin D, Watts TH, Asaka M, Matthews J & Takaoka A. Constitutive aryl hydrocarbon receptor signaling constrains type I interferon-mediated antiviral innate defense. 2016. *Nat Immunol.* 17:687-694.

Yao T, Foo C, Zheng G, Huang R, Li Q, Shen J & Wang Z. Insight into the mechanisms of coronaviruses evading host innate immunity. 2023. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1869:166671.

Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT & Holmes KV. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. 1992. *Nature*, 357(6377):420-422.

Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H & Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. 2020. *Signal Transduct Target Ther.* 5:209.

Zarkovic G, Belousova EA, Talhaoui I, Saint-Pierre C, Kutuzov MM, Matkarimov BT, Biard D, Gasparutto D, Lavrik OI & Ishchenko AA. Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: New insights into DNA ADP-ribosylation. 2018. *Nucleic Acids Res.* 46:2417-2431.

Zhang SY, Boisson-Dupuis S, Chagnier A, Yang K, Bustamante J, Puel A, Picard C, Abel L, Jouanguy E & Casanova JL. Inborn errors of interferon (IFN)-mediated immunity in humans: insights into the respective roles of IFN-alpha/beta, IFN-gamma, and IFN-lambda in host defense. 2008. *Immunol Rev.* 226:29-40.

Zhang Y, Mao D, Roswit WT, Jin X, Patel AC, Patel DA, Agapov E, Wang Z, Tidwell RM, Atkinson JJ, Huang G, McCarthy R, Yu J, Yun NE, Paessler S, Lawson TG, Omattage NS, Brett TJ & Holtzman MJ. PARP9-DTX3L ubiquitin ligase targets host histone H2BJ and viral 3C protease to enhance interferon signaling and control viral infection. 2015. *Nat Immunol.* 16:1215-1227.

Zhu H, Tang YD, Zhan G, Su C & Zheng C. The critical role of PARPs in regulating innate immune responses. 2021. *Front Immunol.* 12:712556.

Literaturverzeichnis

Ziebuhr J, Schelle B, Karl N, Minskaia E, Bayer S, Siddell SG, Gorbalenya AE & Thiel V. Human coronavirus 229E papain-like proteases have overlapping specificities but distinct functions in viral replication. 2007. *J Virol.* 81(8):3922-3932.

Zimmermann L, Zhao X, Makrochyova J, Wachsmuth-Melm M, Prasad V, Hensel Z, Bartenschlager R. & Chlanda P. SARS-CoV-2 nsp3 and nsp4 are minimal constituents of a pore spanning replication organelle. 2023. *Nat Commun.* 14:78-94.

Danksagung

9. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. John Ziebuhr für die Möglichkeit an diesem Projekt in seiner Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen und das entgegengebrachte Vertrauen bedanken. Darüber hinaus bin ich sehr dankbar für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, die Unterstützung während der gesamten Zeit und die Möglichkeit zum Austausch auf verschiedenen Konferenzen.

Bei Apl. Prof. Dr. Elena Evguenieva-Hackenberg möchte ich mich für die externe Betreuung und die konstruktive Kritik bedanken.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Ramakanth Madhugiri für die Betreuung, die zahlreichen fachlichen Diskussionen und den (persönlichen) Austausch – Thanks a lot Rama!

Ein großes Dankeschön gilt Dr. Alexandra Naunheim, von der ich in meinem ersten Jahr fachlich und methodisch sehr viel gelernt habe und die stets ein offenes Ohr für Rückfragen hatte. Außerdem möchte ich mich für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken. Ein ebenso großer Dank gilt Dr. Shobha Rani Basineni für die großartigen Gespräche, die Unterstützung im Laboralltag und darüber hinaus.

Eine große Hilfe war ebenso Nadja Karl, die dank jahrlanger Erfahrung im Labor gute Lösungsansätze vorschlagen konnte. Für die Unterstützung bei allen administrativen Belangen möchte ich mich bei Sibylle Hirzmann bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Kooperationspartnern bedanken.

Prof. Dr. Marek Bartkuhn und Dr. Jochen Wilhelm möchte ich für die Hilfe bei der Auswertung der Microarray- und NGS-Datensätze danken. Dabei gilt mein Dank ebenfalls Dr. Tara Prociada-Kowalski für die Durchführung der Sequenzierung.

Prof. Dr. Michael Kracht möchte ich für die Möglichkeit danken CRISPR-Cas9-*Knockout* Zellen in seinem Labor generieren zu dürfen. Darüber hinaus möchte ich mich für den wissenschaftlichen Austausch und die Unterstützung im Umgang mit dem Microarray-Datensatz bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt auch seinem Team, insbesondere Dr. Vincent Benadict Albrecht und Helke Peppler die eine sehr große Hilfe bei der praktischen Umsetzung im Labor waren.

Dr. Katrin Richter und Prof. Dr. Veronika Grau danke ich für die Unterstützung im Umgang mit der Differenzierung von THP-1 Zellen.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Prof. Dr. Krzysztof Pyrc und seinem Team für die Bereitstellung der A549^{CD13+/TMPRSS2+} Zellen.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung bedanken.

Eidesstattliche Versicherung

10. Eidesstattliche Versicherung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Angaben zu auf künstlicher Intelligenz (KI) basierender Hilfen wie ChatGPT oder SchulKI von OpenAI oder Gemini von Google zur Erstellung meiner Dissertation (Zutreffendes angekreuzt):

Ich habe bei der Erstellung dieses Textes kein KI-Tool verwendet.

Ich habe ein KI-Tool in den folgenden Bereichen eingesetzt (Mehrfachnennungen möglich):

Ideen finden, meine Kreativität anregen

Verstehen von Konzepten, Recherche von Fakten und Definitionen

Optimierung eines von mir verfassten Textes

Erstellen ganzer Textpassagen nach meinen Vorgaben

Folgende KI-Tools habe ich verwendet, damit aufgeführte Teile meines Textes von dem Tool wie folgt profitiert haben:

12.12.2025, Gießen

Datum, Ort

Lisa-Marie Seeber