

Arthur Lang
Dr. med.

Validation of a genome-wide CRISPR/Cas9-Screen identifies RBM39 as a novel factor contributing to Toll-like receptor 3 signaling

Fach/Einrichtung: Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. Volker Lohmann

Bei Kontakt mit doppelsträngiger RNA, einem Replikationsintermediat vieler RNA-Virus Infektionen, lösen die zytosolischen Mustererkennungsrezeptoren RIG-I und MDA5 sowie der endosomal lokalisierte Toll-like Rezeptor 3 antivirale Signalantworten als Teil des angeborenen Immunsystems aus. Obwohl sie sich im Mechanismus ihrer Aktivierung und der Rekrutierung von Adaptorproteinen unterscheiden, konvergieren sie letztendlich in der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF3. Diese induzieren die Expression proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und Interferone, welche entweder direkt antiviral wirken oder die adaptive Immunantwort aktivieren, um das eingedrungene Pathogen unschädlich zu machen. In Hepatozyten scheinen sich die Muster der TLR3-vermittelten Geninduktion jedoch von jenen zu unterscheiden, die durch seine zytosolischen Gegenspieler verursacht werden. Auf der Suche nach potenziellen, noch nicht charakterisierten Regulatoren oder Kofaktoren der TLR3-Signalübertragung in Hepatozyten führten Grünvogel et al. einen genomweiten CRISPR/Cas9-basierten Knockout-Screen durch und erstellten eine Liste von Kandidatengen, deren Knockout die Signalübertragung durch TLR3 beeinträchtigten.

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Validierung der im obigen Screen identifizierten Kandidaten. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf drei Kandidaten gelegt: PTPRT, KDM2A und RBM39. Die siRNA-vermittelte Ausschaltung jedes dieser drei Kandidaten führte zu einer substanziellen Reduktion der TLR3-Antwort in zwei Leberzelllinien. Weitere Experimente, welche unter anderem siRNA-resistente Überexpressionssysteme und CRISPR/Cas9-vermittelte Knockouts umfassten, zeigten jedoch, dass die ektopische Expression nur eines der drei Kandidaten diesen Phänotyp in tPH5CH-Zellen umkehren und somit bestätigen konnte: RBM39. Basierend auf den Daten dieser Arbeit scheint RBM39 an der TLR3-vermittelten Signalübertragung beteiligt zu sein, während die Identifizierung der beiden anderen Kandidaten, PTPRT und KDM2A, wahrscheinlich durch Off-Targets des ursprünglichen Knockout-Screens verursacht wurde. Ihr ursprünglicher Phänotyp konnte nicht bestätigt werden.

Als Mitglied der RNA-bindenden Proteine, zelluläre Wirtsfaktoren, die an einem Kaleidoskop von RNA-bezogenen Prozessen physiologischen und pathologischen Ursprungs beteiligt sind, ist RBM39 ein interessanter Kandidat für künftige Forschungen hinsichtlich seiner Rolle bei der TLR3-vermittelten antiviralen Signalübertragung in Hepatozyten. Die Entschlüsselung seines Wirkmechanismus und seiner Rolle in diesem Signalweg könnte zu einem tieferen Verständnis der antiviralen Immunität führen und ein potenzielles Ziel für therapeutische Interventionen bei Virusinfektionen darstellen.