

Aus der Abteilung Virologie
des Paul-Ehrlich-Instituts
Bundesamt für Sera und Impfstoffe
Langen

Funktionelle Analyse von Vacciniavirus Proteinen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Robert Merget
aus Aschaffenburg

Frankfurt am Main, 2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
Summary	VIII
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Pockenviren.....	2
2.1.1 Taxonomie der Pockenviren.....	3
2.1.2 Virionen-Morphologie und Aufbau des Genoms	4
2.1.3 Replikationszyklus der Pockenviren.....	6
2.1.4 Die CEV-induzierte Formierung von Aktinschwänzen.....	10
2.2 Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara	12
2.2.1 Entstehung, Genom und Eigenschaften von MVA	12
2.2.2 MVA als sichere, effiziente Vektor-Vakzine	14
2.3 Vacciniavirus <i>host range</i> Gene	15
2.4 Die NF-KB-vermittelte Immunantwort	17
2.4.1 Der klassische und alternative NF-KB-Aktivierungsweg.....	18
2.4.2 Vacciniavirale Modifikation des NF-KB-Systems	19
2.5 Der programmierte Zelltod (Apoptose)	20
2.5.1 Intrinsischer und extrinsischer Aktivierungsweg.....	21
2.5.2 Vacciniavirale Apoptoseinhibition.....	24
3 Material und Methoden	27
3.1 Material	27
3.1.1 Chemikalien.....	27
3.1.2 Gebrauchslösungen.....	28
3.1.3 Verbrauchsmaterial	30
3.1.4 Geräte und Apparaturen	30
3.1.5 Zellkulturreagenzien.....	32

3.1.6	Beschaffenheit der Zellkulturmedien	32
3.1.7	Eukaryontische Zelllinien.....	33
3.1.8	Kommerziell erhältliche Systeme, Kits und Standards	33
3.1.9	Plasmide.....	34
3.1.10	Viren.....	34
3.1.11	Antikörper	35
3.2	Zellbiologische Methoden	37
3.2.1	Kultivierungsbedingungen von Zelllinien.....	37
3.2.2	Passagierung adhärenter Zellen.....	37
3.2.3	Kultivierung adhärenter Zellen in 6- und 12-Loch-Zellkulturplatten	37
3.2.4	Kryokonservierung eukaryontischer Zellen	38
3.2.5	Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen.....	38
3.2.6	Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen	39
3.3	Molekularbiologische Methoden.....	40
3.3.1	Bestimmung der DNA-Konzentration per Absorptionsspektrometrie.....	40
3.3.2	Restriktionsanalyse von DNA.....	40
3.3.3	DNA-Agarosegel-Elektrophorese	41
3.3.4	Elution von DNA aus einem Agarosegel	41
3.3.5	Transformation mittels Hitzeschock.....	41
3.3.6	Plasmid-DNA Mini-Präparationen.....	42
3.3.7	Plasmid-DNA Maxi-Präparationen	42
3.4	Proteinbiochemische Methoden	43
3.4.1	Western Blot zur Analyse der Genexpression	43
3.4.2	Immunzytochemie	47
3.4.3	Durchflusszytometrie	50
3.5	Virologische Methoden	52
3.5.1	Vacciniavirusinfektion	52
3.5.2	Vacciniavirusanzucht	52
3.5.3	Virustitration und Immunfärbung	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Vergleichende Sequenzanalyse von CVA 152 und CVA 386.....	55
4.2	Herstellung von Expressionsplasmiden ausgewählter Gene der Deletion I und II.....	56
4.3	<i>In silico</i> -Analyse der Gene der Deletion I und II anhand Datenbank-gestützter Computermodelle.....	57

4.4	Expressionsstudien der Gene der Deletion I und II mittels Western Blot-Analyse.....	58
4.5	Das Protein M2 ist N-glykosyliert	61
4.6	Lokalisationsstudien der Gene der Deletion I und II mittels Immunfluoreszenz in BHK-Zellen	62
4.6.1	Analysen nach transienter Plasmidtransfektion bzw. zusätzlicher MVA-Infektion.....	62
4.6.2	Kolokalisationsstudien der Proteine C14, C15, C16, M1 und M2 mittels Immunfluoreszenz nach Kotransfektion bzw. spezifischer Kompartiment-Färbung....	73
4.7	Das sekretorische Protein M2 inhibiert die ERK-2-Phosphorylierung von extrazellulär	80
4.8	Analysen einer potentiell antiapoptotischen Wirkung der Gene C12L, C14L und C15L mittels Durchflusszytometrie.....	82
5	Diskussion	87
5.1	Analysen des Gens C12L/SPI-1 bezüglich Expression, Lokalisation und potentieller Apoptoseinhibition	87
5.2	Die Proteine C14 und C15 sind innerhalb der Mitochondrien lokalisiert und geben Hinweise auf eine antiapoptotische Funktion.....	89
5.3	C16L: Spezifische Interaktion mit F-Aktin?.....	91
5.4	M1L und OLR 037: Funktionsverlust oder neu entstandenes Gen?	94
5.5	Das N-glykosylierte Sekretionsprotein M2 _{CVA 152} inhibiert die NF-KB-Aktivierung über eine unbekannte, extrazelluläre Signalkaskade.....	96
6	Literaturverzeichnis.....	101
7	Anhang.....	112
Anhang A:	Sequenzen der Proteine C12, C16, M1, M2 und 037 aus CVA 152	112
Anhang B:	Durchflusszytometrie.....	115

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APAF-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAFF	<i>B-cell-activating factor belonging to the TNF family</i>
Bax	Bcl-2 assoziiertes Protein x
Bcl-2	<i>b-cell lymphoma-2</i>
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BLC	<i>B-lymphocyte chemoattractant</i>
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Caspase	Cysteinyl-Aspartyl-Protease
CD40L	CD40 Ligand
CEF	<i>chicken embryo fibroblasts</i>
CEV	<i>cell-associated enveloped virion</i>
CHO	chinesischer Hamstereierstockzellen
COX-2	Cyclooxygenase 2
CVA	Chorioallantois Vacciniavirus Ankara
Cy	<i>cyanine</i>
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
dATP	2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxiribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	<i>extracellular enveloped virion</i>

ELC	<i>Epstein–Barr virus-induced molecule 1 ligand CC chemokine</i>
EMEM	<i>Earle’s minimal essential medium</i>
ERK-2	<i>extracellular signal-regulated kinase-2</i>
EV	<i>extracellular enveloped virus</i>
EYFP	<i>enhanced yellow fluorescent protein</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FADD	<i>fas associating protein with death domain</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanad
GM-CSF	<i>granulocyte–macrophage-colony-stimulating factor</i>
h	Stunde
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
hpi	<i>hours post infection</i>
HR	<i>host range</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IEV	<i>intracellular enveloped virion</i>
IF	Immunfluoreszenz
IKB	<i>inhibitor of NF-κB</i>
IKK	<i>IKB-kinase</i>
IL	Interleukin
IMV	<i>intracellular mature virion</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LT	Lymphotoxin
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein-1</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
MEK-2	MAP-ERK-Kinase-2
MG	Molekulargewicht
MIP-1a	<i>macrophage inflammatory protein-1a</i>
μ M	mikromolar
<i>moi</i>	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure

MV	<i>mature virion</i>
MVA	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
NEA	<i>non-essential aminoacids</i>
NF-KB	<i>nuclear factor-KB</i>
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
NP40	Nonidet P40
N-WASP	<i>Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein</i>
OLR	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAK1	<i>p21-activated kinase 1</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PBS-T	Phosphat gepufferte Salzlösung mit Tween® -20
PE	Phycoerythrin
PLA2	Phospholipase 2
Pr.I.	Proteasomeninhibitor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RPV	<i>Rabbit Poxvirus</i>
RT	Raumtemperatur
SDF-1	<i>stromal cell-derived factor-1a</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SLC	<i>secondary lymphoid tissue chemokine</i>
SPI	<i>serine protease inhibitor</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen/Minute
ÜN	über Nacht
VACV	Vacciniavirus
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
[v/v]	volume/volume

WB	Western Blot
WR	Western Reserve
WV	<i>wrapped virion</i>

Summary

Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) emerged after more than 500 passages of chorioallantois vaccinia virus Ankara (CVA) on chicken embryo fibroblasts. The passaging was accompanied by the loss of numerous vaccinia virus encoded virulence factors, whereby MVA obtained a highly attenuated phenotype. Lacking pathogenicity for human beings, MVA nevertheless is able to express its complete genome, including inserted foreign genes. Hence, MVA is a promising candidate not only as a third generation pox-vaccine but also as a vector vaccine against numerous infectious diseases as well as for tumor associated immunotherapy.

An essential feature of the attenuation of MVA is its replication deficiency on human cell lines. So far, it has not been possible to identify the genetic alteration responsible for this phenotype. Previous work suggests that this effect can be allocated at least partially to the time period between two progenitors of MVA. Indicatively, human HeLa cells appeared to be permissive for CVA 152 but only semipermissive for CVA 386 infection.

By means of a sequential analysis of CVA 152 and CVA 386 different deletions could be identified whose occurrence is potentially responsible for the altered phenotype of CVA 386.

Therefore, the genes C12L, C14L, C15L and C16L of deletion I and M1L, M2L and open reading frame (ORF) 037 of deletion II have been characterized in this work. The appropriate proteins have been studied with the help of expression plasmids by transfection of cells analysing posttranslational modification as well as subcellular localization.

Regarding the protein M2 a posttranslational N-glycosylation and a localization within the trans-medial Golgi apparatus could be demonstrated. Additionally, a secretion of M2 into cellular supernatants of transfected 293T cells could be shown. Further, the previously described NF-KB-activation inhibitory effect of M2 could be characterized to be initiated from extracellularly added M2 protein.

In laserscan microscopy, mitochondrial localization of the proteins C14 and C15 was detected. C16, on the other hand, besides a primarily intranuclear dispersal was additionally found to colocalize with F-actin. Moreover, additional experiments provided first evidence of an inhibitory function of the C14 and C15 proteins towards Staurosporin-induced apoptosis of BHK cells.

1 Zusammenfassung

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) entstand nach mehr als 500 Passagen des Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) auf Hühnerembryofibroblasten. Mit der Passagierung ging u.a. der Verlust zahlreicher Vacciniavirus Virulenzfaktoren einher, wodurch MVA einen hochattenuierten Phänotyp aufweist. Bei mangelnder Pathogenität für humane Organismen verfügt das MVA jedoch über eine vollständig erhaltene Genexpression inklusive integrierter Fremdgene. Hierdurch bedingt ist MVA ein vielversprechender Kandidat nicht nur als Pockenimpfstoff der dritten Generation, sondern auch als Vektorvakzine gegen zahlreiche Infektionskrankheiten sowie in der Tumor-assoziierten Immunotherapie.

Ein wesentliches Charakteristikum der Attenuierung von MVA ist seine fehlende Replikationsfähigkeit in humanen Zellen. Bislang ist es jedoch noch nicht möglich gewesen, die hierfür verantwortlichen genetischen Veränderungen eindeutig zuzuordnen. Vorangegangene Arbeiten wiesen darauf hin, dass sich der beschriebene Effekt zumindest teilweise auf die Zeitspanne zwischen zwei Vorläufern des MVA eingrenzen lässt. So zeigten sich humane HeLa Zellen für das CVA 152 permissiv, während gegenüber dem CVA 386 nur noch eine Semipermissivität bestand.

Mit Hilfe einer vergleichenden Sequenzanalyse von CVA 152 und CVA 386 konnten verschiedene Deletionen identifiziert werden, deren Auftreten potentiell verantwortlich für den veränderten Phänotyp von CVA 386 ist.

In diesem Zusammenhang wurden im Rahmen dieser Arbeit die Gene C12L, C14L, C15L und C16L der Deletion I und die Gene M1L, M2L und der OLR 037 der Deletion II charakterisiert. Durch Transfektion von Expressionsplasmiden wurden die entsprechenden Proteine bezüglich ihrer Expression und posttranslationalen Modifikation, sowie ihrer subzellulären Verteilung untersucht.

So ließ sich für das Protein M2 eine posttranslationale N-Glykosylierung und die Lokalisation innerhalb des trans-medialen Golgiapparats nachweisen. Zusätzlich konnte eine Sekretion des M2 Proteins im Zellüberstand transfizierter 293T-Zellen gezeigt, sowie die bereits publizierte Inhibition der NF- κ B-Aktivierung durch extrazellulär zugegebenes M2 Protein eingeleitet werden.

Die Proteine C14 und C15 zeigten sich in der Laserscanmikroskopie mitochondrial lokalisiert; C16 dagegen kolokalisierte neben einer hauptsächlich intranukleären Verteilung zusätzlich mit F-Aktin. Ferner ergaben sich für die Proteine C14 und C15 erste Hinweise auf eine inhibitorische Funktion gegenüber Staurosporin-induzierter Apoptose.

2 Einleitung

2.1 Pockenviren

Der bekannteste Vertreter der Familie der Pockenviren ist das Variolavirus, Erreger der Pocken des Menschen (*Smallpox*). Es gibt Hinweise dafür, dass die Ursprünge der Pockenerkrankung in Ägypten liegen, wo sie ca. 2000 v. Chr. für den Tod des Pharaohs Ramses V. verantwortlich gemacht werden. Von dort aus breiteten sie sich nach Osten Richtung Indien, China und Japan aus, bevor sie mit Beginn der Kreuzzüge ebenfalls großflächig auf Europa übergriffen (Fenner et al., 1988). Dies bildete den Ausgangspunkt für die Verbreitung auf den amerikanischen Kontinent, wo die Menschenpocken u.a. zum Untergang der Azteken und Inka beitrugen. Am Ende des 18. Jahrhunderts herrschte eine über die ganze Welt verbreitete Pocken-Endemie mit einer Mortalitätsrate von bis zu 30%. Hiervon ausgenommen waren Gebiete mit geringer Bevölkerungsdichte, wie z.B. Australien oder Neuseeland.

Erste Impfungen mit Variolavirus („Variolation“) gehen bis ins zehnte Jahrhundert zurück und entwickelten sich unabhängig in China und Indien. Hierbei wurden geringe Mengen von getrockneten Pusteln eingeatmet (China) bzw. die Inhalte der Pusteln subkutan appliziert (Indien). Im Jahr 1776 gelang es dem englischen Landarzt Edward Jenner, einen 8-jährigen Jungen mit Hilfe von Kuhpockenviren gegen Variolaviren zu immunisieren (Jenner, 1798). Dieses Verfahren wurde in der Folge als Vakzination bezeichnet (von lat. *vacca* = Kuh), wobei das Kuhpockenvirus später durch das Vacciniavirus (VACV) ersetzt wurde, das eine mildere Impfreaktion verursacht. Die Frage nach der Herkunft des VACV war lange Zeit ungeklärt. Jüngere Untersuchungen lassen jedoch Equiden (Einhufer) als natürlichen Wirt vermuten (Tulman et al., 2006).

Im Jahr 1967 startete die Weltgesundheitsorganisation (WHO) eine intensivierte Ausrottungskampagne in Form von systematischen Impfprogrammen. Im Zuge dessen konnten die Pocken 1980 schließlich für ausgestorben erklärt werden. Hierfür essentiell notwendig war die Tatsache, dass sich der Wirtstropismus des Variola Virus allein auf den Menschen beschränkt und folglich keinerlei tierische Reservoirare vorhanden waren (Fenner et al., 1988).

2.1.1 Taxonomie der Pockenviren

Die Familie der *Poxviridae* besteht aus zwei Subfamilien, den *Entomopoxvirinae* und den *Chordopoxvirinae*. Während sich das Wirtsspektrum der *Entomopoxvirinae* auf Insekten beschränkt, konnten *Chordopoxvirinae* ausschließlich innerhalb von Vertebraten nachgewiesen werden. Des Weiteren gliedern sich die beiden Subfamilien in drei bzw. acht verschiedene Genera (siehe Tabelle 2.1.1). Spezies innerhalb eines Genus weisen Ähnlichkeiten hinsichtlich Genom, Aufbau und Wirtsspektrum auf (Moss, 2007). Humanpathogene Vertreter stammen aus den Genera *Parapoxvirus*, *Yatapoxvirus*, *Molluscipoxvirus* und *Orthopoxvirus*, wobei das Variolavirus sowie das Molluscum contagiosum-Virus ausschließlich für den Menschen infektiös sind. Das innerhalb dieser Arbeit untersuchte CVA 152 wie auch das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) und deren Vorläufer, das Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) werden dem Genus *Orthopoxvirus* zugerechnet.

Die Tabelle 2.1.1 gibt einen Überblick über die einzelnen Untergruppen der Pockenviren und nennt beispielhaft einzelne Virusspezies.

Subfamilie	Genus	Beispiele für Virusspezies
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Orthopoxvirus</i>	Affenpockenvirus, Ectromelievirus (Maus), Kuhpockenvirus, Vacciniavirus, Variolavirus
	<i>Parapoxvirus</i>	Pseudokuhpockenvirus
	<i>Avipoxvirus</i>	Taubenpockenvirus, Geflügelpockenvirus
	<i>Capripoxvirus</i>	Ziegenpockenvirus, Schafpockenvirus
	<i>Leporipoxvirus</i>	Myxomatosevirus, Kaninchenfibromatosevirus
	<i>Suipoxvirus</i>	Schweinepockenvirus
	<i>Molluscipoxvirus</i>	Molluscum contagiosum-Virus
	<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapockenvirus, Yabaaffenpockenvirus
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	Pockenviren der Käfer, Schmetterlinge,
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	Dipteren und ihrer Larven
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	

Tabelle 2.1.1: Familie der Pockenviren. Verändert nach Moss, 2007.

2.1.2 Virionen-Morphologie und Aufbau des Genoms

Mit einem Ausmaß von $\approx 360 \times 270 \times 250$ nm sind die ziegelsteinförmigen Pockenviren die größten bekannten Viren und auch lichtmikroskopisch noch zu erkennen. Man differenziert vier verschiedene Virionenformen, die während des Replikationszyklus durchlaufen werden (siehe 2.1.3). Sie unterscheiden sich vorrangig durch die Anzahl der sie umgebenden Membranen sowie durch die transmembrane Proteinzusammensetzung. Die innere Struktur der Virionen besteht aus einem hantelförmigen Nukleocapsid (*core*) und Lateralkörpern, die sich zwischen den konkaven Seiten des Nukleocapsids und der inneren Hüllmembran befinden. Diese innere Membran ist zusätzlich von äußeren Membranen umgeben, deren Anzahl zwischen den einzelnen Virionenformen variiert. In der Reihenfolge des Replikationszyklus werden das IMV (*intracellular mature virion*) bzw. das IEV (*intracellular enveloped virion*) von einer bzw. drei äußeren Membranen umgeben, während das EEV (*extracellular enveloped virion*) sowie das CEV (*cell-associated enveloped virion*) von je zwei äußeren Membranen umhüllt werden. Die einzelnen äußeren Membranen weisen hierbei unterschiedliche Konstellationen an viralen Oberflächenproteinen auf.

In einer kürzlich von Moss eingeführten, neuen Nomenklatur wird das IMV lediglich mit MV (*mature virion*) bezeichnet. Der Begriff IEV wurde durch WV (*wrapped virion*) ersetzt, da auch das MV bereits von einer Membran umhüllt ist. Die extrazellulären Formen CEV und EEV werden hier unter EV (*extracellular enveloped virus*) zusammengefasst (Moss, 2006).

Pockenviren verfügen über ein lineares, doppelsträngiges Genom aus DNA, dessen Länge für die einzelnen Genera zwischen ≈ 130 kpb (Kilobasenpaare; Parapoxviren) und ≈ 300 kbp (einige Avipoxviren) variiert und das für 150 -200 Proteine codiert. Hierbei sind fast 100 offene Leserahmen (OLR) innerhalb aller *Chordopoxvirinae* konserviert. Diese Gene befinden sich oft im Zentrum des Genoms und haben essentielle Funktionen innerhalb des Replikationszyklus. Demgegenüber codieren die Gene an den variablen Enden des Genoms häufig für Proteine der Virus-Wirt-Interaktion.

Die pockenvirale DNA für sich genommen ist nicht infektiös, da für die zytoplasmatische Genexpression bereits virale Proteine notwendig sind (siehe 2.1.3). Allen Pockenviren gemeinsam sind zwei identische, aber gegensätzlich orientierte ITR (*inverted terminal repeats*) an beiden Enden des Genoms (Garon et al., 1978). Diese ITR beinhalten u.a. eine speziesabhängige Anzahl an OLR. Die ITR von CVA codieren für 16 verschiedene OLR, die innerhalb des Genoms folglich doppelt vorhanden sind. Hierzu zählen unter anderem die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten C15L (= B21R) und C16L (= B22R).

Die diesen Bezeichnungen zugrunde liegende Nomenklatur geht auf den Restriktionsverdau des gesamten Genoms von VACV Copenhagen (COP) mit dem Enzym *HindIII* zurück (Goebel et al., 1990). Die resultierenden Fragmente wurden der Größe nach mit A bis P benannt und die enthaltenen offenen Leserahmen (OLR) – mit Ausnahme des Fragments C – von links nach rechts durchnummeriert. Der Zusatz L (links) bzw. R (rechts) gibt jeweils die Leserichtung der OLR an.

Die Abbildung 2.1.1 gibt einen Überblick über die Struktur der Virionen und den Aufbau des Genoms.

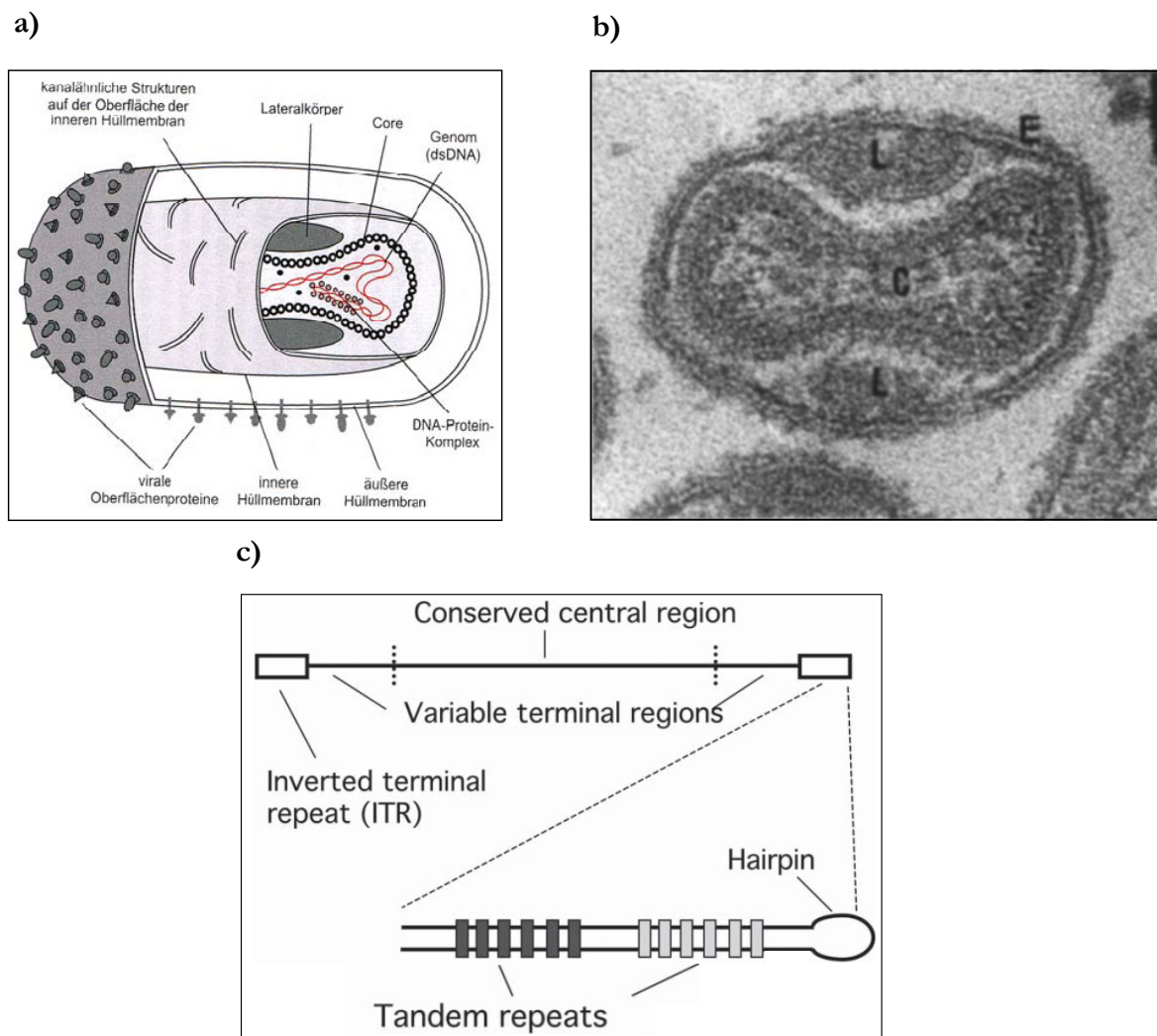


Abbildung 2.1.1: Struktur und Genomorganisation der Pockenviren. a) Schematische Darstellung eines Pockenviruspartikels (extrazelluläre Form). Nach Modrow et al., 2002. b) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme eines Virions (intrazelluläre Form). Nukleocapsid (C), Lateralkörper (L) und äußere Hüllmembran sind gekennzeichnet. Nach Pogo & Dales, 1969. Die Grafik in c) zeigt den im Text beschriebenen Aufbau des pockenviralen Genoms. Die ITRs enthalten neben OLR auch eine variable Anzahl repetitiver Sequenzen (*tandem repeats*). Am Ende des Genoms innerhalb der ITRs bildet die DNA eine Haarnadelschleife (*hairpin loop*) und ist kovalent geschlossen. Verändert nach Mercer et al., 2006.

2.1.3 Replikationszyklus der Pockenviren

In der Abbildung 2.1.2 ist der Replikationszyklus der Pockenviren schematisch dargestellt. Die einzelnen Stadien wurden zur genaueren Unterscheidung nach der alten Nomenklatur benannt (siehe 2.1.2) und sollen im Folgenden der Reihe nach erläutert werden.

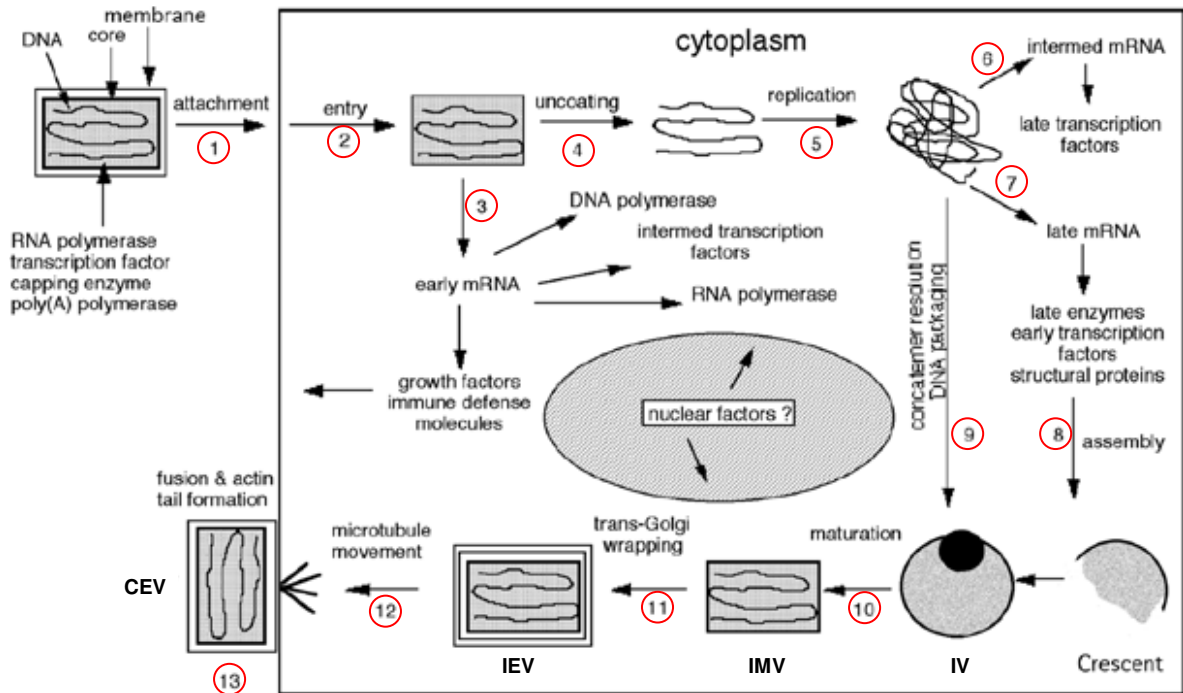


Abbildung 2.1.2: Replikationszyklus der Pockenviren. Die Grafik gibt einen Überblick über die Reihenfolge der Abläufe von der Adhäsion des Virus an der Zellmembran (1) bis zum Austritt der neu produzierten Viren mit möglicher Aktinschwanz-Formierung (13). Die einzelnen Stadien werden im Text näher erläutert. Nach Moss, 2007.

Jeder virale Replikationszyklus beginnt mit dem Eintritt des Virus in eine Wirtszelle. Aufgrund verschiedener infektiöser Formen (EEV/CEV und IMV), die von zwei bzw. lediglich einer Hüllmembran umgeben sind, muss hier bei den Pockenviren zwischen zwei unterschiedlichen Wegen differenziert werden.

Dem Eintritt des IMV in die Zelle (2) geht dessen Adhäsion an der Zellmembran (1) voraus. Die hierfür maßgeblichen Rezeptoren konnten jedoch bisher noch nicht identifiziert werden. In der Vergangenheit wurde eine Bedeutung sowohl des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) als auch einiger Chemokinrezeptoren diskutiert (Eppstein et al., 1985; Lalani et al., 1999), die sich jedoch in der Folge jeweils nicht bestätigen ließ (Hugin and Hauser, 1994; Masters et al., 2001). Ebenso wurde eine Schlüsselfunktion von viralen Oberflächenproteinen wie A27 und D8 vermutet, die an Komponenten der Zelloberflächen-Glykosaminoglykane binden (Chung et al., 1998; Hsiao et al., 1999). Die Tatsache, dass sich entsprechende Deletionsmutanten

sowohl nach alleiniger A27-Deletion als auch nach A27- und D8-Doppeldeletion weiterhin infektiös zeigten (Hsiao et al., 1998;Ward, 2005), lässt dies jedoch inzwischen als ebenfalls fraglich erscheinen.

Im Gegensatz dazu ist man sich einig, dass die Rezeptoren, die an der Adhäsion von IMV bzw. EEV an der Zellmembran beteiligt sind, unterschiedlicher Natur sind. So kann ein Antikörper (AK) gegen ein bisher unbekanntes Antigen die Adhäsion von IMVs mehrheitlich verhindern (Chang et al., 1995), während sich keinerlei Effekt auf die Adhäsion von EEVs beobachten ließ (Vanderplasschen and Smith, 1997).

Neuere Publikationen zeigen, dass allein das IMV bereits über zwei verschiedene Mechanismen zum Zell-Eintritt verfügt.

Ein bereits länger anerkanntes Szenario beinhaltet dabei die Fusion der äußeren Membran des IMV mit der Zellmembran, woraufhin das freigesetzte Nukleokapsid in das Zytosol entlassen wird (Armstrong et al., 1973;Doms et al., 1990). Die virale „Fusionsmaschinerie“ (engl. *entry/fusion complex*) besteht aus 8 verschiedenen Proteinen, die innerhalb aller bislang sequenzierter Pockenviren konserviert ist (Wagenaar and Moss, 2007). Dies lässt vermuten, dass die Möglichkeit des Zelleintritts mittels Membranfusion allen Pockenviren gemeinsam ist (Smith, 2007).

Jüngste Daten weisen dagegen darauf hin, dass der Großteil der Virionen über einen endosomal vermittelten Weg in die Zelle gelangt, der von einem niedrigen Umgebungs-pH-Wert abhängig ist (Mercer and Helenius, 2008;Townsend et al., 2006). Die IMV binden dabei an aktinreiche Zellausstülpungen (Filopodien) und werden von dort aus retrograd Richtung Zellkörper transportiert. Dort angekommen induzieren sie eine elementare Veränderung der Zellmembran, die in einer verstärkten Bildung von Blasen resultiert. Bereits ein IMV ist hierbei ausreichend, um den gesamten Zellkörper zur Blasenbildung anzuregen (Mercer and Helenius, 2008). Mercer et al. konnten des Weiteren zeigen, dass die Blasenbildung für den Zelleintritt der IMV von grundlegender Bedeutung ist und dass Blasenbildung wie auch Zelleintritt u.a. maßgeblich vom zellulären Faktor PAK1 (*p21-activated kinase 1*) abhängen. Für die mittels Makropinozytose erfolgende Aufnahme in die Wirtszelle kommt dem IMV-Oberflächenmolekül Phosphatidylserin eine essentielle Bedeutung zu. Mercer et al. vermuten weiter, dass die Makropinozytose der IMV einen ähnlich immunsuppressiven Effekt zur Folge hat, wie die ebenfalls Phosphatidylserin-vermittelte Phagozytose von *apoptotic bodies* (Albert, 2008;Henson et al., 2008).

Das von zwei äußeren Hüllmembranen umgebene EEV dagegen verliert zunächst seine äußerste Membran, ohne dass diese mit der Zellmembran fusioniert. Für den Bruch der Membran spielen Zelloberflächen-Glykosaminoglykane sowie die komplexbildenden viralen

Proteine A34 und B5 (Law et al., 2006) eine essentielle Rolle. Nun folgt der Zelleintritt des freigesetzten IMV mittels Fusion in der oben beschriebenen Weise. Die aufgebrochene äußerste Membran schirmt das IMV während des Fusionsvorgangs gegen AK ab, dringt aber im Anschluss nicht mit in die Zelle ein (siehe Abbildung 2.1.3). Ob auch für das EEV nach Bruch der äußersten Membran ein endosomal vermittelter Eintrittsmechanismus existiert, ist bislang noch nicht bekannt.

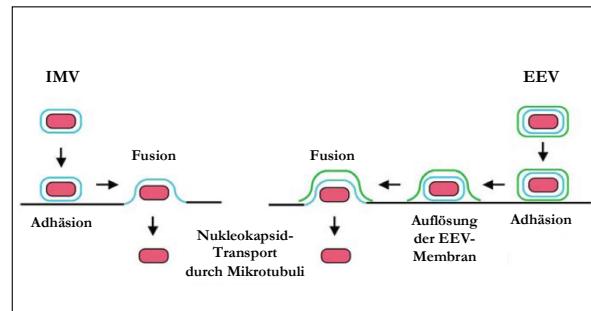


Abbildung 2.1.3: Vergleichende Darstellung des Zelleintritts von IMV und EEV. Die zusätzliche Membran des EEV schützt das Virus während des Fusionsvorgangs gegen Antikörper, verbleibt jedoch nach dessen Eintritt in die Wirtszelle extrazellulär. Nicht dargestellt ist der Zelleintritt der IMV mittels Blasenbildung und Makropinozytose. Verändert nach Mercer et al., 2006.

Nachdem das Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen wurde, wird es mit Hilfe der Mikrotubuli an bestimmte perinukleare Stellen befördert (Carter et al., 2003), wo später die viralen Fabriken (*viral factories*) entstehen. Pockenviren sind unter den DNA-Viren insofern einzigartig, als sich ihre Replikation vollständig innerhalb des Zytoplasmas abspielt.

Die virale Genexpression kann unterteilt werden in früh, intermediär und spät exprimierte Gene. Kürzlich wurden in Untersuchungen des VACV-Stamm WR zusätzlich eine Reihe von Genen als „unmittelbar-früh“ (*immediate early*) klassifiziert (Assarsson et al., 2008). Die einzelnen Genklassen kodieren hierbei jeweils für Transkriptionsfaktoren, die für die zeitlich nachfolgende Genklasse benötigt werden. Die gestaffelte Expression von Transkriptionsfaktoren führt somit zu der für Pockenviren typischen kaskadenartigen Genexpression (Moss, 2007, siehe Abbildung 2.1.4).

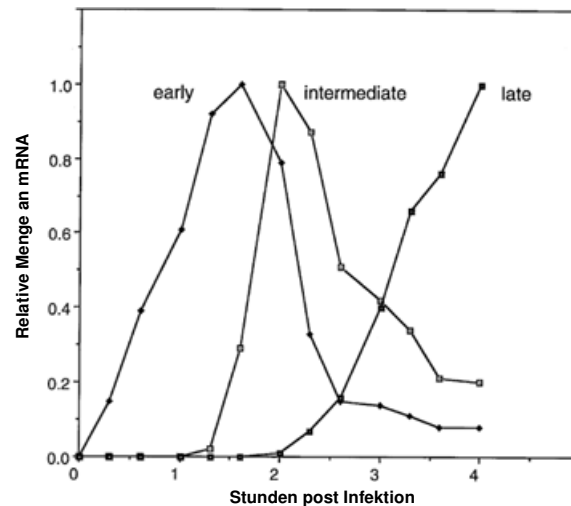


Abbildung 2.1.4: Die pockenvirale Genexpression. Die dargestellte Kinetik zeigt das charakteristische zeitabhängige Expressionsmuster der Pockenviren, das durch die kaskadenartige Expression der Transkriptionsfaktoren bedingt ist. Verändert nach Moss, 2007.

Die frühe Transkription (3) beginnt bereits wenige Minuten nach der Infektion innerhalb des Nukleokapsids. Dies ist nur möglich, da das Virus alle hierfür notwendigen Enzyme selbst mitbringt und daher vollständig unabhängig vom Transkriptionsapparat der Wirtszelle ist. Zur Translation verlässt die mRNA das Nukleokapsid, vermutlich über Poren in der Membran (Cyrklaff et al., 2005). Zu den frühen Genprodukten zählen neben Transkriptionsfaktoren für die intermediäre Genexpression auch Enzyme für die DNA-Replikation sowie Wachstums- und Virulenzfaktoren. Die frühe Genexpression ist Voraussetzung für das anschließende Aufbrechen des Nukleokapsids (*uncoating*, (4)), wodurch die virale DNA zwecks nachfolgender Replikation freigelegt wird.

Mit dem Beginn der Replikation (5) setzt die intermediäre Transkription ein (6), deren Produkte wiederum u.a. Transkriptionsfaktoren für die späte Transkription (7) darstellen. Spät exprimierte Gene kodieren hauptsächlich für Strukturproteine und Enzyme der frühen Transkription, die in die neu produzierten Virionen verpackt werden.

Interessanterweise ist sowohl die intermediäre als auch die späte Genexpression zusätzlich von zellulären Faktoren, sogenannten *host trans-acting factors*, abhängig (Broyles et al., 1999; Gunasinghe et al., 1998; Katsafanas and Moss, 2004; Rosales et al., 1994b; Rosales et al., 1994a). Die Frage liegt nahe, warum ein Virus, das für derartig viele benötigte Enzyme selbst kodiert, seinen Replikationszyklus dennoch von einigen wenigen zellulären Faktoren abhängig macht. Möglicherweise wird hierdurch sichergestellt, dass der Eintritt in die späte Genexpression erst erfolgt, wenn die Zelle sich in einer aktiven Wachstumsphase befindet, da einige der *host trans-acting factors* im Ruhezustand der Zelle nur in sehr geringem Ausmaß vorhanden sind (Katsafanas and Moss, 2004).

Die ersten sichtbaren Strukturen der viralen Morphogenese sind sichelförmige Akkumulationen viraler Proteine und zellulärer Lipide (*crescents*, (8)), die sich in der Folge mit der viralen DNA zu unreifen Virionen (*immature virions*, IV) zusammenlagern (9) und ab ca. 4 Stunden post Infektion (hpi) zu IMV entwickeln (10). Der Transport der Virionen von den viralen Fabriken zur Zellmembran (12) geschieht wiederum mit Hilfe der Mikrotubuli (Sanderson et al., 2000; Ward, 2005), wobei die IMV am Trans-Golgi-Apparat oder an Endosomen eine zusätzliche Doppelmembran erhalten (11) (Hiller and Weber, 1985; Schmelz et al., 1994; Tooze et al., 1993) und in der Folge IEV genannt werden. Die IEV verlassen die Zelle durch die Fusion ihrer äußersten Membran mit der Zellmembran. Sie werden nachfolgend CEV genannt, wenn sie unter Induktion von Aktinschwänzen weiterhin mit der Zellmembran assoziiert bleiben ((13), siehe 2.1.4), bzw. EEV, wenn sie sich vollständig von der Zellmembran lösen (nicht abgebildet). Ein Großteil der IMV verbleibt jedoch solange intrazellulär in der Nähe der viralen Fabriken, bis sie durch die Zelllyse freigesetzt werden (Meiser et al., 2003).

2.1.4 Die CEV-induzierte Formierung von Aktinschwänzen

Um eine effiziente Ausbreitung auf zunächst uninfizierte Zellen in der Umgebung zu gewährleisten, verfügen Pockenviren über verschiedene Strategien.

So dienen die EEV, die nach Verlassen der Zelle jeglichen Kontakt zur Zellmembran aufgeben, der Virusverbreitung über größere Strecken, während die weiterhin membran-assoziierten CEV speziell auf die Infektion unmittelbar benachbarter Zellen ausgerichtet sind. Hierfür induzieren sie die Formation von Aktinschwänzen, die mit der Bildung von Zellprojektionen (*projections*) in Richtung angrenzender Zellen einhergeht.

Zu den viralen Proteinen, die für die Formation der Aktinschwänze eine Rolle spielen, zählen u.a. B5, F12, F13, A33, A34 und A36, wobei dem A36 hierbei eine essentielle Schlüsselfunktion zukommt (Frischknecht et al., 1999; Sanderson et al., 1998; Wolffe et al., 1998). A36, das Bestandteil von IEV ist, jedoch nicht von CEV und EEV (van Eijl et al., 2000), akkumuliert auf der zytosolischen Seite der Zellmembran unterhalb der CEV. Im Sinne einer transmembranären Kaskade aktiviert das CEV-Membranprotein B5R in der Folge die SRC-abhängige Phosphorylierung des A36 an zwei Tyrosinresten (Newsome et al., 2004). Unter Beteiligung der Adapterproteine Grb2 und Nck (Scaplehorn et al., 2002) führt letztlich die Rekrutierung von N-WASP ab ca. 6 hpi zur Bildung von Aktinschwänzen (Frischknecht and Way, 2001). Mit Hilfe der resultierenden Zellprojektionen, die bei einem Wachstum von 2

$\mu\text{m}/\text{min}$ eine Länge von über $20 \mu\text{m}$ erreichen können (Cudmore et al., 1995), werden die an der Spitze der Aktinschwänze befindlichen CEV zur Infektion auf angrenzende Zellen zugetrieben.

Die Formation von Aktinschwänzen ist für eine effiziente Virusverbreitung von grundlegender Bedeutung. Dies lässt sich daran ablesen, dass innerhalb verschiedener Deletionsmutanten der Verlust der Induktion von Aktinschwänzen jeweils mit einer deutlich verminderten Plaque-Größe einherging (Law et al., 2002; Rodger and Smith, 2002; Smith et al., 2002; Smith, 2007).

2.2 Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara

Im Rahmen der Pockeneradikation kamen weltweit verschiedene VACV-Stämme (u.a. Lister; *New York City Board of Health*) zum Einsatz. Dies war jedoch in einigen Fällen mit teilweise gravierenden Nebenwirkungen verbunden. Zusätzlich waren beispielsweise kongenitale oder erworbene Immunsuppression absolute Kontraindikationen für eine Impfung. Um diese Risiken auszuschalten, galt das Interesse ab dem Ende der 60 er Jahre der Entwicklung von Virusstämmen mit geringerer Pathogenität bei erhaltenem Impfschutz (Fenner et al., 1988).

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) geht auf das Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) zurück, das in der Türkei und ab Mitte des 20. Jahrhunderts auch in Deutschland als Vakzin gegen Menschenpocken zum Einsatz kam (Herrlich and Mayr, 1957; Mayr et al., 1975; Meisinger-Henschel et al., 2007). Nachdem MVA 1976 ohne nennenswerte Komplikationen zur Immunisierung von 120 000 Menschen eingesetzt wurde, gilt das Interesse heute vornehmlich seiner Verwendbarkeit als außergewöhnlich sicherem und hocheffizientem Expressionsvektor (Sutter and Moss, 1992).

2.2.1 Entstehung, Genom und Eigenschaften von MVA

Im Zuge der Experimente zur Gewinnung eines attenuierten Impfvirus wurden serielle Passagierungen von CVA auf verschiedenen Zelllinien durchgeführt (Mayr et al., 1975). Hierbei zeigte sich auf Hühnerembryofibroblasten (*chicken embryo fibroblasts*, CEF) die vielversprechendste Entwicklung. Ab der 370. Passage zeigte das entstandene Virus einen gravierenden Verlust der Virulenz u.a. für das Kaninchen und die Babymaus. Auf der Chorioallantoismembran des Hühnerembryos bildete das Virus anstelle von flachen Herden mit tiefer, zentraler Nekrose (Ausgangsvirus) lediglich kleine, kompakte Proliferationsknötchen ohne Nekrose. Das Virus wurde hiernach weiterpassagiert. Ab der 516. Passage zeigte es sich stabil in seinen veränderten Eigenschaften und erhielt in der Folge den Namen MVA. Das MVA-Virus stellt folglich ein artifizielles Laborprodukt dar und lässt sich von allen natürlich vorkommenden Orthopox-Viruspezies gut differenzieren (Mayr et al., 1975).

Seit dieser Zeit ist das MVA Gegenstand intensiver Forschung. So ließ sich lediglich auf CEF, Babyhamsternierenzellen (BHK, *baby hamster kidney*) und Rattendarmepithelzellen (IEC-6, *intestinal epithelial cells*) eine effiziente Replikation beobachten (Drexler et al., 1998; Okeke et al., 2006). Für die meisten Säugerzelllinien und insbesondere humane Zellen hat MVA dagegen die Fähigkeit zum produktiven Wachstum verloren. Interessanterweise zeigt

sich die Unterbrechung des Replikationszyklus innerhalb nicht permissiver Zellen jedoch erst während der Morphogenese neuer Virionen, nach vollständig erfolgter Genexpression. Dies bildet die essentielle Grundlage für das Potential von MVA nicht nur als Pockenimpfstoff der dritten Generation (McCurdy et al., 2004; Vollmar et al., 2006), sondern auch als Vektor-Vakzin gegen die verschiedensten Infektionskrankheiten (siehe 1.1.1).

Auf Ebene des Genoms gehen die beschriebenen Einbußen von Virulenz und Wirtsspektrum gegenüber CVA mit einem Gesamtverlust von ca. 37 800 Basenpaaren (bp) einher, was etwa 18,5 % des Genoms von CVA entspricht. Hierbei lassen sich sechs große Deletionen, die jeweils mehrere Gene betreffen, von einer ganzen Reihe kleinerer Deletionen unterscheiden, die nur einzelne Gene oder wenige Nukleotide umfassen. Alle großen Deletionen traten in den variablen, äußeren Regionen des Genoms auf, die hauptsächlich für Virulenzfaktoren und *host range*-Gene (siehe 2.3) kodieren. Innerhalb des zentralen, konservierten Bereichs sind bei MVA die offenen Leserahmen (OLR) F5L, F11L und O1L fragmentiert, die innerhalb von CVA noch vorhanden sind (Antoine et al., 1998; Meisinger-Henschel et al., 2007; Meyer et al., 1991). Die Abbildung 2.2.1 stellt das Genom von CVA und MVA schematisch gegenüber.

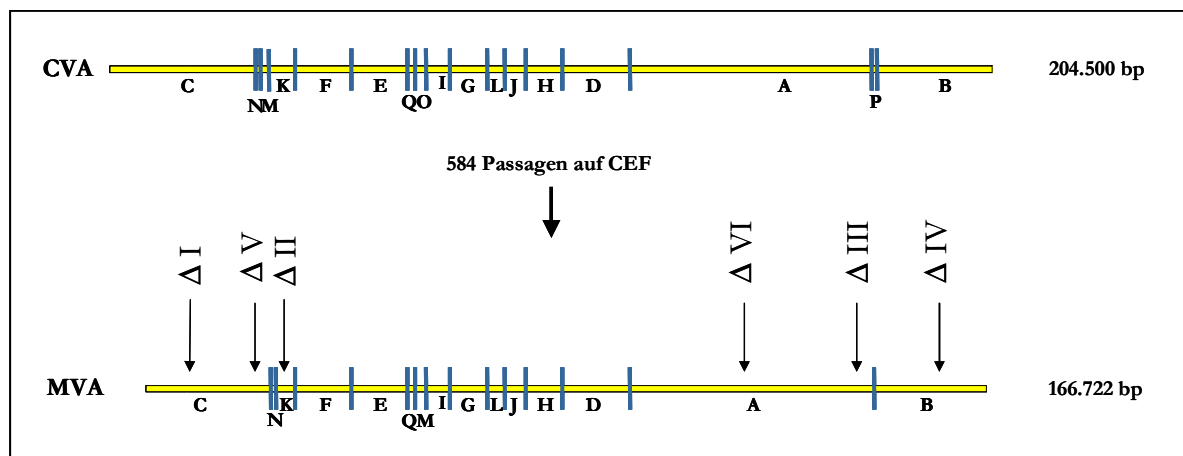


Abbildung 2.2.1: Schematischer Vergleich des Genoms von CVA und MVA auf Grundlage der *HindIII*-Karten. Das innerhalb dieser Arbeit verwendete MVA entspricht der 584. Passage. Die Lokalisation der sechs großen Deletionen ist eingezeichnet.

2.2.2 MVA als sichere, effiziente Vektor-Vakzine

Die in der mangelnden Replikationsfähigkeit auf humanen Zellen begründete fehlende Pathogenität für den Menschen macht MVA zu einem gegenüber herkömmlichen Vacciniaviren außergewöhnlich sicheren Pockenimpfstoff. Zahlreiche Untersuchungen an Mäusen, nicht menschlichen Primaten und eine klinische Phase I-Studie belegen die nahezu nebenwirkungsfreie Anwendbarkeit von MVA bei einer den konventionellen Vacciniaviren vergleichbaren Immunogenität (Coulibaly et al., 2005; Vollmar et al., 2006; Wyatt et al., 2004). Insbesondere konnte dank der veränderten Eigenschaften von MVA dessen besonderes Sicherheitsprofil sogar innerhalb immunsupprimierter Mäuse und Menschen bestätigt werden (Cosma et al., 2007; Vollmar et al., 2006; Wyatt et al., 2004). Die unterschwellige Gefahr eines mit Variolavirus durchgeführten Bioterrorismus-Anschlags ließ das Interesse an MVA als Pockenimpfstoff in der jüngsten Vergangenheit zusätzlich steigen (Wallin et al., 2007).

Da der Block des Replikationszyklus jedoch die Morphogenese betrifft und die vorrausgehende Genexpression gänzlich unbeeinträchtigt bleibt, erscheint MVA darüber hinaus als attraktiver Kandidat eines Vektor-Vakzins zur Immunisierung gegen Fremdgene. 1992 wurde erstmalig die erfolgreiche Expression von inserierten Fremdgenen durch MVA beschrieben (Sutter and Moss, 1992). Später wurde berichtet, dass aufgrund des beträchtlichen Genomverlusts von über 30 000 bp von CVA zu MVA die Integration von Fremd-DNA bis zu 50 000 bp problemlos durchführbar sei (Sutter and Staib, 2003).

Seitdem hat die Forschung mit rekombinantem MVA eine rasante Entwicklung genommen. So konnte auf der einen Seite innerhalb zahlreicher Tierversuche die erfolgreiche Immunisierung gegen u.a. Influenza, das *Respiratory Syncytial Virus* (RSV), die Masern sowie den Erreger der Vogelgrippe, das H5N1-Virus, gezeigt werden (Kreijtz et al., 2007; Stittelaar et al., 2000; Sutter et al., 1994b; Wyatt et al., 1999). Auf der anderen Seite befinden sich bereits einige vielversprechende MVA-basierende Impfvektoren gegen u.a. Malaria, Tuberkulose und verschiedene Subtypen des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) in klinischen Testreihen (Burgers et al., 2008; Chen et al., 2008; Drexler et al., 2004; Gilbert et al., 2006; Kent et al., 2007). Auch in der Tumorthherapie könnte die Behandlung mit rekombinantem MVA sowohl prophylaktisch als auch im Akutstadium bald eine effektive Ergänzung darstellen (Amato, 2007). Hierbei steht in der jüngsten Vergangenheit u.a. der auf rekombinantem MVA basierende Transfer sogenannter Selbstmord-Gene (engl. *suicide genes*) in die Tumorzellen im Vordergrund (Erbs et al., 2008).

2.3 Vacciniavirus *host range* Gene

Gene, deren Expression für das produktive Wachstum einer bestimmten Virusspezies auf bestimmten Zelllinien essentiell notwendig, aber für sich genommen nicht unbedingt hinreichend ist, werden als *host range* (HR) Gene bezeichnet. Die Deletion (*knockout*) derartiger Gene lässt eine zuvor permissive Infektion folglich semipermissiv oder nicht permissiv verlaufen. Eine Spezies kann hierbei für bestimmte Zelllinien HR-Gene aufweisen, die für das Wachstum auf anderen Zelllinien durchaus entbehrlich sind. Ebenso gibt es Beispiele für HR-Gene einer bestimmten Virusspezies, deren homologes Korrelat in einer verwandten Spezies aufgrund des veränderten Gesamtgenoms keine derartige Schlüsselfunktion einnimmt, bzw. nach Deletion kompensiert werden kann.

Die Tabelle 2.3.1 nennt Beispiele bekannter HR-Gene innerhalb von Orthopockenviren.

Virusspezies	Gen	Zelllinie
<i>Vacciniavirus</i>	E3L	HeLa-Zellen; CEF
	K3L	BHK (Babyhamsternierenzellen)
	C12L/SPI-1	A549 (humane Lungenzellen); humane Keratinozyten
	C7L*	Dede (Chinesische Hamsterlungenzellen)
	K1L*	RK-13 (Kaninchennierenzellen)
<i>Kaninchenpockenvirus</i>	SPI-1	PK15 (Schweinenierenzellen); A549
<i>Ectromelievirus</i>	p28	Mäusemakrophagen
<i>Kuhpockenvirus</i>	C9L/CP77 [^]	CHO (Chinesische Hamstereierstockzellen)

Tabelle 2.3.1: Überblick ausgewählter HR-Gene von Orthopockenviren. Für die einzelnen Virusspezies sind jeweils Gene aufgeführt, deren Deletion innerhalb der genannten Zelllinie in einer abortiven Infektion resultiert. *Ein Doppel-*knock-out* von C7L und K1L hat für Vacciniaviren innerhalb der meisten humanen Zelllinien einen Verlust der Replikationsfähigkeit zur Folge. [^]Das CP77 des Kuhpockenvirus entspricht dem VACV-Gen C9L. Verändert nach McFadden, 2005.

Die Produkte der einzelnen HR-Gene verhalten sich biochemisch unterschiedlich, entstehen jedoch in der Regel früh innerhalb des Replikationszyklus. Obgleich die Identifikation von HR-Genen in der Vergangenheit größtenteils zufällig zustande kam, gab es bereits zu Beginn der 80er Jahre Hinweise auf einen veränderten Wirtstropismus von Vacciniaviren nach Spontanmutation (Drillien et al., 1978; Drillien et al., 1981). Bald darauf wurde zunächst das K1L Gen als HR-Gen für das Wachstum von Vacciniaviren auf humanen Zelllinien charakterisiert (Gillard et al., 1985; Gillard et al., 1986). In weiteren Untersuchungen konnte anschließend gezeigt werden, dass das C7L in der Lage ist, die HR-Funktion des K1L innerhalb humaner Zellen zu kompensieren und dass die Expression eines der beiden Gene

für ein produktives Wachstum ausreichend ist. Zusätzlich wurde beschrieben, dass eine Insertion des C9L, das innerhalb aller Vacciniaviren fragmentiert ist und dem Kuhpockenvirus-Gen CP77 entspricht, einen Doppel-*knockout* der Gene K1L und C7L innerhalb von Vacciniaviren substituieren und die Replikationskompetenz auf humanen Zellen wiederherstellen kann (Goebel et al., 1990;Perkus et al., 1990). Bezüglich des CP77 war zuvor bereits eine HR-Funktion für das Kuhpockenvirus innerhalb chinesischer Hamstereierstockzellen (CHO) berichtet worden (Spehner et al., 1988).

Später konnte für das K1L Genprodukt zusätzlich gezeigt werden, dass es in der Lage ist, das Wachstum von MVA innerhalb ursprünglich nicht permissiver Kaninchennierenzellen (RK-13) wiederherzustellen (Carroll and Moss, 1997;Sutter et al., 1994a). Diesen Umstand macht man sich heute bei der Generierung von rekombinanten MVA zu Nutze. Hierbei wird K1L zunächst als Selektionsmarker zusammen mit dem gewünschten Fremdgen in das Genom von MVA inseriert. Im Anschluss erfolgt die Passagierung auf RK-13 Zellen, wobei nur rekombinanten MVA das Wachstum möglich ist (Staib et al., 2000;Staib et al., 2003).

Interessanterweise verfügen C7L, CP77 und K1L zwar alle über der Protein-Protein-Interaktion dienende *ankyrin repeats*, aber darüber hinaus über keine nennenswerten Homologien. Erst in der jüngeren Vergangenheit konnten entscheidende Hinweise auf die molekularen Funktionsmechanismen der drei resultierenden Proteine gewonnen werden. So wurde für K1 eine Inhibition der NF-KB-Aktivierung gezeigt, die wahrscheinlich aus einer Blockade der IKB α -Degradierung resultiert (Shisler and Jin, 2004). Zusätzlich scheint die HR-Funktion des K1L innerhalb verschiedener Zelllinien von unterschiedlichen *ankyrin repeats* abhängig zu sein (Meng and Xiang, 2006).

Demgegenüber wurde für das CP77-Protein kürzlich eine Interaktion mit dem zellulären Protein HMG20A gezeigt, das hierdurch bedingt von viraler DNA disloziert (Hsiao et al., 2006), während für C7L eine Beteiligung an Apoptoseinhibition innerhalb von HeLa-Zellen diskutiert wird (Najera et al., 2006) Zusätzlich konnte unlängst gezeigt werden, dass C7L-verwandte Gene auch für mehrere andere Pockenvirenspezies eine HR-Funktion innerhalb verschiedener Säugerzellen einnehmen (Meng et al., 2008).

Die unterschiedliche Funktion der drei beschriebenen HR-Gene zeigt sich auch darin, dass beispielsweise das C7L den Replikationsphänotyp von VACV nach K1L-Deletion auf RK-13 Zellen nicht wieder herstellen kann (Perkus et al., 1990) und weder die Insertion von K1L noch C7L die CP77-Deletion innerhalb von CHO-Zellen zu kompensieren vermag (Hsiao et al., 2004;Spehner et al., 1988).

Ebenfalls früh wurde die Notwendigkeit des SPI-1 für das Wachstum des Kaninchenpockenvirus (RPV) innerhalb von humanen A549 und PK15 Zellen beschrieben

(Ali et al., 1994). Später konnte die HR-Funktion des Vacciniavirus-SPI-1 (C12L) innerhalb von A549 Zellen und zusätzlich humanen Keratinozyten bestätigt werden (Shisler et al., 1999). Über die zellulären Angriffspunkte des innerhalb der Orthopockenviren stark konservierten SPI-1 und seinen genauen Wirkmechanismus ist man sich jedoch bisher noch weitgehend uneinig. So konnte zunächst für das RPV-SPI-1 in A549 Zellen eine Apoptoseinhibition gezeigt werden (Brooks et al., 1995), sowie eine Komplexbildung mit der Serinprotease Cathepsin G *in vitro* (Moon et al., 1999). In der jüngeren Vergangenheit publizierte Daten sprechen jedoch für eine Bedeutung des RPV-SPI-1 innerhalb der viralen DNA-Replikation (Luttge and Moyer, 2005) bzw. des VACV-SPI-1 innerhalb der intermediären/späten Genexpression (Shisler et al., 1999).

2.4 Die NF-KB-vermittelte Immunantwort

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear factor* κ B) reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die an der Immunantwort einer Zelle auf verschiedenste Stimuli, wie zellulären Stress, Zytokine und Antigene von Krankheitserregern beteiligt sind.

Die NF- κ B-Familie setzt sich aus fünf Mitgliedern zusammen: NF- κ B1, NF- κ B2, RelA (p65), RelB und c-Rel. NF- κ B1 kann hierbei mit 105 kDa bzw. 50 kDa in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen (p105 bzw. p50), wobei das geringere Molekulargewicht (MG) den aktivierten Zustand des Proteins darstellt. Gleiches gilt für NF- κ B2 mit 100 kDa bzw. 52 kDa (p100 bzw. p52). Die fünf Proteine können in verschiedenen Kombinationen Dimere bilden, die entweder als Transkriptionsrepressoren oder –aktivatoren fungieren (Bonizzi and Karin, 2004).

Alle Bestandteile der NF- κ B-Familie tragen eine nukleäre Lokalisationssequenz (NLS), die im Gleichgewichtszustand der Zelle von I κ B-Proteinen gebunden und maskiert werden. Dadurch ist der Gesamtkomplex zunächst zytoplasmatisch lokalisiert.

2.4.1 Der klassische und alternative NF- κ B-Aktivierungsweg

Man unterscheidet die klassische NF- κ B Aktivierungskaskade, die eine Reaktion des angeborenen Immunsystems triggert, von der alternativen Kaskade, die eine Rolle für das erworbene Immunsystem inklusive der Entwicklung lymphatischer Organe spielt. Am Ende beider Wege steht die Translokation des NF- κ B-Dimers vom Zytoplasma in den Zellkern. Die Abbildung 2.4.1 stellt die beiden Kaskaden schematisch gegenüber.

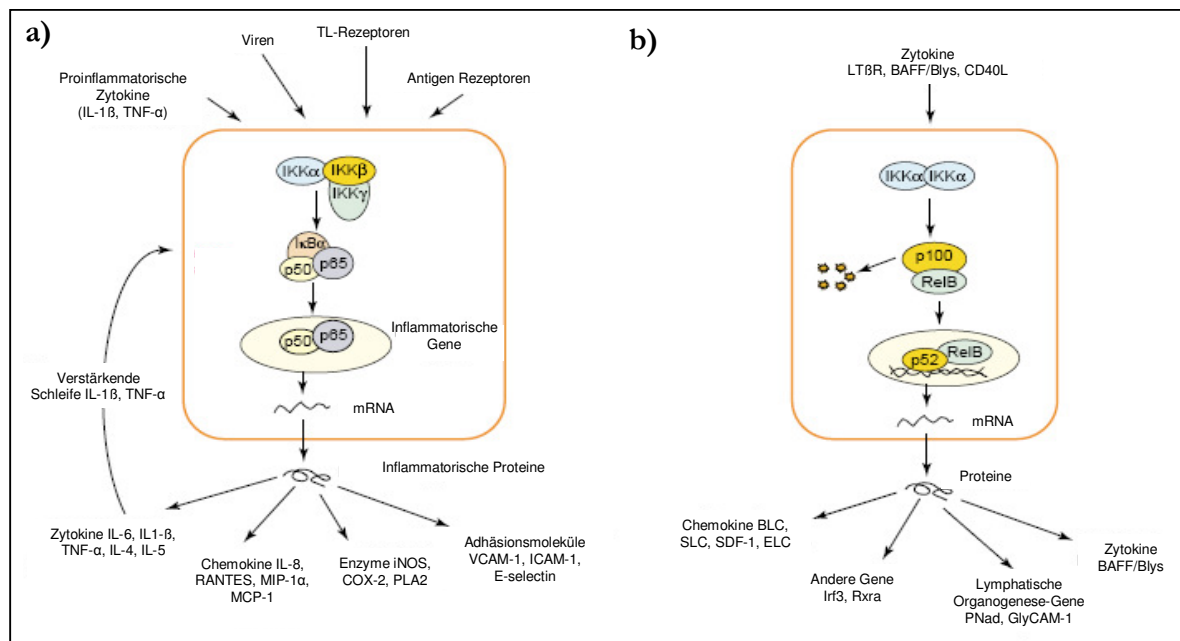


Abbildung 2.4.2: Klassische und alternative NF- κ B-Aktivierungskaskade. Der in **a)** dargestellte klassische Aktivierungsweg kann durch eine ganze Reihe von Stoffen ausgelöst werden, u.a. virale und bakterielle Antigene. Da die durch aktiviertes NF- κ B verstärkter transkribierten Gene teilweise selbst als Aktivatoren fungieren können, kommt es im Verlauf zu einer sich selbst verstärkenden Schleife. Der alternative Aktivierungsweg in **b)** ist im Vergleich zum klassischen vollständig unabhängig von IKK β und IKK γ ; der IKK-Komplex besteht aus einem IKK α -Homodimer. Ebenfalls ist hier kein inhibitorisches I κ B vorhanden. Das NLS des NF- κ B-Komplexes ist Bestandteil des p52 und innerhalb des p100 noch maskiert. Während der klassische Aktivierungsweg auf die Rekrutierung und Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems abzielt, spielen die Produkte des alternativen Weges eine zentrale Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung sekundärer lymphatischer Organe. Verändert nach Bonizzi & Karin, 2004.

Der klassische Aktivierungsweg wird durch proinflammatorische Zytokine oder *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) ausgelöst, die z.B. an den TNF- α - (Tumornekrosefaktor- α -) Rezeptor oder Mitglieder der TL-/IL-1 (*toll like/interleukin-1*)-Rezeptor-Superfamilie binden. Beispielsweise erkennt der TL-Rezeptor 3 virale, doppelsträngige RNA. Sind diese Rezeptoren besetzt, kommt es über verschiedene Zwischenstufen zu einer Aktivierung des IKK-(IKB-Kinase-) Komplexes, der für den klassischen Weg aus den Subtypen IKK α , IKK β und IKK γ besteht. Dieser Komplex phosphoryliert in der Folge die IKBs, wodurch deren

Ubiquitinierung mit anschließender Degradierung eingeleitet wird. Das freigewordene NLS sorgt für die Translokation des NF- κ B-Komplexes in den Zellkern, wo er an die DNA bindet und die Transkription immunregulatorischer Gene, die u.a. für Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle codieren (Ghosh et al., 1998), beeinflusst. Innerhalb des klassischen Weges besteht der Komplex vorwiegend aus dem Dimer p50/p65.

Der alternative Aktivierungsweg dagegen wird ebenfalls durch TNF-Rezeptoren ausgelöst, nicht jedoch durch TNF- α selbst. In diesem Fall besteht der IKK-Komplex lediglich aus einem IKK- α -Homodimer, der in der Folge ein im Komplex mit RelB befindliches p100 c-terminal prozessiert und es somit in seine aktivierte Form (p52) überführt (Mordmuller et al., 2003). Das hierdurch freigewordene NLS des p52 sorgt wiederum für eine Translokation des p52/RelB-Komplexes in den Zellkern, wo er die Transkription bestimmter Gene reguliert (Dejardin et al., 2002).

2.4.2 Vacciniavirale Modifikation des NF- κ B-Systems

Angesichts der immensen Bedeutung vor allem des klassischen NF- κ B-Aktivierungswegs für die Abwehr viraler Infektionen, aber auch für Zellproliferation und Apoptose, ist es kaum verwunderlich, dass zahlreiche Viren Strategien entwickelt haben, um die einzelnen Signalwege auf unterschiedlichste Weise zu modulieren (Lisowska and Witkowski, 2003).

Bekannte vacciniavirale Vertreter, die innerhalb der NF- κ B-Signalkaskaden angreifen, sind u.a. die Proteine N1 und K1 (siehe 2.3).

N1 fungiert zusätzlich als Apoptoseinhibitor (siehe 2.5.2) und ist folglich ein wichtiger Virulenzfaktor. Es setzt die TNF- und Toll/IL-1-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion herab, indem es die Aktivität des IKK-Komplexes durch direkte Interaktion inhibiert (DiPerna et al., 2004).

Darüber hinaus konnte mit dem innerhalb des MVA Genoms deletierten M2L vor kurzem ein weiteres NF- κ B-inhibitorisches Gen identifiziert werden (Gedey et al., 2006). Hierbei wurde beschrieben, dass die durch eine MVA-Infektion induzierte NF- κ B-Aktivierung innerhalb von humanen 293T-Zellen von der MEK-2(MAP-ERK-Kinase)-vermittelten Phosphorylierung von ERK-2 (*extracellular signal-regulated kinase*) abhängig ist. Demgegenüber zeigte sich die ERK-2 Phosphorylierung jedoch nach Infektion mit einer MVA-Mutante, in deren Genom das M2L-Gen (re)inseriert worden war, signifikant erniedrigt. Daraus folgend vermuten Gedey et al., dass M2L die Kinase-Aktivität von MEK-2 verhindert, wobei der molekulare Mechanismus noch unbekannt ist. Ebenso sind die Abläufe, die stromaufwärts zwischen Infektion und der

MEK-2 Aktivierung liegen bislang noch ungeklärt. Die Abbildung 2.4.3 zeigt ein Modell der MVA-induzierten NF- κ B-Aktivierung sowie der M2L-vermittelten NF- κ B-Inhibition.

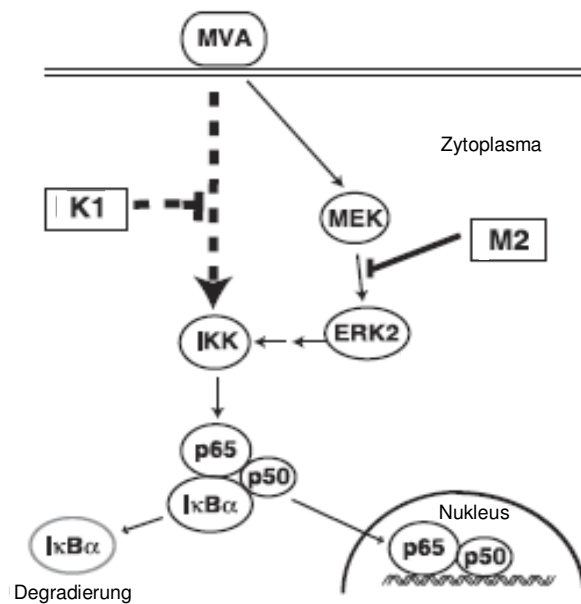


Abbildung 2.4.3: Schema der MVA-induzierten NF- κ B-Aktivierung. Nach Infektion mit MVA erfolgt über unbekannte Zwischenstufen die Aktivierung der MEK-2, die in Abwesenheit von M2 ERK-2 phosphoryliert. ERK-2 aktiviert wiederum den IKK-Komplex, woraufhin die Kaskade in den klassischen Aktivierungsweg mündet (siehe Abbildung 2.4.2). Während M2 die MEK-vermittelte Phosphorylierung von ERK2 inhibiert, verhindert K1 die Aktivierung von NF- κ B auf einem anderen, ERK-2-unabhängigem Weg. Verändert nach Gedey et al., 2006.

2.5 Der programmierte Zelltod (Apoptose)

In jedem Organismus werden täglich eine Vielzahl von beschädigten oder verloren gegangenen Zellen durch neu gebildete ersetzt. Hierbei gilt es, den Zelltod durch Nekrose vom zahlenmäßig überwiegenden programmierten Zelltod (Apoptose) abzugrenzen. Die Nekrose ist der pathologische Untergang einzelner oder mehrerer Zellen und erfolgt, wenn das betreffende Gewebe derart stark geschädigt ist, dass keine kontrollierte Apoptose mehr möglich ist. Die Apoptose dagegen ist ein physiologischer Vorgang und hat auch für die Embryonalentwicklung verschiedener Organe, beispielweise über den gezielten Untergang der Interdigitalhäute an den Händen, eine grundlegende Bedeutung.

Zu den charakteristischen Prozessen innerhalb einer apoptotischen Zelle zählt u.a. die spezifische Spaltung von essentiellen Funktionsproteinen wie Aktin, Laminin und DNA-Reparaturenzymen. Hierfür verantwortlich ist die Familie der zuvor inaktiven Caspasen (Cysteinylnyl-Aspar α yl-Proteasen), die im aktivierten Zustand mehrere hundert zelluläre Substrate schneiden (Thornberry, 1998). Man unterscheidet Initiator-Caspasen, wie die Caspasen-8, -9

und -10, von Effektor-Caspasen, wie den Caspasen-3, -6 und -7. Bevor die Effektor-Caspasen ihre zellulären Substrate spalten können, müssen sie zunächst durch die Initiator-Caspasen mittels proteolytischer Prozessierung aktiviert werden.

2.5.1 Intrinsischer und extrinsischer Aktivierungsweg

Die zahlreichen Stimuli, die zu apoptotischen Prozessen führen können, lassen sich zwei grundsätzlichen Aktivierungswegen zuordnen. Die rezeptorabhängige (extrinsische) Kaskade auf der einen Seite lässt sich vom intrinsischen Signalweg abgrenzen, der durch zahlreiche intrazelluläre Ereignisse eingeleitet werden kann, die unter den Überbegriff „zellulärer Stress“ fallen (Adams, 2003).

Zu den mit dem extrinsischen Signalweg assoziierten Todesrezeptoren (engl.: *death receptors*) zählen u.a. TNF-Rezeptoren wie der Fas/CD95-Rezeptor (Ashkenazi and Dixit, 1998). Durch die Bindung des Fas-Liganden wird die Trimerisierung der Rezeptoren mit nachfolgender Rekrutierung des Adapterproteins FADD (*Fas associating protein with death domain*) ausgelöst. Innerhalb des hierdurch gebildeten DISC (*death inducing signaling complex*) bindet FADD Monomere der Initiator-Caspase 8, die aufgrund der entstandenen räumlichen Nähe dimerisieren und dadurch aktiviert werden (Boatright et al., 2003). Über eine proteolytische Spaltung induziert die Caspase 8 anschließend die Aktivierung von Effektor-Caspasen. Alternativ kann das apoptotische Signal über den mitochondrialen Weg zusätzlich verstärkt werden, indem die Caspase 8 das BH3-only Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) spaltet, das in der Folge die Freigabe von Cytochrom C aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol induziert (Wang, 2001).

BH3-only Proteine zählen zur Bcl (*b-cell lymphoma*)-2 Familie apoptoseregulativer Proteine. Bcl-2 selbst sowie vier verwandte Proteine sind hierbei antiapoptotisch, während die BH3-only Proteine sowie Bak und Bax (Bcl-2 assoziiertes Protein x) proapoptotische Funktionen ausüben. In einer nicht apoptotischen Zelle ist das Bcl-2 Protein als integrales Membranprotein der äußeren Mitochondrienmembran auf deren zytoplasmatischer Seite lokalisiert (Cory and Adams, 2002), wo es die Oligomerisierung von Bak und Bax verhindert (Mikhailov et al., 2001). Während Bak in der gesunden Zelle ebenfalls ein Membranprotein des Mitochondriums ist, befindet sich das nah verwandte Bax zunächst im Zytosol.

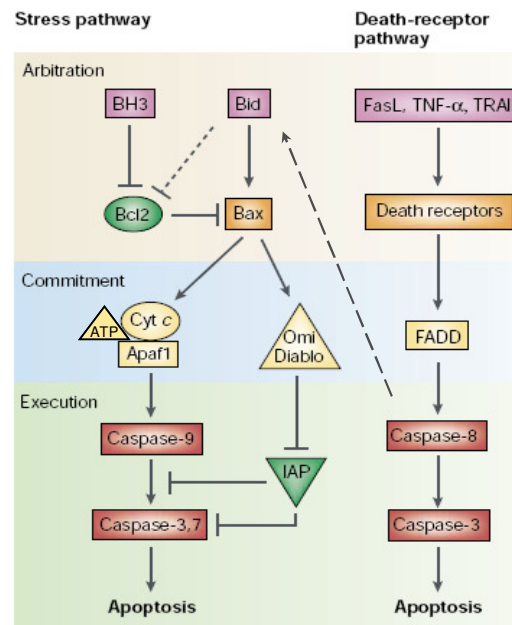
Die BH3-only Proteine sind in einer gesunden Zelle ebenfalls innerhalb anderer Zellkompartimente lokalisiert. Der intrinsische Apoptoseweg wird nach entsprechenden Stimuli durch eine Translokation der BH3-only Proteine zu den Mitochondrien eingeleitet, wo

sie vermutlich antiapoptotische Proteine antagonisieren bzw. Bak direkt aktivieren (Chen et al., 2005; Kuwana et al., 2005).

In der Folge kommt es zur Konformationsänderung mit anschließender Oligomerisierung von Bak und Bax in der äußeren Mitochondrienmembran (Griffiths et al., 1999; Nechushtan et al., 2001). Diese wird daraufhin durchlässig für Cytochrom C, das zuvor als Enzym der Atmungskette innerhalb des Intermembranraums lokalisiert war. Zytosolisches Cytochrom C bindet nachfolgend an Apaf-1 (Apoptose-Proteasen aktivierender Faktor), dessen Affinität für das Nukleotid dATP/ATP sich dadurch erhöht (Jiang and Wang, 2000). Die Bindung des Nukleotids fungiert als Trigger für die Oligomerisierung des Apaf-1—Cyt C—dATP/ATP-Komplexes und damit die Bildung des Apoptosoms (siehe Abbildung 2.5.1). Das Apoptosom rekrutiert in der Folge die Initiator-Caspase 9, wodurch diese in der Lage ist, Effektor-Caspasen wie die Caspase 3 proteolytisch zu aktivieren.

Cytochrom C ist mit ca. 12 kDa ein relativ kleines Molekül und tritt deshalb bereits nach zufälliger, geringer Schädigung der Mitochondrien in relevanter Menge in das Cytosol aus. Damit es in solchen für die Gesamtzelle unbedenklichen Fällen nicht zur Einleitung der Apoptose kommt, verfügt die Zelle über ein weiteres Sicherheitssystem. So werden die Caspasen 9 und 3 in ihrer Aktivität zunächst zusätzlich durch das IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) gehemmt, das im Fall einer regelhaften Apoptose durch die ebenfalls mitochondrial freigesetzten Proteine Smac/Diablo und Omi/HtrA2 antagonisiert wird. Nach einer geringen Schädigung der mitochondrialen Membran kommt es zwar zur Freisetzung von Cytochrom C, die erheblich größeren Proteine Smac und Omi verbleiben jedoch innerhalb des Mitochondriums, wodurch die Caspasen 9 und 3 in ihrer Aktivität gehemmt bleiben (Chai et al., 2000; Wang, 2001).

a)



b)

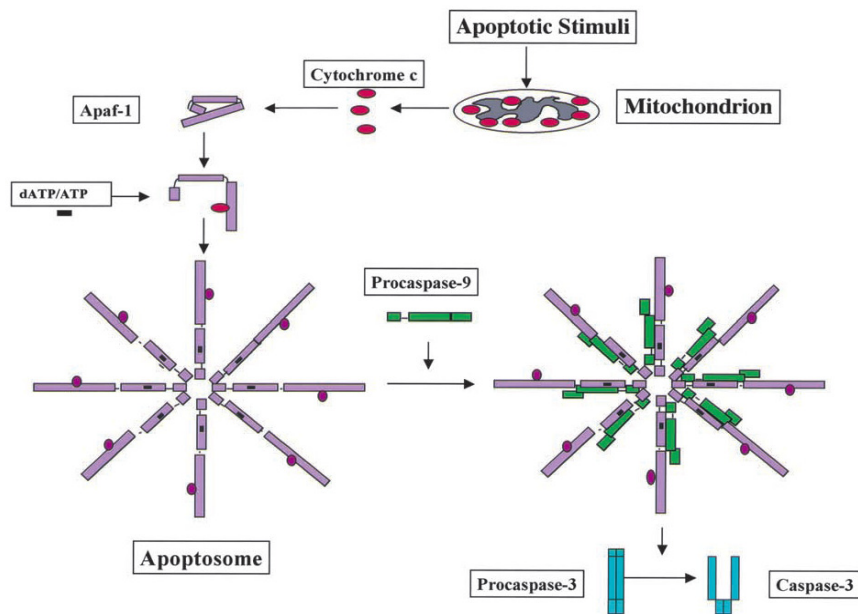


Abbildung 2.5.1: Intrinsische und extrinsische Apoptoseaktivierungskaskade. Die Grafik in **a)** zeigt mit der intrinsischen, Stress-induzierten (*Stress pathway*) und der extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten Signalkaskade (*Death-receptor pathway*) die beiden Hauptwege zur Einleitung von Apoptose. Das Signal des extrinsischen Weges kann zusätzlich durch den intrinsischen Weg verstärkt werden, indem die aktivierte Caspase-8 das BH3-only-Protein Bid aktiviert. Beim Stress-induzierten Signalweg entscheidet der proapoptotische Einfluss der BH3-only-Proteine gegenüber den antiapoptotischen Proteinen wie Bcl2 über die Aktivierung von Bax/Bak an den Mitochondrien (*arbitration* (Schiedsgericht)). In der Folge kommt es nach der Freisetzung von Cytochrom C zur Bildung des Apoptosoms (*commitment*, Einsatz) und zur Aktivierung der Effektorcaspasen (*execution*, Vollzug). Verändert nach Cory & Adams 2002. In **b)** ist die Formierung des Apoptosoms mit anschließender proteolytischer Aktivierung der Caspase-3 im Detail dargestellt. Inaktive Caspasen sind durch den Zusatz „Pro-“, gekennzeichnet. Nach Wang, 2001.

2.5.2 Vacciniavirale Apoptoseinhibition

Während das primäre Ziel einer infizierten Zelle in der Apoptose zum Schutz des Gesamtorganismus besteht, ist umgekehrt für eine effektive Virusreproduktion die Erhaltung der Wirtszelle bis zur Lyse von grundlegender Bedeutung. Fast alle bekannten Viren codieren daher für meist mehrere antiapoptotische Proteine. Mitochondriale Prozesse bilden hierbei aufgrund ihrer zentralen Stellung innerhalb der apoptotischen Kaskaden einen geeigneten Angriffspunkt. Viele DNA-Viren verfügen beispielsweise über Bcl2-homologe Proteine, die eine dem zellulären Bcl2 ähnliche antiapoptotische Funktion ausüben (Cuconati and White, 2002).

Auch die Vacciniaviren codieren für einige Inhibitoren mitochondrial vermittelter Apoptose. So konnte für das innerhalb von MVA konservierte E3L Gen bereits 2003 eine HR-Funktion in für MVA ansonsten hochpermissiven CEF-Zellen gezeigt werden, die zumindest teilweise auf eine antiapoptotische Wirkung des E3L zurückzuführen ist (Hornemann et al., 2003). Ein hemmender Einfluss des E3L auf Apoptose konnte nachfolgend auch innerhalb infizierter HeLa- und MEF-Zellen (*mouse embryonic fibroblasts*) beobachtet werden (Fischer et al., 2006).

Auf molekularer Ebene bindet das E3L u.a. doppelsträngige RNA (dsRNA), die während der viralen Replikation gebildet wird, und schirmt diese gegen zelluläre Enzyme ab. Freie dsRNA induziert die vermehrte Transkription von Noxa, einem proapoptotischen BH3-*only* Protein (Sun and Leaman, 2005). Interessanterweise konnte mit Noxa-defizienten MEF-Zellen gezeigt werden, dass E3L einen Apoptoseweg inhibiert, für den Noxa eine essentielle Rolle spielt. Allerdings sind an der Apoptoseinhibition durch E3L wohl noch weitere, bislang unbekannte Vorgänge beteiligt, da eine Expression des E3L trotz der beschriebenen Zusammenhänge keinerlei Einfluss auf die Transkription von Noxa ausübt (Fischer et al., 2006).

Das ebenfalls innerhalb von MVA konservierte F1L Gen codiert dagegen für einen spezialisierten Apoptoseinhibitor, der in der Lage ist, mit der Fas- und der Staurosporin-induzierten Apoptose zwei unterschiedliche Signalwege zu blockieren (Fischer et al., 2006). F1 ist ausschließlich innerhalb der Mitochondrien lokalisiert (Wasilenko et al., 2003) und vermittelt seine antiapoptotische Wirkung über direkte Interaktion mit der BH3-Domäne von Bak. Hierdurch wird dessen Aktivierung und nachfolgende Komplexbildung mit aktiviertem Bax blockiert, was letztlich die Freisetzung von Cytochrom C verhindert (Postigo et al., 2006). Mit dem Virulenzfaktor N1L, der innerhalb von MVA teilweise deletiert ist (Antoine et al., 1998), verfügen Vacciniaviren über ein weiteres Gen, das neben verschiedenen anderen Funktionen einen inhibitorischen Einfluss auf Apoptose hat. Das Protein N1 weist zwar keine Übereinstimmungen in der AS-Sequenz, jedoch strukturelle und funktionelle Homologien zu

antiapoptischen Proteinen der Bcl2-Familie auf, über die es mit verschiedenen BH3-only Proteinen interagiert (Cooray et al., 2007).

3 Zielsetzung

Die verringerte Replikationsfähigkeit von CVA 386 im Vergleich zu seinem Vorläufer CVA 152 in humanen HeLa Zellen konnte mit Hilfe einer vergleichenden Sequenzanalyse der beiden Genome einer überschaubaren Anzahl von potentiell verantwortlichen Genen zugeordnet werden. Hierzu zählen neben einer Reihe kleinerer Deletionen insbesondere die Gene C12L, C14L, C15L und C16L der Deletion I und die Gene M1L, M2L und der OLR 037 der Deletion II.

Angesichts einer in der Literatur bisher unzureichenden Charakterisierung war es das primäre Ziel dieser Arbeit, die genannten sieben Gene mit Hilfe der Plasmid-Transfektion humaner 293T-Zellen im Hinblick auf ihre Expression, Sekretion und gegebenenfalls posttranslationale Modifikation zu untersuchen. Des Weiteren sollte die subzelluläre Lokalisation der resultierenden Proteine mittels Immunfluoreszenzfärbung Plasmid-transfizierter BHK Zellen studiert werden.

In Abhängigkeit der hierbei gewonnenen Ergebnisse sollten gegebenenfalls weiterführende Experimente hinsichtlich der Funktion der betreffenden Gene durchgeführt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck (Darmstadt)
Acrylamid/ Bisacrylamid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose (Universal-Agarose)	Peqlab (Erlangen)
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ampicillin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
BSA (Rinderserumalbumin)	New England BioLabs (Frankfurt a. M.)
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dianisidine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka (Neu-Ulm)
Formaldehyd (37%)	Merck (Darmstadt)
Gelatine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Lactacystin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Mowiol	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Fluka (Neu-Ulm)
Sucrose UltraPure™	Invitrogen (Karlsruhe)
TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethyldiamid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tween[®] -20

Sigma-Aldrich (Steinheim)

Wasserstoffperoxid

Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

4.1.2 Gebrauchslösungen

Sofern nicht gesondert aufgeführt, handelt es sich bei dem zum Herstellen der Lösungen verwendeten Wasser immer um zyklodestilliertes Wasser.

Ampicillin-Lösung (1000 x)	100 mg/ml in H ₂ O (sterilfiltriert, Lagerung -20°C)
Antikörperlösung Immunfluoreszenz	0,1% (v/v) Triton X-100 5% (v/v) FCS 0,03% (v/v) Natriumazid in PBS
Blockierungslösung Immunfluoreszenz	10% (v/v) FCS in PBS
Dianisidine-Substratlösung	450 µl gesättigte Dianisidine – Lösung (in 100% Ethanol, sterilfiltriert) 15 ml PBS 15 µl H ₂ O ₂ (30%)
Fixier- und Permeabilisierungslösung für die Immunfärbung bei Titrationsen	50% (v/v) Aceton 50% (v/v) Methanol (-20°C)
Fixierlösung Immunfluoreszenz	3,7% Formaldehyd in PBS
Gelatine-Lösung	1 % (v/v) Gelatine in H ₂ O
LB-Medium	Laura-Bertani-Medium, Bakto-Trypton (10 g/l), Bakto Hefe-Extrakt (5 g/l), NaCl (10g/l), pH 7,0; autoklaviert
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Amp-Platten	LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin
Lysispuffer	10% (v/v) NP40 50 mM TrisHCl, pH 7,5 5 mM EGTA, pH 8 150 mM NaCl in H ₂ O
Permeabilisierungslösung Immun- Fluoreszenz	0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS
PBS (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na ₂ HPO ₄ ·7 H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ 800 ml H ₂ O pH 7,4 (bei 20°C) mit HCl einstellen mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
PBS-T	0,1% Tween [®] -20 in PBS
SDS-PAGE-Laufpuffer (10x)	30 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS mit H ₂ O auf 1 L auffüllen
Sucrose-Lösung zum Aufreiningen von Vaccinia Viren	36 % (m/v) Sucrose in 10 mM Tris pH 9 gelöst, sterilfiltriert
TAE-Puffer (20x)	0,32 M Tris 22,84 ml Essigsäure 40 ml EDTA

4.1.3 Verbrauchsmaterial

6- und 12-Loch-Zellkulturplatten	Corning (Kaiserslautern)
Deckgläser	Menzel GmbH (Braunschweig)
Einmalspritzen	Henke Sass Wolf (Tuttlingen)
Einwegküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einwegpipetten (2- 25 ml)	Greiner (Nürtingen)
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
Falcon-Gefäße	Becton Dickinson (New Jersey)
Filterpapiere	Whatman
Glasgefäße	Schott (Mainz)
Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Latexhandschuhe	Braun (Melsungen)
Mikroliterpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Nitrilhandschuhe	Ansell (USA)
Nitrocellulosemembranen	BioRad (München)
Objektträger	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Pipettierhilfen	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Hamburg)
Quarzglasküvetten	Hellma (Mühlheim)
Röhrchen mit Rundboden	VWR International (Darmstadt)
Sterilfilter	Merck (Darmstadt)
Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden)
	Greiner (Nürtingen)

4.1.4 Geräte und Apparaturen

Autoklav	CertoClav (Österreich)
Bakterieninkubator	New Brunswick Scientific (Neu-Isenburg)
Brutschränke BBD 6220	Heraeus Sorvall (Hanau)
Feinwaage XB 160M	Precisa (Schweiz)
Gelelektrophoreseapparaturen	Peqlab (Erlangen)

Horizontalschüttler		Biometra (Göttingen)
		Heidolph (Schwabach)
Kühl-/ Gefrierschränke		Liebherr (Biberach)
		Bosch (Gerlingen)
Kryo-Einfriercontainer		Nalgene (England)
Mikroskope	Axiovert 40C	Zeiss (Oberkochen)
	Axiovert 40CFL	Zeiss (Oberkochen)
	LSM 510 META	Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle		Privileg, Fürth
Odyssey Infrared Imager		Li•cor Biosciences (Bad Homburg)
Photometer Ultraspec 1100pro		Amersham Biosciences (Freiburg)
SDS-Gelelektrophoreseapparaturen		Biorad (München)
Sterilbänke SterilGARDIII Advance ^o		The Baker Company (USA)
Thermomixer comfort		Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallanlage Sonopuls		Bandelin (Berlin)
UV-Detektionsanlage		Intas (Göttingen)
Vakuumpumpe Vacusafe comfort		Integra Biosciences (Schweiz)
Vortex-Apparatur Vortex-Genie 2		Scientific Industries (USA)
Wasserbäder		Memmert (Schwabach)
Zellzähl-Apparatur Z1 Coulter [®] Particle Counter		Beckman Coulter (USA)
Zentrifugen	Biofuge fresco	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Microzentrifuge	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
	Minifuge RF	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Minispin plus	Eppendorf (Hamburg)
	Multifuge1 S-R	Heraeus Sorvall (Hanau)
	Optima [™] L-80 XP Ultracentrifuge	Beckman Coulter (USA)

4.1.5 Zellkulturreagenzien

DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)
EMEM (<i>Eagles Minimum Essential Medium</i>)	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)
FCS	Gibco BRL (Eggenstein)
L- Glutamin	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)
NEA (nicht-essentielle Aminosäuren (AS))	Biochrom AG Berlin
Penicillin/ Streptomycin	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)
RPMI (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>) 1640	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)
Trypsin- EDTA	Cambrex, Bio Whittaker (Belgien)

4.1.6 Beschaffenheit der Zellkulturmedien

Medium	Additiva
DMEM-komplett	15% (v/v) FCS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	90% (v/v) FCS 10% (v/v) DMSO
EMEM-komplett	10% (v/v) FCS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin 1% (v/v) NEA
RPMI-komplett	15% (v/v) FCS 1% (v/v) L-Glutamin 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin

Infektionen der betreffenden Zellen mit Vacciniavirus (VACV) (siehe 4.5.1) wurden jeweils in 2%-FCS-haltigem Medium durchgeführt, wobei die übrigen Bestandteile unverändert blieben.

4.1.7 Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Erläuterungen	Medium	Bezugsnummer
CEF	Hühnerembryofibroblasten (primäre Zellen)	EMEM-komplett	
BHK-21	Baby-Hamsternierenfibroblasten	RPMI-komplett	ATCC CCL-10
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen; modifiziert durch das SV40 large T antigen; Originallinie: 293	DMEM-komplett	ICLC HTL04001

4.1.8 Kommerziell erhältliche Systeme, Kits und Standards

<i>Bradford-Reagenz, Protein Assay</i>	Biorad (München)
<i>Complete Protease Inhibitor tablets</i>	Roche (Mannheim)
<i>FuGENE[®] 6-Transfection Reagent</i>	Roche (Mannheim)
<i>Magic Mark[™] XP Western Protein Standard</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>MEK Inhibitor UO126</i>	Promega (Mannheim)
<i>MitoTracker[®] Red CMXRos</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>NucleoSpin[®] Plasmid</i>	Macherey-Nagel (Düren)
<i>Lipofectamine[™] 2000</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>One Shot[®] Top 10 Chemically Competent E. coli</i>	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>PNGase F + Puffer</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. M.)
<i>Prestained Protein Marker, Broad Range</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. M.)
<i>QIAfilter Plasmid Maxi Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QIAquick[®] Gel Extraction Kit (50)</i>	Qiagen (Hilden)
<i>Restriktionsenzyme</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. M.)
<i>Rhodamine-Phalloidin</i>	Chemicon International (USA)

<i>Roti[®] Load 1 4-fach</i>	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
<i>TPA/ PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate)</i>	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
<i>2-Log DNA Ladder (0,1- 10kb)</i>	New England BioLabs (Frankfurt a. M.)

4.1.9 Plasmide

In untenstehender Tabelle sind alle in dieser Arbeit verwendeten oder entstandenen Plasmide aufgeführt. Die Gene C12L, C14L, C15L, C16L, M1L, M2L und der OLR 037 wurden jeweils codonoptimiert nach Vorlage der Sequenzen aus CVA 152 synthetisiert (GENEART, Regensburg).

Name	Quelle
pcDNA-C12L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-C14L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-C15L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-C16L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-M1L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-M2L-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pcDNA-037-mycHis(+)	GENEART (Regensburg)
pEYFP-Golgi	CLONTECH Laboratories (USA)

4.1.10 Viren

Name	Beschreibung
MVA F6	MVA-Wildtypvirus; Isolat F6

Die Viren wurden bei -80°C gelagert.

4.1.11 Antikörper

Primäre Antikörper

Name, Spezies	Verwendung	Verdünnung	Bezugsquelle
anti- β -Aktin, Maus	WB	1:10 000	Sigma-Aldrich (Steinheim)
anti-aktive Caspase-3 PE (direkt gekoppelt)	FACS	(20 μ l/10 ⁶ Zellen)	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-His Epitop tag Kaninchen	WB	1:10 000	Acris Antibodies (Hiddenhausen)
anti-myc tag, Maus	IF FACS	1:250 1:250	BD Biosciences (Heidelberg)
anti-phospho- p44/42 MAP Kinase, Kaninchen	WB	1:1 000	Cell Signaling (Danvers)
anti-p44/42 MAP Kinase, Kaninchen	WB	1:1 000	Cell Signaling (Danvers)
anti-Vacciniavirus, Lister Stamm, Kaninchen	IF	1:2 000	Acris Antibodies (Hiddenhausen)

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot.

Sekundäre Antikörper

Name	Kopplung	Verwendung	Verdünnung	Bezugsquelle
anti- Kaninchen	IRDye 680	WB	1:15 000	Li•cor Biosciences (USA)
anti- Kaninchen	FITC	IF	1:200	Dianova (Hamburg)
anti-Maus	IRDye 800	WB	1:15 000	Li•cor Biosciences (USA)
anti-Maus	Cy3	IF	1:100	Jackson Immuno Researches (UK)

Name	Kopplung	Verwendung	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-Maus	Cy5	IF	1:500	Jackson Immuno Researches (UK)
anti-Maus	FITC	IF	1:100	Jackson Immuno
		FACS	1:100	Researches (UK)

FACS: *Fluorescence activated cell sorting*; IF: Immunfluoreszenz; WB: Western Blot.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierungsbedingungen von Zelllinien

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zellkulturtechniken wurden mit sterilen Medien und Reagenzien unter der Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte stets im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% relativer Luftfeuchtigkeit mit dem jeweils zugehörigen Medium (siehe 4.1.7).

4.2.2 Passagierung adhärenter Zellen

Die Teilung der Zellen in Verhältnissen von 1:5 bis 1:30 erfolgte in der Regel zum Zeitpunkt von 90% Konfluenz. Auf Absaugen des Mediums folgte einmaliges Waschen mit PBS und anschließende Zugabe von 4 ml (T-175er Zellkulturflasche) Trypsin-EDTA. Nach kurzer Inkubation bei Raumtemperatur folgte der Zusatz von 6 ml des jeweiligen Mediums mit anschließender Resuspension. Das dem gewünschten Teilungsverhältnis entsprechende Volumen wurde danach entnommen, in frische Zellkulturflaschen überführt und mit dem zugehörigen Medium auf 35 ml pro Flasche aufgestockt.

Im Falle von CEF-Zellen wurden nur primäre oder sekundäre Zellen für Experimente verwendet.

4.2.3 Kultivierung adhärenter Zellen in 6- und 12-Loch-Zellkulturplatten

Zwecks Transfektionen oder Infektionen mit nachfolgender Western Blot-Analyse wurden 293T Zellen je einen Tag zuvor in 6-Loch-Zellkulturplatten (Corning, Kaiserslautern) ausgesät. Die Anzahl ausgesäter Zellen betrug jeweils zwischen $1,6 \cdot 10^6$ und $3 \cdot 10^7$ Zellen pro Platte, wobei die Konzentration der zuvor erstellten Zellsuspension mithilfe der Zellzähl-Apparatur Z1 Coulter® Particle Counter (Beckman Coulter, USA) bestimmt wurde. Das der gewünschten Zellzahl entsprechende Volumen wurde entnommen, mit frischem DMEM-Medium auf 12 ml ergänzt und danach gleichmäßig auf die Löcher der Zellkulturplatten verteilt.

Für die Transfektion mit nachfolgender Durchflusszytometrie wurden BHK-Zellen ebenfalls einen Tag zuvor in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Die Anzahl ausgesäter Zellen betrug pro

Platte 1,3 ml der 10 ml-Zellsuspension einer konfluenten T-175er Flasche. Das entnommene Volumen wurde mit frischem, Antibiotika-freien RPMI-Medium auf 12ml ergänzt und im Anschluß gleichmäßig auf die Löcher der Zellkulturplatten verteilt.

Zur Transfektion oder Infektion von BHK-Zellen mit anschließender Laserscan Mikroskopie wurden zunächst sterilisierte 15x15 mm Deckgläser (Menzel GmbH, Braunschweig) in 12-Loch-Zellkulturplatten ausgelegt, mit 1%iger Gelatine-Lösung überschichtet und für 30 min bei RT inkubiert. Im Anschluss konnten die Zellen auf den beschichteten Deckgläsern ausgesät werden. Es wurden jeweils zwischen 0,8 und 1,1 ml der 10 ml-Zellsuspension einer konfluenten T-175er Flasche entnommen, mit frischem, Antibiotika-freien RPMI-Medium auf 12 ml ergänzt und nach Durchmischen auf eine 12-Loch-Zellkulturplatte verteilt. Die Gelatine sorgte hierbei für ein verbessertes Haften der Zellen an den Deckgläsern während der späteren Färbungsprozedur. 24 h später konnten die Zellen gemäß 1.1.1 transfiziert werden.

4.2.4 Kryokonservierung eukaryontischer Zellen

Die Zellen einer subkonfluenten T-175-Zellkulturflasche wurden mittels Trypsinierung geerntet und durch 5-minütige Zentrifugation bei 1500 U/min (Umdrehungen pro Minute) und 4 °C sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml Einfriermedium (siehe 4.1.6) resuspendiert und anschließend in ein Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt. Über Nacht (ÜN) wurde das Kryoröhrchen innerhalb einer Kryobox bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur langfristigen Lagerung in einen Stickstofftank transferiert.

4.2.5 Auftauen kryokonservierter eukaryontischer Zellen

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde die Zellsuspension innerhalb des Kryoröhrchens zunächst kurz bei 37°C erwärmt und nachfolgend in ein mit 10 ml Medium gefülltes Falcon-Gefäß (Becton Dickinson, New Jersey) pipettiert. Dieses wurde im Anschluss 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert um danach das giftige DMSO entfernen zu können. Das entstandene Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Am nächsten Tag wurde ein zusätzlicher Mediumwechsel durchgeführt.

4.2.6 Transiente Transfektion eukaryontischer Zellen

Zur Transfektion eukaryontischer Zellen mit Expressionsplasmiden wurde das *FuGENE*[®] *Transfection Reagent* (Roche, Mannheim) beziehungsweise *Lipofectamine*[™] 2000 (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt.

Die Transfektion für die spätere *Western Blot*-Analyse erfolgte mittels *FuGENE Transfection Reagent* auf 6-Lochplatten. Im ersten Schritt wurden 94 µl serumfreies Medium mit 6 µl *FuGENE* vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte im zweiten Schritt die Zugabe von 2 µg DNA. An kurzes Durchmischen (vortexen) mithilfe der *Vortex-Apparatur Vortex-Genie 2* (Scientific Industries, USA) schloss sich eine weitere 15-minütige Inkubation bei RT an. Hiernach konnte die Transfektions-Reagenz-DNA-Mischung im letzten Schritt auf den subkonfluenten Zellrasen einer 6-Loch-Platte gegeben werden bevor die 24- 48 stündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂ und 90% relative Luftfeuchtigkeit) erfolgte.

Die Transfektion von Zellen für spätere Laserscan Mikroskopie erfolgte mithilfe des *Lipofectamine*[™] 2000 –Reagenz. Hierfür wurden die Zellen einen Tag zuvor in Antibiotika-freiem Medium auf Deckgläschen innerhalb von 12-Loch-Platten ausgesät. Zunächst wurden 4 µl Transfektions-Reagenz und 1,6 µg DNA in getrennten Eppendorf-Gefäßen mit je 100 µl serumfreien Mediums fünf Minuten bei RT inkubiert und anschließend vereinigt. Nach erneuter 20-minütiger Inkubation bei RT folgte das Tröpfeln des Transfektions-Reagenz-DNA-Gemischs auf den Zellrasen und danach die 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Hierbei wurde 4 h nach Zugabe der Transfektionslösung und am nächsten Morgen jeweils ein Mediumwechsel mit frischem, Antibiotika-freiem Medium durchgeführt.

Die Transfektion von Zellen mit nachfolgender Durchflusszytometrie wurde ebenfalls mit dem *Lipofectamine*[™] 2000 –Reagenz durchgeführt. Die Zellen wurden einen Tag zuvor in Antibiotika-freiem Medium innerhalb von 6-Loch-Platten ausgesät. 10 µl Transfektions-Reagenz und 4 µg DNA wurden in getrennten Eppendorf-Gefäßen mit je 250 µl serumfreien Mediums fünf Minuten bei RT inkubiert und vereinigt. Im Anschluss an eine erneute 20-minütige Inkubation bei RT wurde das Transfektions-Reagenz-DNA-Gemisch auf die Zellen gegeben. Es folgte die 18-stündige Inkubation bei 37°C mit je einem Mediumwechsel 4 h nach Zugabe der Transfektionslösung sowie am nächsten Morgen.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Bestimmung der DNA-Konzentration per Absorptionsspektrometrie

Um die DNA-Konzentration verschiedener Proben zu messen, wurden zunächst 1:100 Verdünnungen hergestellt. Nachfolgend wurde im Spektralphotometer *Ultrospec 1100pro* (Amersham Biosciences, Freiburg) die Absorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nucleinsäuren) bestimmt. Die DNA-Konzentration ließ sich aus der Absorption bei 260 nm, der Verdünnung und einem für Nucleinsäuren spezifischen Multifiktionsfaktor nach folgender Formel ableiten:

$$[\text{dsDNA}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Anhand des Verhältnisses von A_{260} zu A_{280} lies sich außerdem das Maß an Proteinverunreinigung abschätzen; für proteinfreie Lösungen sollte dieser Quotient zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4.3.2 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsenzyme (-endonukleasen) sind in der Lage, DNA innerhalb einer bestimmten Erkennungssequenz, die oft palindromisch aufgebaut ist, zu schneiden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und Reaktionspuffer stammten von der Firma New England BioLabs (Frankfurt a. M.). Hierbei wurde jeweils folgender Reaktionsansatz erstellt:

$$\begin{array}{r} 1 \mu\text{g DNA} \\ 2 \mu\text{l NEB-Puffer (10 x)} \\ 1 \mu\text{l Restriktionsendonuklease} \\ X \mu\text{l H}_2\text{O}_{\text{zyklodest.}} \\ \hline 20 \mu\text{l} \end{array}$$

Einige Enzyme erforderten die Zugabe von BSA (1:10) zum Reaktionsansatz, in diesem Fall wurde entsprechend weniger $\text{H}_2\text{O}_{\text{zyklodest.}}$ hinzugefügt. Der Ansatz wurde jeweils einer Inkubation von 2 h bei dem Temperaturoptimum der Endonuklease unterzogen.

4.3.3 DNA-Agarosegel-Elektrophorese

Biochemische Grundlage für die DNA-Größenfraktionierung in der Agarosegel-Elektrophorese ist die negative Ladung der Phosphatreste innerhalb der DNA. Im elektrischen Feld bewegen sich lineare DNA-Fragmente folglich zum Plus-Pol (Anode). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist hierbei unter anderem von der Porengröße des Gels und der Größe der zu analysierenden DNA abhängig. Die Porengröße korreliert mit dem prozentualen Anteil von Agarose im Gel; je größer der Anteil, desto kleiner die Poren. Im Rahmen dieser Arbeit kamen 1 %ige (m/v) Agarosegele zur Anwendung. Die entsprechende Menge an Agarose (Peqlab, Erlangen) wurde in TAE-Puffer (1X) in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sie vollständig gelöst war. Anschließend wurde die Lösung in den Gelschlitten gegossen und der Kamm eingepasst. Sobald das Gel vollständig erstarrt war, wurde der Schlitten in die Elektrophoresekammer überführt und mit TAE-Puffer bedeckt. Nachdem die mit einem DNA-Farbmarker vermischten Proben sowie der 2 Log DNA-Größenmarker (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) auf das Gel aufgetragen waren, schloss sich die elektrophoretische Auftrennung bei Spannungen zwischen 90 und 120 Volt an. Nachfolgend wurde das Gel für 5 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (5 µg/ml) gefärbt und im Wasserbad wieder entfärbt. Im Anschluss konnte das Gel unter UV-Licht in der UV-Detektionsanlage (Intas, Göttingen) ausgewertet und fotografiert werden.

4.3.4 Elution von DNA aus einem Agarosegel

Um DNA aus Agarosegelen zu isolieren wurde das betreffende Gelstück zunächst mit einem sauberen Skalpell exzidiert. Zur anschließenden Extraktion wurde das *QIAquick® Gel Extraction Kit (50)* (Qiagen, Hilden) den Angaben des Herstellers folgend eingesetzt. Die Elution erfolgte in 30 µl H₂O_{zyklodest.}

4.3.5 Transformation mittels Hitzeschock

Zur Transformation von *One Shot® TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen, Karlsruhe) nach dem Hitzeschock-Verfahren wurden 100 ng gereinigte Plasmid-DNA zu 100 µl E.coli gegeben und anschließend 30 min auf Eis gelagert. Nachfolgend wurde für 90 sek bei 42°C ein Hitzeschock durchgeführt worauf erneut für 2 min auf Eis inkubiert wurde. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Ansatz einer 45-minütigen Inkubation bei 37°C und 800 U/min im Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg) unterzogen. Es folgte eine

Zentrifugation bei 8000 U/min und RT, woraufhin 400 µl des erhaltenen Überstands verworfen, und das Zellpelett in den verbliebenen 200 µl wieder aufgenommen wurde. Jeweils 100 µl der entstandenen Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und anschließend ÜN bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag konnten *E. coli*-Klone, die über Nacht auf der Platte gewachsen waren, in einer Mini- bzw. Maxi-Präparation weiterverarbeitet werden.

4.3.6 Plasmid-DNA Mini-Präparationen

Die Mini-Präparation dient der Isolierung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen von transformierten *Escherichia coli*-Einzelklonen (siehe 4.3.5). Hierfür wurde das *NucleoSpin® Plasmid Kit* (Macherey-Nagel, Düren) gemäß den Herstellerangaben verwendet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl H₂O_{zyklodest.} eluiert.

4.3.7 Plasmid-DNA Maxi-Präparationen

Analog der Mini-Präparation (siehe 3.2.2.7) dient auch die Maxi-Präparation der Gewinnung von Plasmid-DNA aus Flüssigkulturen von transformierten *E. coli*- Einzelklonen, allerdings in wesentlich größerer Dimension. Das *QIAfilter Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden) kam dem Herstellerprotokoll entsprechend zur Anwendung. Das resultierende DNA-Pelett wurde in 300 µl H₂O_{zyklodest.} aufgenommen.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Western Blot zur Analyse der Genexpression

4.4.1.1 Filtrieren des Überstandes

Um den Zell-Überstand transfizierter Zellen auf sekretorische Proteine untersuchen zu können, wurde dieser mit einer Einmalspritze (Henke Sass Wolf, Tuttlingen) abgenommen und anschließend sterilfiltriert. Dies geschah, um abgeschwommene Zellen aus dem Überstand zu entfernen. Bis zur Auswertung in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde der Überstand bei 4°C aufbewahrt bzw. langfristig bei -80°C gelagert.

4.4.1.2 Herstellung von Zelllysaten

Für die Isolierung und nachfolgende Analyse intrazellulärer Proteine wurden Lysate der in 6-Loch-platten kultivierten Zellen erstellt. Hierzu wurden diese zunächst trypsiniert. Die Trypsin-Zellsuspension wurde nachfolgend in PBS aufgenommen und 5 min bei 4°C und 1500 U/min zentrifugiert. Der hierdurch entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpelett in 150 µl Lysispuffer + *Complete Protease Inhibitor* (Roche, Mannheim) resuspendiert. Es folgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 15 min bei 4°C und 15 000 U/min, um Zelltrümmer von Proteinen zu trennen. Im weiteren Verlauf wurde das Pelett verworfen und die Proteinkonzentration des erhaltenen Überstands bestimmt (siehe 1.1.1.1).

4.4.1.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Die Bestimmung des Proteingehalts der Zellysate geschah in folgendem Ansatz:

200 μl *Bradford Reagenz* (Biorad, München)
800 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{zyklodest.}}$
5 μl Proteinlösung

Mittels Spektralphotometer wurde die Absorption der Mischung bei 595 nm gemessen. Die Absorption nach Zugabe von 5 μl Lysispuffer wurde hierbei als Nullwert definiert. Die zugehörige Gesamtproteinkonzentration wurde anhand einer mit 0,1 bis 5 μg BSA (New England BioLabs, Frankfurt a. M.) angefertigten Eichgerade ermittelt.

4.4.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Analyse im SDS-Polyacrylamid-Gel wurde das der gewünschten Proteinmenge entsprechende Volumen vorgelegt und mit 1:3 mit reduzierendem SDS-Ladepuffer *Roti[®] Load 1 4-fach* (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) ergänzt. Im Anschluss wurde die Lösung für 3 min bei 99 °C inkubiert.

Analog der Agarosegel-Elektrophorese (siehe 3.3.4) dient auch die SDS-PAGE der größenspezifischen Auftrennung von Molekülen im elektrischen Feld. Hierbei überdeckt das SDS (*sodium dodecylsulfate*) die Eigenladung der Proteine durch eine konstant negative Ladung und macht dadurch deren Wanderung zur Anode von ihrer jeweiligen ASn-Zusammensetzung unabhängig. Die Polyacrylamid-Gele setzten sich aus je einem Trenngel und einem Sammelgel zusammen, wobei der Polyacrylamid-Anteil (Prozentigkeit) des Trenngels in Abhängigkeit von der erwarteten Größe der zu analysierenden Proteine gewählt wurde. In dieser Arbeit kamen 10 und 12%ige Gele zur Anwendung. Die Bestandteile der Gele setzten sich wie folgt zusammen:

Ansatz für ein 5%iges Sammelgel (≈ 5 ml):

Komponente	Volumen (ml)
H ₂ O	3,4
30% Acryl/Bisacrylamid (29:1)	0,83
1,5M Tris (pH6,8)	0,63
10% SDS	0,05
10% APS	0,05
TEMED	0,005

Ansatz für ein 10%iges Trenngel (≈ 10 ml)

Komponente	Volumen (ml)
H ₂ O	4,0
30% Acryl/Bisacrylamid (29:1)	3,3
1,5M Tris (pH8,8)	2,5
10% SDS	0,1
10% APS	0,1
TEMED	0,004

Zwecks abweichender Prozentigkeit des Trenngels wurde das Volumen der Acryl/Bisacrylamid-Mischung entsprechend verändert und im Austausch die Menge an zugegebenem H₂O angepasst.

Die Elektrophorese erfolgte bei 90-120 V und wurde beendet, sobald sich die mit Bromphenolblau markierte Lauffront der unteren Gelkante näherte.

4.4.1.5 Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran

Der Transfer der zu untersuchenden Proteine auf eine Membran geschieht, um diese auf einen mechanisch stabileren Träger zu überführen und um sie für die nachfolgende Antikörperdetektion zugänglich zu machen.

Der in dieser Arbeit verwendete *Semidry-Blot* ist in der Abbildung 4.4.1 schematisch dargestellt.

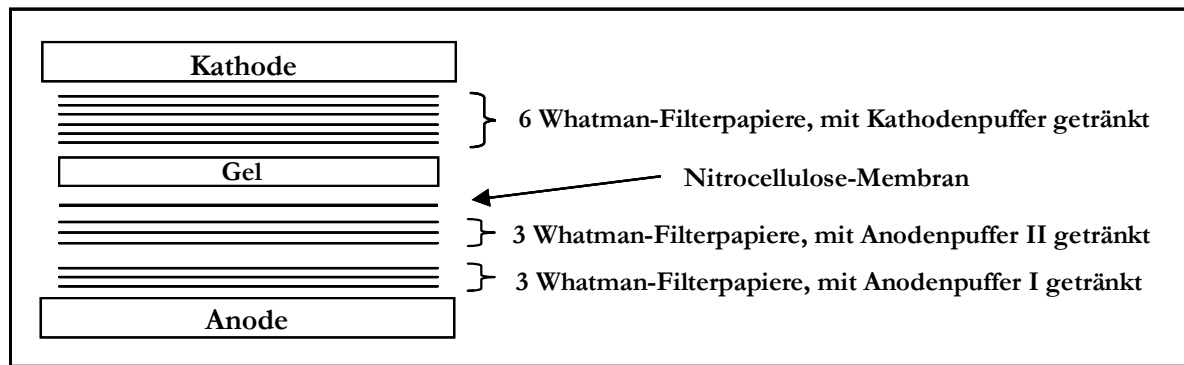


Abbildung 4.4.1: Schematischer Aufbau eines *Semidry*-Blots. Das orthogonal zum Polyacrylamid-Gel angelegte elektrische Feld sorgt für den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran.

Der Proteintransfer erfolgte bei 100 mA über 1 h. Danach wurde die Membran für einige Minuten in PBS gewaschen und im Anschluss 1 h bei RT mit Blockierungs-Puffer (Li cor Biosciences, Bad Homburg) inkubiert, um potentielle unspezifische Bindungsstellen der Antikörper (AK) zu eliminieren. Das Blockieren und alle im Folgenden beschriebenen Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten jeweils unter Schwenken auf dem Horizontalschüttler (Biometra, Göttingen). Nachfolgend wurde die Membran ÜN bei 4°C mit dem jeweiligen primären AK behandelt, der zuvor in Blockierungslösung +0,1 % (v/v) Tween[®]-20 verdünnt worden war. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst 3-mal jeweils 5 min mit PBS-T gewaschen, bevor für 1 h bei RT mit dem sekundären AK inkubiert wurde. Dies geschah unter Lichtausschluss, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzsignals zu vermeiden. Nach erneutem 3-maligen Waschen mit PBS-T konnte die Membran mithilfe des *Odyssey Infrared Imager* (Li•cor Biosciences, Bad Homburg) gescannt und ausgewertet werden.

4.4.1.6 Strippen einer Nitrocellulosemembran

Das Strippen der Membran diente dem Lösen vorhandener AK-Bindungen, um eine zweite Färbung der Membran mit anderen AK durchführen zu können. Hierzu wurde diese nacheinander je 5 min bei RT mit H₂O_{zyklodest.}, 0,2 M NaOH und wiederum H₂O_{zyklodest.} behandelt. Anschließend konnte, mit dem Blockieren beginnend, entsprechend 4.4.1.5 fortgeföhren werden.

4.4.1.7 Analyse der N-Glykosylierung von Proteinen

Zur Analyse der N-Glykosylierung wurden Zellysate mit dem Enzym *PNGase F* (New England BioLabs, Frankfurt a. M.) den Herstellerangaben entsprechend behandelt. Darauf folgend wurde die resultierende Proteinlösung in der SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot analysiert.

4.4.2 Immunzytochemie

Die Immunzytochemie kam in dieser Arbeit zur Anwendung, um die Lokalisation von viralen Proteinen innerhalb transient transfizierter Zellen zu untersuchen. Alle Analysen wurden mit BHK-Zellen durchgeführt. Die Kolokalisationsstudien erfolgten nach Kotransfektion mit pEYFP-Golgi bzw. durch Färbung der Zellen mit *Rhodamine Phalloidin* oder *MitoTracker[®] Red CMXRos*.

4.4.2.1 Antikörperfärbung

Um intrazelluläre Proteine ihrer Lokalisation gemäß detektieren zu können, wurden auf Deckgläsern ausgesäte BHK-Zellen (siehe 4.2.3) 24 h nach Transfektion einmalig mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7%igem (v/v) Formaldehyd in PBS für 10 min bei RT fixiert. Bei Lokalisationsstudien im Infektionshintergrund wurde 24 h nach Transfektion zunächst mit MVA F6 infiziert und 3 respektive 6 h inkubiert, bevor die Fixierung erfolgte. Die spezifische Färbung der Mitochondrien zwecks Kolokalisationsstudien wurde erreicht, indem die Zellen vor der Fixierung 30 min mit *MitoTracker[®] Red CMXRos* (300nM) inkubiert wurden. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit PBS wurden die Zellen für 10 min bei RT mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert, bevor sie mit 10% (v/v) FCS in PBS über 30 min bei RT blockiert wurden, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Das Blockieren, Waschen sowie alle nachfolgenden Schritte erfolgten unter leichtem Schwenken. Danach schloss sich die Behandlung mit dem primären AK an, der zuvor in 0,1% (v/v) Triton X-100 und 5% (v/v) FCS in PBS gemäß 4.1.11 verdünnt worden war. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Primäre AK-Lösungen wurden mit zusätzlich 0,03% (v/v) Natriumazid ergänzt, um sie nach der Analyse für weitere Versuche aufbewahren zu können. Die Zellen wurden am darauf folgenden Tag drei Mal je 5 min mit PBS gewaschen bevor der ebenfalls in

AK-Lösung verdünnte fluoreszenzgekoppelte sekundäre AK auf die Zellen pipettiert wurde. Anschließend wurde für 1 h bei RT und unter Ausschluss von Licht inkubiert. Der sekundäre AK wurde nicht wiederverwendet und nach erfolgter Inkubation verworfen. Die Zellen wurden danach erneut drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen, woraufhin die Anfärbung der Zellkerne durch eine zehnminütige Inkubation mit DAPI (1:1000 in PBS) erfolgte. DAPI färbt zwar DNA und RNA; der Abstand der Emissionsmaxima der beiden DAPI-Nukleinsäuren-Verbindungen reicht jedoch aus, um die RNA-Signale am Mikroskop herauszufiltern. Gegebenenfalls wurden die Zellen danach zur spezifischen F-Aktin-Färbung für 30 min mit *Rhodamine Phalloidin* (1:200) inkubiert bevor im Anschluss die Deckgläschen mit 5 µg Mowiol auf Objektträger (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gebettet wurden. Zur Aushärtung wurden die Präparate über Nacht bei RT aufbewahrt, bevor die langfristige Lagerung bei 4°C erfolgte.

4.4.2.2 Konfokale Laserscan Mikroskopie

Immunzytochemisch gefärbte Präparate wurden mithilfe des LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen) mikroskopiert. Das konfokale Prinzip ist in der Abbildung 4.4.2 beispielhaft dargestellt. Hierbei wird ein vom Laser erzeugtes Strahlenbündel zunächst durch den **Kollimator** dahingehend gebrochen, dass alle austretenden Strahlen parallel zueinander verlaufen. Nachdem die Strahlen am **Hauptfarbteiler** gespiegelt wurden, erfahren sie durch das untere **Objektiv** wieder eine Bündelung und treffen sich alle im Brennpunkt (Fokus), der zur Studie von Zellen innerhalb des Präparates liegen muss. Die Fluoreszenzfarbstoffe des gefärbten Präparats werden durch die Laserstrahlen angeregt, wodurch es zur Emission von Fluoreszenzsignalen kommt. Der Teil des Präparates, der sich genau im Fokus des unteren Objektivs befindet, emittiert Strahlen, die exakt den Weg der Exzitations-(Anregungs-) Strahlen zurückverlaufen. Diese Strahlen treffen nach Durchlaufen des **Hauptfarbteilers**, der anregende von emittierten Strahlen differenzieren kann, ebenfalls zueinander parallel auf die obere Linse auf, und werden darum in deren Brennpunkt gebündelt. Genau an dieser Stelle ist die Lochblende (**pinhole**) platziert, die demzufolge fast ausschließlich Strahlen passieren lässt, die im Fokus des unteren Objektivs emittiert wurden. Strahlen, die von Bereichen des Präparats ober- bzw. unterhalb der Fokusebene emittiert werden, sind bei Erreichen des **pinholes** nicht gebündelt und werden deshalb größtenteils ausgeblendet.

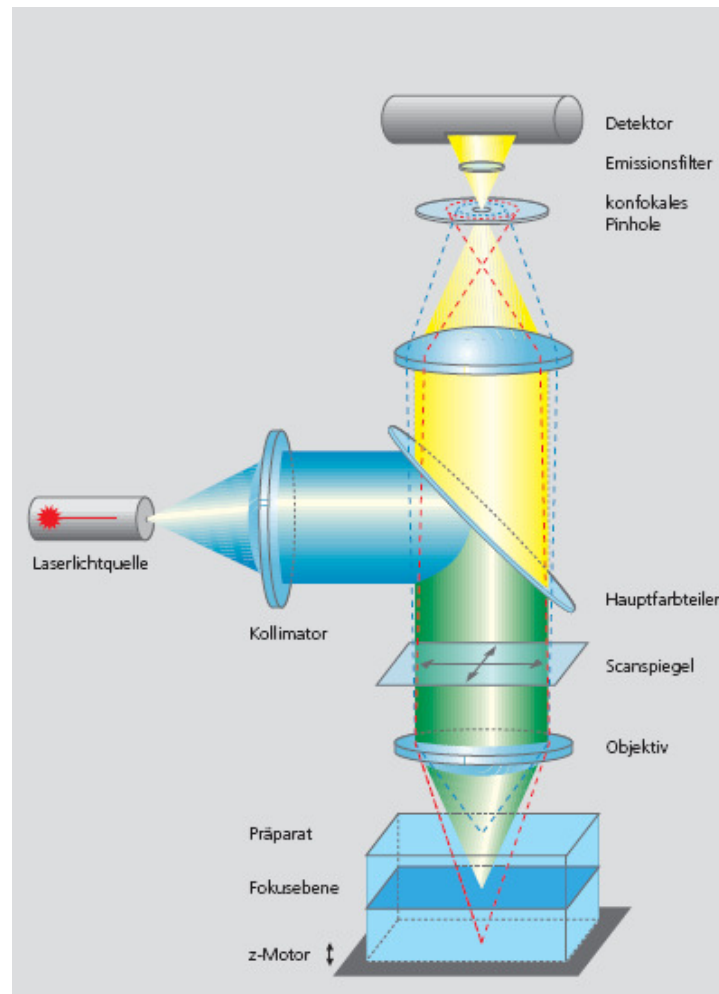


Abbildung 4.4.2: Modell eines konfokalen Laserscannmikroskops. Die grundsätzliche Funktionsweise ist im Text erläutert. Nach www.zeiss.de.

In der Abbildung Abbildung 4.4.2 sind solche Strahlengänge durch rot bzw. blau gestrichelte Linien dargestellt. Der nachgeschaltete Nebenfärbteiler und der Emissionsfilter ermöglichen anschließend die spektrale Aufspaltung unterschiedlicher Fluoreszenzemissionen in einzelnen Detektionskanälen. Der wesentliche Vorteil des konfokalen Mikroskops liegt darin, dass Bilder von begrenzten Ebenenschnitten erzeugt werden können. Infolgedessen kann die Lokalisation eines Objekts nicht nur in der x-y-Ebene, sondern auch in der z-Dimension sehr genau eingegrenzt werden. Die optische Schichtdicke wird hierbei vom Durchmesser des *pinhole* bestimmt und beträgt beim LSM 510 META (Zeiss, Oberkochen) minimal 340 nm. Mit Hilfe des **Z-Motors** kann der Abstand zwischen Präparat und Objektiv variiert und somit die **Fokusebene** verschoben werden. Die Mikroskop-Software *LSM Image Browser* (Zeiss, Oberkochen) ermöglicht eine nachträgliche Projektion der einzelnen optischen Schnitte (*single slides*) in eine Ebene. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur optimalen Lokalisationsstudie der angefärbten Proteine jedoch ausschließlich *single slide*-Aufnahmen verwendet.

4.4.3 Durchflusszytometrie

4.4.3.1 *Fluorescence activated cell sorting (FACS)*

Die Durchflusszytometrie funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, wie die Fluoreszenzmikroskopie. Der Schwerpunkt liegt hierbei jedoch auf der quantitativen Auswertung von Zellsuspensionen. Die zu analysierenden Zellen werden durch eine Kapillare gesaugt und hierbei durch einen Laserstrahl angeregt. Die Zellen werden dann hinsichtlich intrinsischer und extrinsischer Merkmale ausgewertet. Zu den intrinsischen Merkmalen zählen das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* =FSC) und das Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter* =SSC). Das FSC korreliert mit der Größe der Zelle und das SSC gibt Auskunft über die zelluläre Granularität. Zusätzlich lassen sich die Zellen bezüglich extrinsischer Merkmale analysieren. Hierzu zählt die Färbung mit Fluorophor-gekoppelten Antikörpern. Die nach Anregung durch den Laserstrahl emittierte Lichtintensität ist abhängig von der Anzahl gebundener Epitope. Mithilfe der AK-Kontrolle werden in der Auswertung bestimmte Intensitäten als „positiv“ bzw. „negativ“ definiert. Über die Verwendung von AK, deren Fluorophore sich hinsichtlich Absorptions- und Emmisionsspektren ausreichend unterscheiden, sind, wie auch in der Fluoreszenzmikroskopie, Mehrfachfärbungen der Zellen möglich. Es können somit Subpopulationen bestimmter Merkmalskombinationen bezüglich ihres Anteils an einer Grundgesamtheit analysiert werden.

4.4.3.2 *Apoptose-Assay*

Innerhalb dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse von potentiell antiapoptotischen Effekten innerhalb transfizierter und Staurosporin-behandelter BHK-Zellen (siehe 5.8) durchgeführt. Nachdem die in 6-Loch-platten ausgesähten Zellen gemäß 4.2.3 und 1.1.1 kultiviert und transfiziert worden waren, erfolgte 18 h post Transfektion (pT) die Behandlung mit Staurosporin. Hierfür wurde das Staurosporin zunächst auf RT gebracht und anschließend in der Verdünnung 1:1000 in RPMI-Medium auf die Zellen gegeben.

Nach 6-stündiger Inkubation wurde mit der Fixierung und AK-Färbung fortgefahren. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit 1 ml Trypsin pro Loch abgelöst. Die Trypsin-Zellsuspension wurde während des nachfolgenden Waschvorgangs in PBS aufgenommen und 5 min bei 4°C und 1500 U/min innerhalb von Röhren mit Rundboden (VWR International) zentrifugiert.

Der hierdurch entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpelett ein zweites Mal in PBS aufgenommen und zentrifugiert. Nachfolgend wurde das entstandene Pelett zwecks Fixierung und Permeabilisierung in *BD Cytofix/Cytoperm™* aufgenommen und die Konzentration der Suspension auf 10^6 Zellen/0,5 ml eingestellt. Im Anschluss an eine 20-minütige Inkubation bei 4°C folgte zweimaliges Waschen in der für PBS beschriebenen Weise (s.o.) mit jeweils 0,5 ml *BD Perm/Wash Buffer™* pro 10^6 Zellen. Danach wurden die primären AK anti-aktive Caspase-3 (20µl/ 10^6 Zellen) und anti-myc (1:250) in 100 µl *BD Perm/Wash Buffer™* pro Röhrchen verdünnt und auf die Zellen gegeben. Einer 30-minütigen Inkubation unter Ausschluss von Licht folgte erneutes Waschen mit 1 ml *BD Perm/Wash Buffer™* pro Röhrchen. Im Anschluss wurde für die myc-Färbung der sekundäre AK anti-Maus FITC (1:100) in 100 µl pro Röhrchen verdünnt und auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte wiederum über 30 min unter Ausschluss von Licht. Nach einmaligem Waschen mit 1 ml *BD Perm/Wash Buffer™* pro Röhrchen konnten die Zellen in 0,5 ml *BD Perm/Wash Buffer™* pro Röhrchen aufgenommen und nachfolgend am LSR II (*Beckton Dickinson*) ausgewertet werden.

4.5 Virologische Methoden

4.5.1 Vacciniavirusinfektion

Um zuvor in 6- bzw. 12-Loch-Zellkultur-Platten ausgesäte Zellen mit Viren zu infizieren wurde zunächst unter Verwendung des *Coulter[®] Particle Counters* (Beckman Coulter, USA) die Anzahl der pro Loch vorliegenden Zellen bestimmt. Aus der ermittelten Zellzahl und dem gewünschten Verhältnis von Viren zu Zellen (*moi, multiplicity of infection*) ließ sich nun die Zahl der benötigten Viren berechnen, wobei der Ausgangstiter die Menge an Virussuspension bestimmte. In der Vorbereitung wurde das Virus bei 4°C aufgetaut und das Medium durch das jeweilige Infektionsmedium ersetzt. Im Anschluss wurde die Virensuspension 3-mal für je eine Minute mit Ultraschall behandelt und dazwischen gründlich gevortext, um die Viruspartikel zu vereinzeln. Danach konnten die Viren auf die Zellen pipettiert werden. Die Länge der sich anschließenden Inkubation richtete sich hierbei nach dem jeweiligen Versuchsansatz.

4.5.2 Vacciniavirusanzucht

Die Virusanzucht erfolgte zwecks Isolierung und Anreicherung von Viren. In dieser Arbeit wurde die Anzucht von MVA F6 durchgeführt. Sie setzte sich aus folgenden Einzelschritten zusammen:

Infektion

Poolen

Aufreinigung

4.5.2.1 Infektion von Hühnerembryofibroblasten (CEF-Zellen)

Zur Virusanzucht von MVA F6 wurden 40 T-225er Flaschen konfluente Hühnerembryofibroblasten gemäß 4.5.1 mit einer *moi* von 0,3 infiziert. Hierzu wurde das benötigte Volumen der Virensuspension in 200 ml 2%igem EMEM gelöst. Nachdem das Ausgangsmedium der Flaschen entfernt worden war, konnten jeweils 5 ml der verdünnten Virensuspension in die Flaschen pipettiert werden, bevor sich eine einstündige Inkubation bei RT anschloss. Dies geschah unter konstantem Schwenken, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Hiernach wurden pro Flasche weitere 20 ml EMEM hinzugefügt und die Zellen

dann zwecks Virusvermehrung für 72 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte der Transfer der Flaschen in den -80°C Gefrierschrank.

4.5.2.2 Poolen

Nachdem die Flaschen wieder vollständig aufgetaut waren, konnte die Viren-Zell-Medium-Suspension gleichmäßig auf sechs 250 ml *Beckman Typ 19* Röhrchen (Beckman Coulter, USA) verteilt werden, die danach mit PBS austariert wurden. Im Anschluss wurden die Röhrchen in der *Optima™ L-80 XP Ultracentrifuge* (Beckman Coulter, USA) für 90 min zentrifugiert. Dies geschah bei 16 000 U/min und 4°C. Der entstandene Überstand wurde dekantiert, während das Pellet zur Resuspension in 10 mM Tris (pH 9) aufgenommen und anschließend jeweils dreimal bei -80°C eingefroren und direkt danach wieder aufgetaut wurde. Hierdurch wurden die Membranen der Zellen zerstört und die Viren somit freigesetzt.

4.5.2.3 Aufreinigung mittels Sucrose-Kissen

Bei der Viren-Aufreinigung mittels Sucrose-Kissen übernimmt die Sucrose bei der Zentrifugation die Funktion eines Filters, der die Virus-Partikel passieren lässt, die Zelltrümmer dagegen nicht. Zunächst wurde die Suspension aus 4.5.2.2 zwecks Vereinzeln der Viren mit Ultraschall behandelt. Dies geschah in 6 Wiederholungen á je 30 sek und 8 Zyklen und bei 25 % der maximalen Intensität. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurde die Lösung ausführlich gevortext und mit Eis gekühlt. Im Folgenden wurden in sechs *SW32Ti* Röhrchen jeweils 20 ml der Sucroslösung vorgelegt, die Viren-Suspension vorsichtig darüber geschichtet und die Röhrchen anschließend mit Tris (10mM, pH9) austariert. Die Zentrifugation erfolgte wiederum in der Ultrazentrifuge bei 13 300 U/min und 4°C für 80 min. Danach wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet in 300 µl Tris/Röhrchen aufgenommen. Im weiteren Verlauf konnte die Virenkonzentration mittels Titration (siehe 4.5.3) bestimmt werden.

4.5.3 Virustitration und Immunfärbung

Zur Bestimmung des Virustiters einer Lösung in *pfu* (*plaque forming units*)/ml wurden in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesäte CEF-Zellen mit 1:10 Verdünnungsreihen infiziert. Nach 2-stündiger Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel mit frischem Medium durchgeführt, um frei schwimmende Viruspartikel zu entfernen, bevor erneut für 48 Stunden inkubiert wurde. Der Infektionsansatz einer Verdünnung wurde jeweils doppelt durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation konnten die inzwischen entstandenen Plaques per Immunfärbung detektiert werden. Hierzu mussten die Zellen zunächst mit 2 ml eiskaltem Aceton-Methanol (1:1) pro Loch fixiert werden. Im Anschluss an eine 5-minütige Inkubation wurden die 6-Lochplatten kurz luftgetrocknet, bevor sie für 15 min bei 4°C mit Blockierungslösung (3% FCS in PBS) behandelt wurden. Danach folgte eine 3-stündige Inkubation bei RT mit dem zuvor in PBS verdünnten anti-vaccinia Lister (Kaninchen). Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurde der ebenfalls in PBS verdünnte Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen zugegeben. 1h später wurde erneut 3-mal mit PBS gewaschen, bevor je 1 ml der Dianisidine-Substratlösung auf die Löcher pipettiert wurde. Die Virus-spezifischen Plaques wurden nach 15- 20 min sichtbar und konnten anschließend ausgezählt werden. Hierbei wurde die Verdünnung gewählt, bei der zwischen 20 und etwa 100 Plaques vorhanden waren. Danach konnte der Mittelwert des Doppelansatzes bestimmt und durch Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor der Virustiter der fraglichen Lösung definiert werden.

5 Ergebnisse

In den letzten Jahrzehnten seit der Ausrottung der Pocken-Erkrankung beim Menschen hat sich das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) als sicheres und effizientes Vektorvakzin einen Namen gemacht. Hierbei ist von entscheidender Bedeutung, dass MVA, bei fehlender Pathogenität in humanen Organismen, über eine vollständig erhaltene Genexpression inklusive eingeschleuster Fremdgene verfügt. Die beschriebene Attenuierung von MVA, verglichen mit seinen Vorläufer-Viren, kommt hierbei unter anderem in der mangelnden Replikationsfähigkeit auf humanen Zellen zum Ausdruck. Die diesem Phänotyp zugrunde liegenden genotypischen Veränderungen sind jedoch noch immer nicht eindeutig zuzuordnen. Einen bedeutenden Schritt in diesem Zusammenhang stellen die innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführten vergleichenden Wachstumsanalysen verschiedener MVA-Vorläufer dar. Hierbei konnte gezeigt werden, dass sich HeLa Zellen menschlichen Ursprungs gegenüber CVA 152 permissiv verhalten, während gegenüber CVA 386 nur noch eine Semipermissivität besteht (Zwilling *et al.*, in Vorbereitung). Hieraus folgend lässt sich ein Teil der Attenuierung von MVA zeitlich entscheidend eingrenzen.

Parallel hierzu wurden in Kooperation mit dem *Center for Disease Control* (CDC, USA) die Genome von CVA 152 und CVA 386 vollständig sequenziert. Phänotypische und genotypische Unterschiede lassen sich somit in einen Kontext setzen.

Ziel dieser Arbeit war es, aussichtsreiche Gene mit potentieller Bedeutung für den veränderten Wirtstropismus innerhalb humaner Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

5.1 Vergleichende Sequenzanalyse von CVA 152 und CVA 386

Die Abbildung 5.1.1 stellt das Erbgut von CVA 152 und CVA 386 schematisch gegenüber. Es zeigt sich, dass der genannte Entwicklungsschritt mit einem Gesamtverlust von 7.244 Basenpaaren einhergeht. Die großen Deletionen I und II lassen sich von sechs kleineren Deletionen abgrenzen, die jeweils nur ein Gen betreffen. Ein Teil der Deletion I ist hierbei schon in CVA 152 zu verzeichnen, während der Funktionsverlust der Gene C12L, C14L, C15L und C16L erstmalig in CVA 386 auftritt. C16L ist hierbei lediglich teildeletiert.

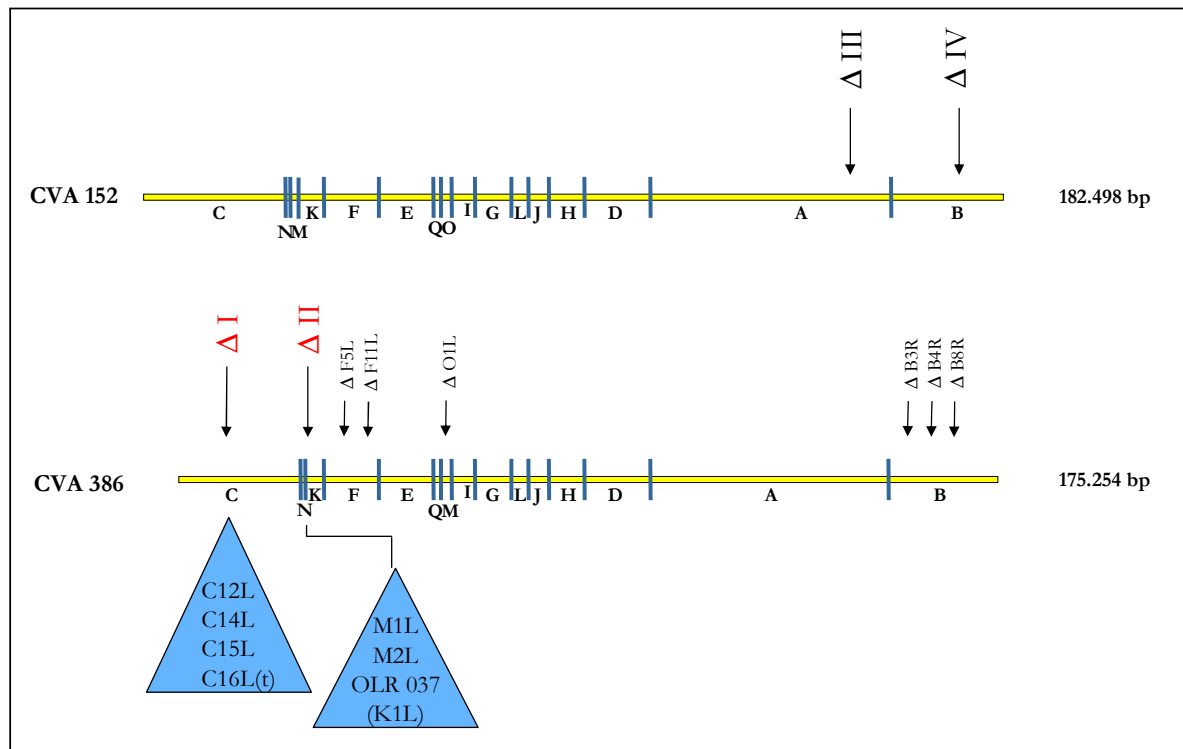


Abbildung 5.1.1: Schematische *HindIII*-Karten der DNA-Sequenzen von CVA 152 und 386. Bei den beiden MVA-Vorläufern jeweils neu aufgetretene Deletionen sind eingezeichnet. Bezüglich der kleineren Deletionen wurden nur jene berücksichtigt, bei denen ein Funktionsverlust des zugehörigen Proteins als wahrscheinlich galt. Deletionen, deren Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit war, sind hervorgehoben.

Aus den dargestellten Resultaten der Sequenzanalyse ergab sich das weitere Procedere. Die oben genannten Gene der Deletion I sowie M1L, M2L und der OLR 037 aus der Deletion II sollten hinsichtlich Expression, Proteinmodifikation und subzellulärer Lokalisation studiert und erste Hinweise auf ihre unbekannte Funktion gewonnen werden.

5.2 Herstellung von Expressionsplasmiden ausgewählter Gene der Deletion I und II

Die Expression der sieben aufgeführten Gene wurde auf Ebene der transienten Plasmidtransfektion untersucht. Zu diesem Zweck wurden zunächst Expressionsplasmide synthetisiert, deren Struktur in der Abbildung 5.2.1 anhand von pc-DNA-C12L-mycHis exemplarisch dargestellt ist. Die Gene C12L, C14L, C15L, C16L, M1L, M2L und der OLR 037 wurden jeweils für eukaryotische Expressionssysteme codonoptimiert und unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gesetzt. Dieser Komplex wurde an für ein mycHis-tag (-Etikett) codierende DNA gekoppelt, um die Antikörperdetektion der resultierenden Proteine zu

vereinfachen. Zur Amplifikation innerhalb von *E. coli*-Bakterien enthalten die Plasmide ein Ampicillin-Resistenz-Gen.

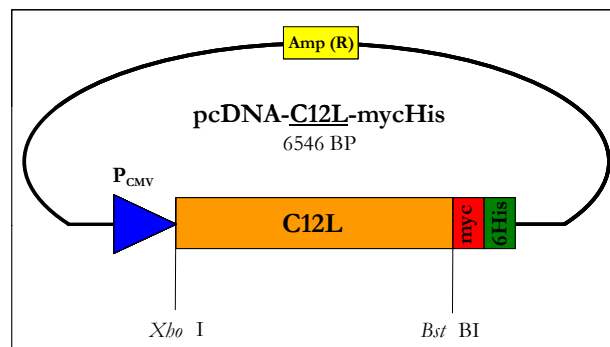


Abbildung 5.2.1: Aufbau der Expressionsplasmide am Beispiel von pcDNA-C12L-mycHis. Das Gen steht unter einem CMV-Promotor. Die für den mycHis-tag codierende DNA wurde angefügt.

5.3 *In silico*-Analyse der Gene der Deletion I und II anhand Datenbank-gestützter Computermodelle

Zu Beginn sollte eine erste Grundvorstellung erlangt werden, in welche Richtung sich die Studien der einzelnen Gene und deren analoger Proteine im weiteren Verlauf entwickeln könnten. Hierzu wurden die AS-Sequenzen der von den Genen codierten Proteine zunächst mithilfe von Computerprogrammen bezüglich potentieller posttranslationaler Modifikation, besonderer Merkmale und potentieller intrazellulärer Lokalisation analysiert. Die aussichtsreichsten Prognosen sind im Folgenden in groben Zügen dargelegt:

Für das Protein C12 wurde mithilfe des Programms *SUMOplotTM prediction* (Gramatikoff, K. *et al.*, 2004) jeweils am Lysin der AS-Positionen 10 (*Score* 0,82), 93 (*Score* 0,94) und 251 (*Score* 0,85) eine hohe Wahrscheinlichkeit für Sumoylierung errechnet.

Das Protein C14 ist laut dem Programm *MITOPROT: Prediction of mitochondrial targeting sequences* (Claros, M. G. *et al.*, 1996) mit einer Wahrscheinlichkeit von 84,3 % innerhalb der Mitochondrien lokalisiert.

Für die AS-Sequenz des M2 wurde mittels *SignalP 3.0 Server* (Bendtsen, J. *et al.*, 2004) mit 98,6%iger Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid prognostiziert (siehe Abbildung 5.3.1). Die Computeranalyse mithilfe des Programms *NetNGlyc 1.0 Server* (Gupta, R. *et al.*, 2004) ergab zusätzlich an den Positionen 79 und 118 eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine N-Glykosylierung.

Alle dargestellten Berechnungen wurden unter Verwendung der Proteinsequenzen einschließlich des mycHis-tags durchgeführt. Der Betrag der durch den tag hervorgerufenen Abweichungen belief sich ausnahmslos auf weniger als 1 %.

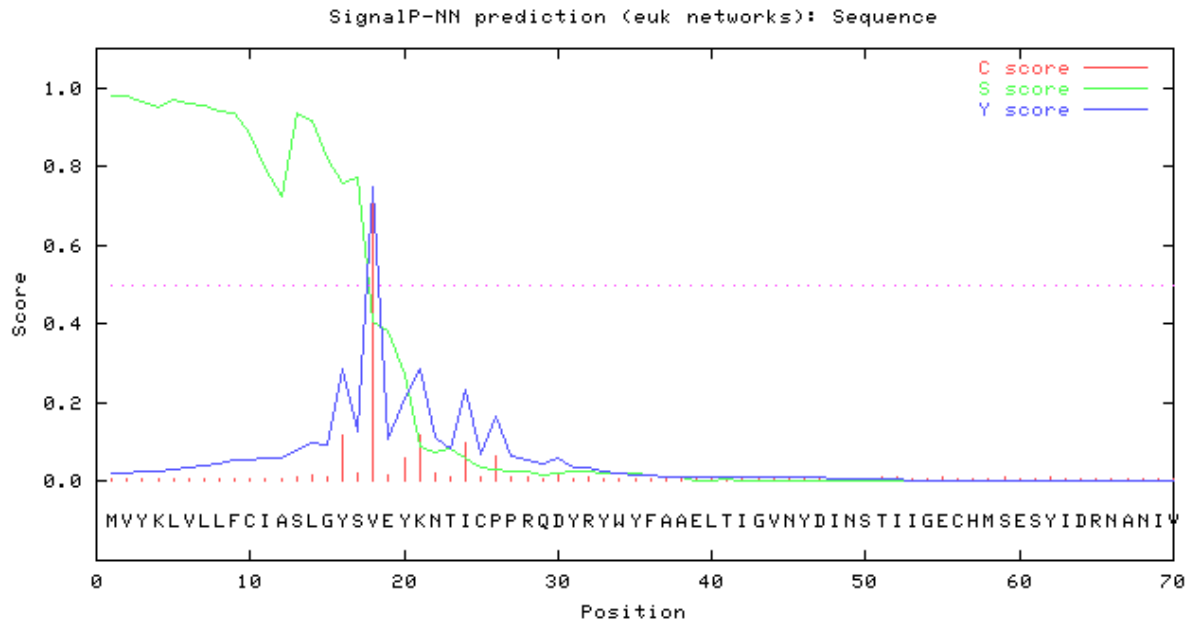


Abbildung 5.3.1: In silico-Analyse des Proteins M2. Der *SignalP 3.0 Server* prognostiziert für M2 eine Signalsequenz. Der *S-score* beschreibt die Wahrscheinlichkeit der einzelnen AS dafür, Bestandteil eines Signalpeptids zu sein. Ein hoher *score* steht für eine hohe Wahrscheinlichkeit. Der *C-score* und der *Y-score* ordnen den AS ihr Potential hinsichtlich einer Signalpeptid-Schnittstelle zu. M2 enthält laut *SignalP 3.0 Server* mit 98,6%iger Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid, dessen Schnittstelle mit 80,7%iger Wahrscheinlichkeit zwischen den Positionen 17 und 18 lokalisiert ist.

5.4 Expressionsstudien der Gene der Deletion I und II mittels Western Blot-Analyse

Um die Gene der Deletion I und II im Hinblick auf Expression und Größe der resultierenden Proteine zu untersuchen, wurden humane 293T Zellen mit den unter 5.2 beschriebenen Expressionsplasmiden transfiziert und inkubiert (siehe 1.1.1). Es folgte die Western Blot-Analyse (siehe 4.4.1) der erzeugten Zelllysate sowie der gewonnenen Zellkultur-Überstände, um die Gene zusätzlich auf mögliche Sekretion der zugehörigen Proteine zu überprüfen. Abbildung 5.4.1 illustriert das Ergebnis der Analyse der Zelllysate (a) und der Überstände (c) jeweils 48 Stunden nach Transfektion.

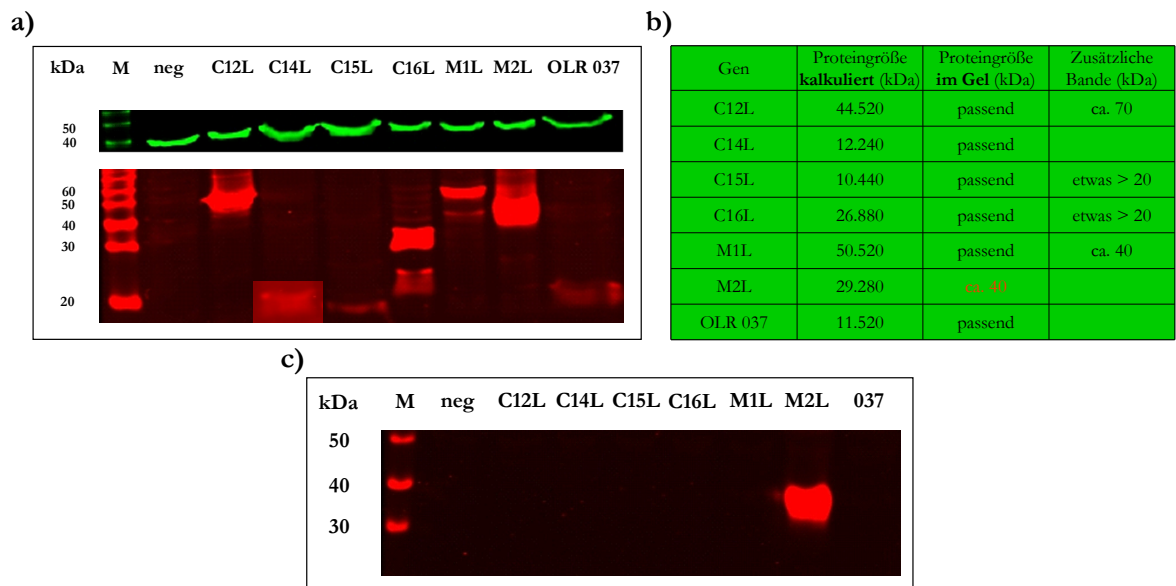


Abbildung 5.4.1: Größenspezifische Auftrennung der von den Genen der Deletion I und II codierten Proteine nach Plasmidtransfektion. a) zeigt die Western Blot-Analyse der Zelllysate transfizierter 293T Zellen. Als negativ-Kontrolle diente ein untransfizierter Ansatz; als Ladekontrolle wurde das zelluläre Protein β -Aktin (1:10 000) detektiert (oberer Blot). Die myc-Färbung im Fall von C14 wurde aufgrund der geringen Intensität nach längerer Belichtung dargestellt. Im Fall von C12L-, C16L-, M1L-, M2L- und negativ-Transfektion wurden jeweils 40 μ g Proteinlösung aufgetragen, bei C14L-, C15L- und OLR 037-Transfektion je 80 μ g. In c) ist die Proteindetektion innerhalb der Überstände dargestellt. Die Proben in a) und c) wurden jeweils 48 h nach Transfektion gewonnen. Die Proteine wurden mittels anti-His (Kaninchen, 1:10 000) detektiert. Marker: *Magic Mark™ XP Western Protein Standard*. Die Tabelle in b) vergleicht die im Western Blot ermittelte Proteingröße mit der zuvor anhand der DNA-Sequenz kalkulierten Größe.

In der Auswertung der Zelllysate zeigt sich zunächst, dass die Expression aller sieben zu untersuchenden Gene innerhalb des Versuchsaufbaus gegeben ist. Auffällig ist jedoch, dass hinsichtlich der Menge der nach 48 h detektierbaren Proteine starke Abweichungen bestehen.

Während die Proteine C12, C16, M1, und M2 im Western Blot starke Banden hervorrufen, so erzeugen C14, C15 und das vom OLR 037 codierte Protein trotz doppelter Menge aufgetragenen Gesamtproteins nur verhältnismäßig schwach sichtbare Banden.

Um die drei fraglichen Proteine im Hinblick auf eine beschleunigte Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasomensystem zu untersuchen, wurden in der Folge erneut 293T Zellen mit den Genen C14L, C15L und dem OLR 037 transfiziert und 48 h bzw. in einem zweiten Ansatz lediglich 24 h inkubiert. In zwei weiteren Ansätzen wurden die Zellen jeweils 4 h nach erfolgter Transfektion mit dem irreversiblen Proteasomeninhibitor Lactacystin (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt und anschließend 24 bzw. 48 h inkubiert.

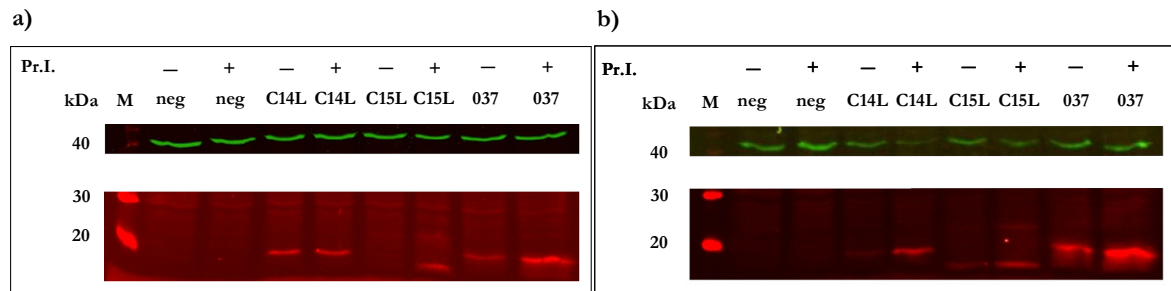


Abbildung 5.4.2: Western Blot-Analyse der von den Genen C14L, C15L und dem OLR 037 codierten Proteine nach Plasmidtransfektion und Lactacystinbehandlung. Die Zellysate in a) wurden 24 h nach Transfektion gewonnen, in b) 48 h nach Transfektion. Lactacystin (2 μ M) wurde, wo angezeigt (Pr.I.+), jeweils 4 h nach Transfektion hinzugegeben. Die Proteine wurden mittels anti-His (1:10 000) detektiert. Als Negativ-Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, als Ladekontrolle wurde zelluläres β -Aktin (1:10 000) detektiert (jeweils oberer Blot). Es wurde je 80 μ g Gesamtproteinlösung pro Geltasche aufgetragen. Marker: *Magic Mark*TM XP *Western Protein Standard*.

Anhand der Abbildung 5.4.2 lässt sich erkennen, dass die Proteine C14, C15, und das vom OLR 037 codierte Protein zumindest unter den gegebenen Umständen tatsächlich einem intensivierten Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System unterliegen, die durch den Inhibitor Lactacystin, der an der 20s-Untereinheit der Proteasomen angreift (Lee, D. H. *et al.*, 1998), herabgesetzt werden kann. Während bei C15 und dem von dem OLR 037 codierten Protein der Effekt des Lactacystins sowohl bei den 24 h als auch im Fall der 48 h nach Transfektion gewonnenen Proben deutlich ausgeprägt ist, zeigt sich bezüglich der C14 enthaltenden Proben 24 h nach Transfektion noch keinerlei Lactacystin-abhängige Differenz in der Bandenintensität. Der Abbau von C14 tritt hier demnach erst zwischen 24 und 48 h nach erfolgter Transfektion ein.

Der in der Abbildung 5.4.1 b) angestellte Größenvergleich der detektierten Proteine mit der anhand der DNA-Sequenz errechneten Größe ergab im Fall von M2 eine erhebliche Abweichung. Das Protein zeigte sich im Western Blot der Zellysate nicht nur prinzipiell größer als erwartet (ca. 40 kDa. gegenüber 29,280 kDa) sondern auch als auffällig breite und diffuse Bande, wie sie bei glykosylierten Proteinen häufig vorkommt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass M2 von pcDNA-M2L-mycHis-transfizierten 293T Zellen in den Überstand sekretiert wird (siehe Abbildung 5.4.1 c)).

Ferner erzeugen die Proteine C12, C15, C16 und M1 im SDS-Gel eine Doppelbande, wobei die zweite Bande bei C16 und M1 jeweils unterhalb der für die Proteine kalkulierten Größe läuft. Im Fall von C12 ergab sich immer eine zweite Bande oberhalb der berechneten Größe, wenngleich die exakte Größe und Prominenz der zusätzlichen Bande innerhalb der durchgeführten Western Blots durchaus variierte (Daten nicht gezeigt). Im Fall von C15 lief

die zusätzliche Bande zwar ebenfalls höher als erwartet, jedoch konstant bei einer Größe von knapp über 20 kDa.

5.5 Das Protein M2 ist N-glykosyliert

Die Ergebnisse aus 5.3 und 5.4 gaben Veranlassung, das Protein M2 gezielt auf potentielle N-Glykosylierung zu untersuchen. Dies geschah mithilfe des Enzyms *PNGase F* (*New England BioLabs*, Frankfurt a. M.), welches spezifisch N-Glykane von der AS Asparagin des behandelten Proteins abtrennt, sofern vorhanden (Plummer, Jr. and Tarentino, 1991). Die Abbildung 5.5.1 zeigt das Resultat der sich anschließenden Western Blot-Analyse. Sowohl M2 aus Lysat als auch Überstand lief nach *PNGaseF*-Behandlung deutlich tiefer, auf Höhe der berechneten Größe. Das Lysat pcDNA-C12L-mycHis-transfizierter Zellen diente als Spezifitäts-Kontrolle und zeigte kein derartiges Ergebnis.

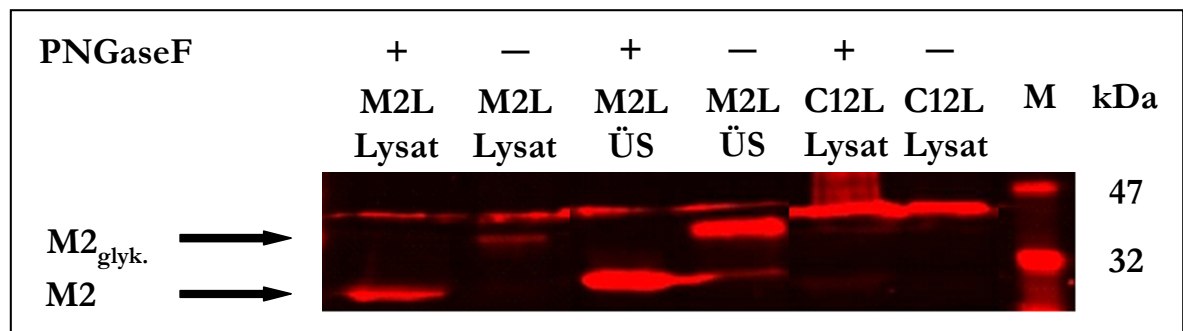


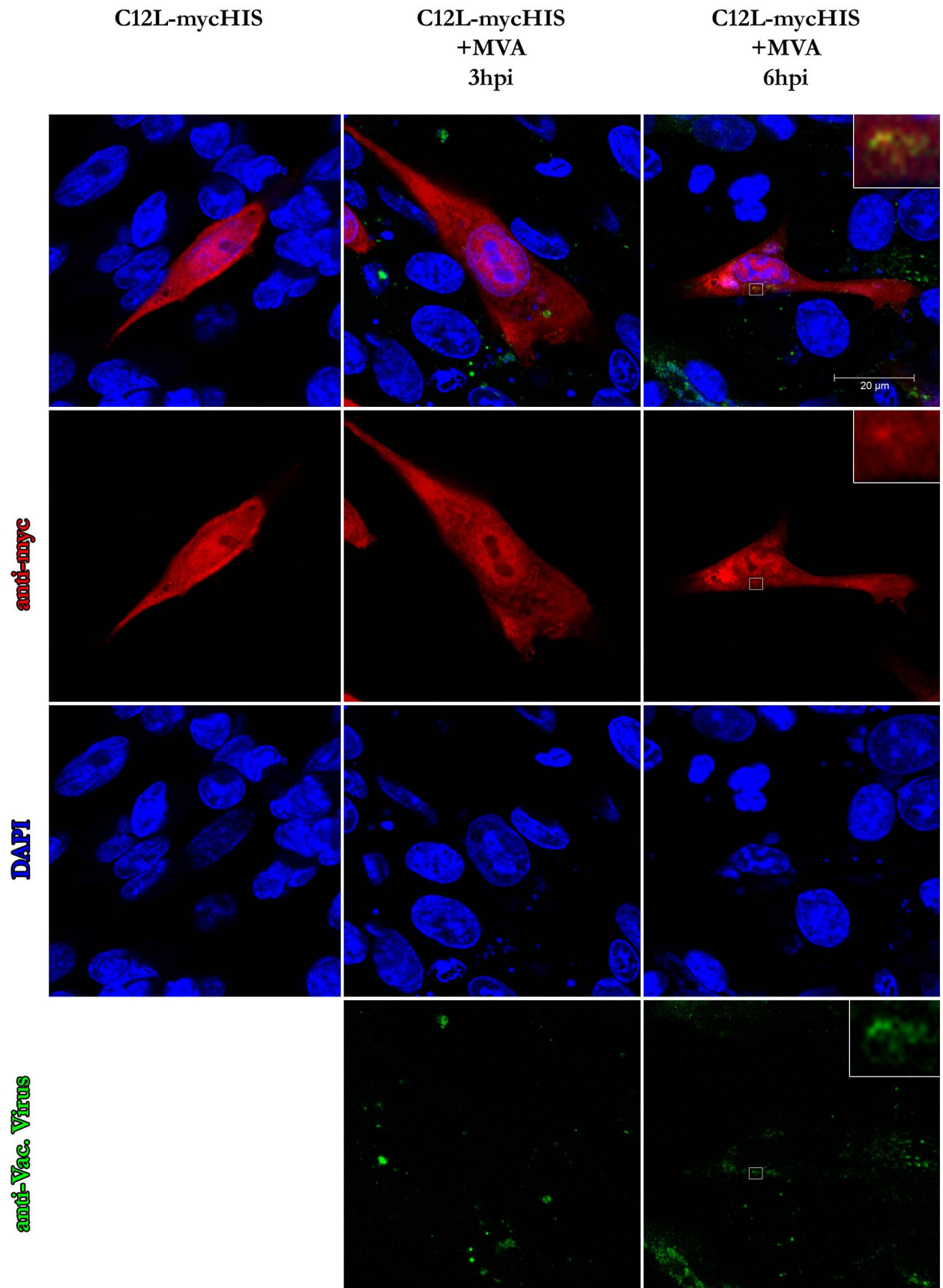
Abbildung 5.5.1: Western Blot-Analyse der Zelllysate und des Überstands transfizierter Zellen nach *PNGaseF*-Behandlung. 293T Zellen wurden 48 h nach Plasmidtransfektion geerntet. Je 18 µl der Proteinlösung von Zelllysaten und Überstand wurden unter Zugabe des Enzyms inkubiert (siehe 4.4.1.7) und danach im SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels anti-His (1:10 000) als primärem und anti-Kaninchen (1:15 000) als sekundärem AK detektiert. Marker: *Prestained Protein Bench Mark*, *New England Biolabs*

5.6 Lokalisationsstudien der Gene der Deletion I und II mittels Immunfluoreszenz in BHK-Zellen

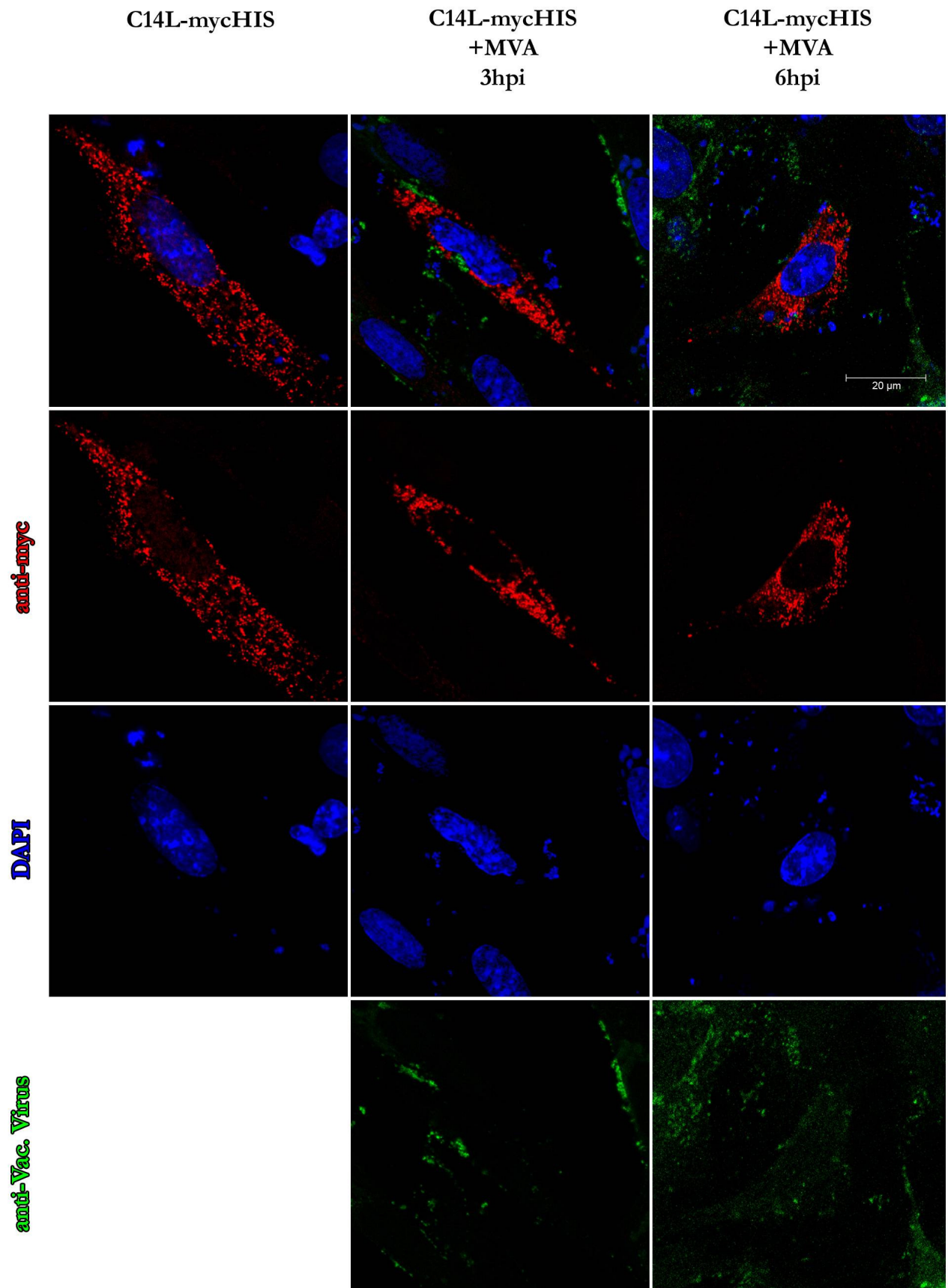
5.6.1 Analysen nach transienter Plasmidtransfektion bzw. zusätzlicher MVA-Infektion

Um weitere Anhaltspunkte im Hinblick auf die größtenteils unbekannte Funktion der sieben Gene der Deletion I und II zu erhalten, wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen die Lokalisation der analogen Proteine in transfizierten BHK- (*Baby hamster kidney*)-Zellen untersucht. Diese wurden hierbei zunächst im uninfizierten Zustand studiert. Später schlossen sich Analysen vor dem Hintergrund einer MVA-Infektion an, um über eine potentiell veränderte Lokalisation der Proteine gegebenenfalls Rückschlüsse auf virale Interaktionspartner ziehen zu können. Die Zellen wurden dazu jeweils 3 bzw. 6 h post Infektion (pI) fixiert, da lediglich für C12L (Kettle et al., 1995), M1L und M2L (Xiang et al., 1998) bekannt ist, dass sie innerhalb des vacciniaviralen Reproduktionszyklus früh (*early*) exprimiert werden. M2L konnte hierbei kürzlich sogar als *immediate early* klassifiziert werden (Assarsson et al., 2008). Für die übrigen Gene ist der Zeitpunkt der Expression relativ zum Replikationszyklus noch ungeklärt. Die Auswertung der Präparate wurde am konfokalen *Laserscan*-Mikroskop (LSM 510 Meta) vorgenommen. Jeweils repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen sind in der Abbildung 5.6.1 dargestellt.

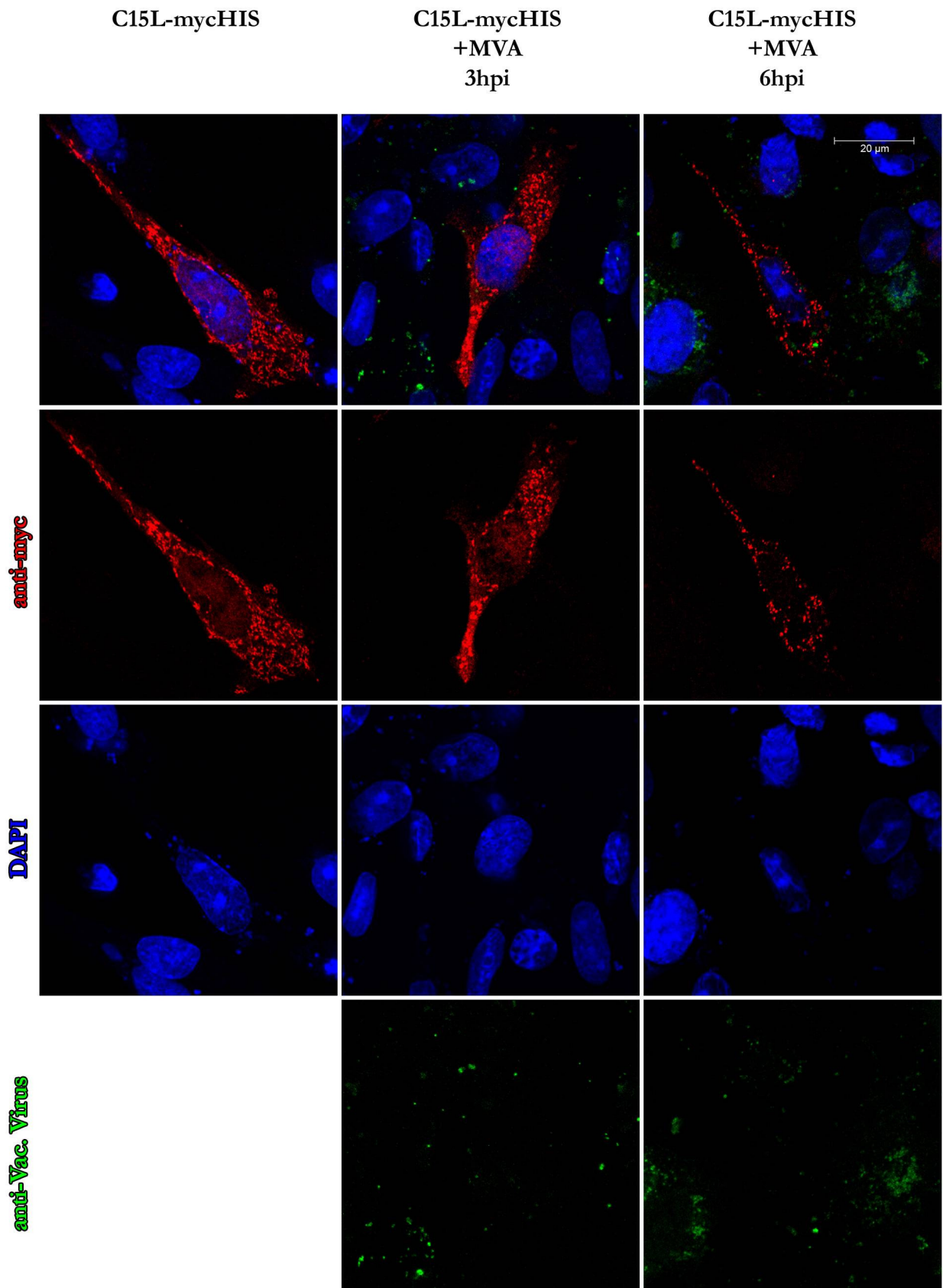
a)



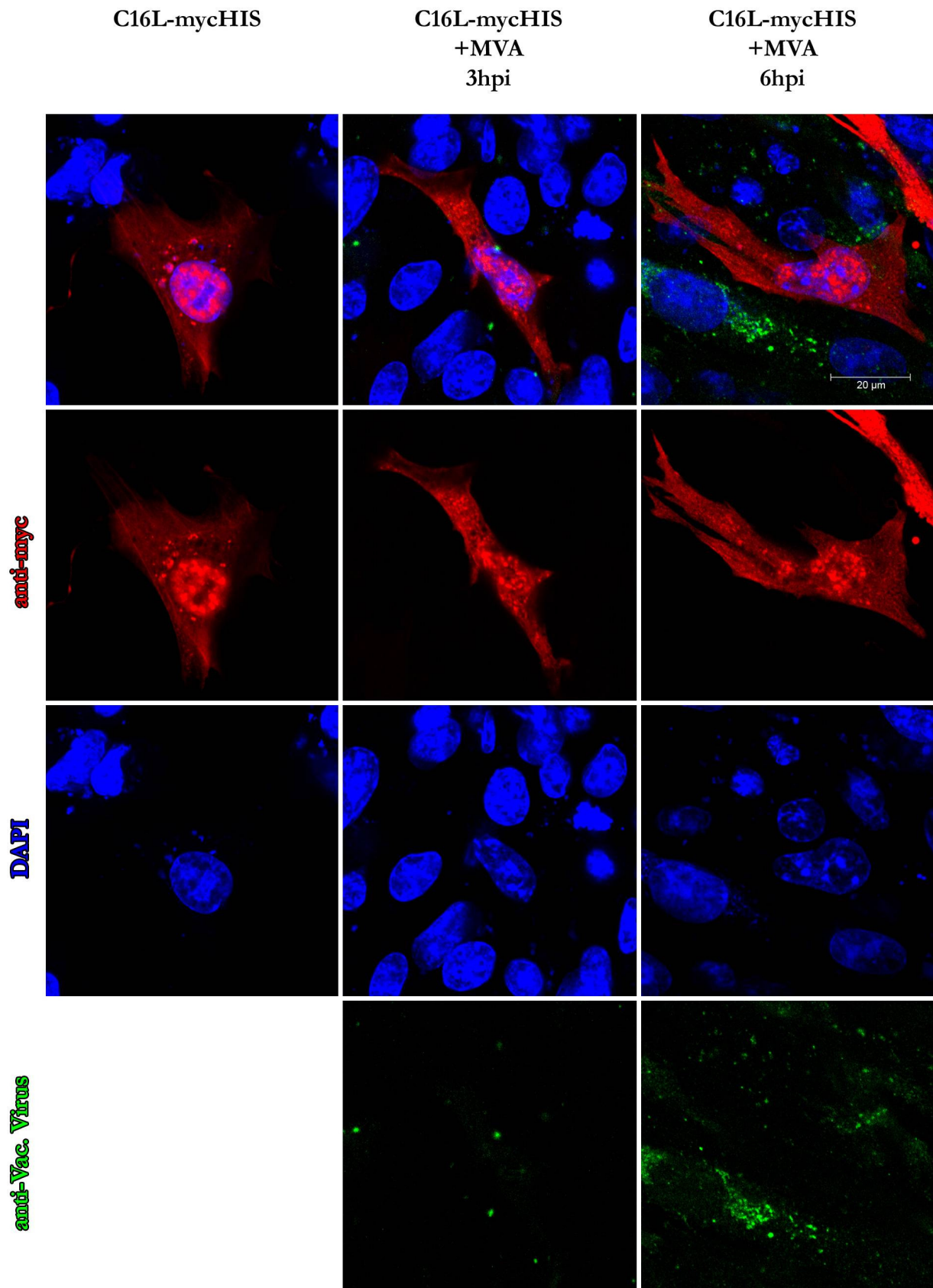
b)



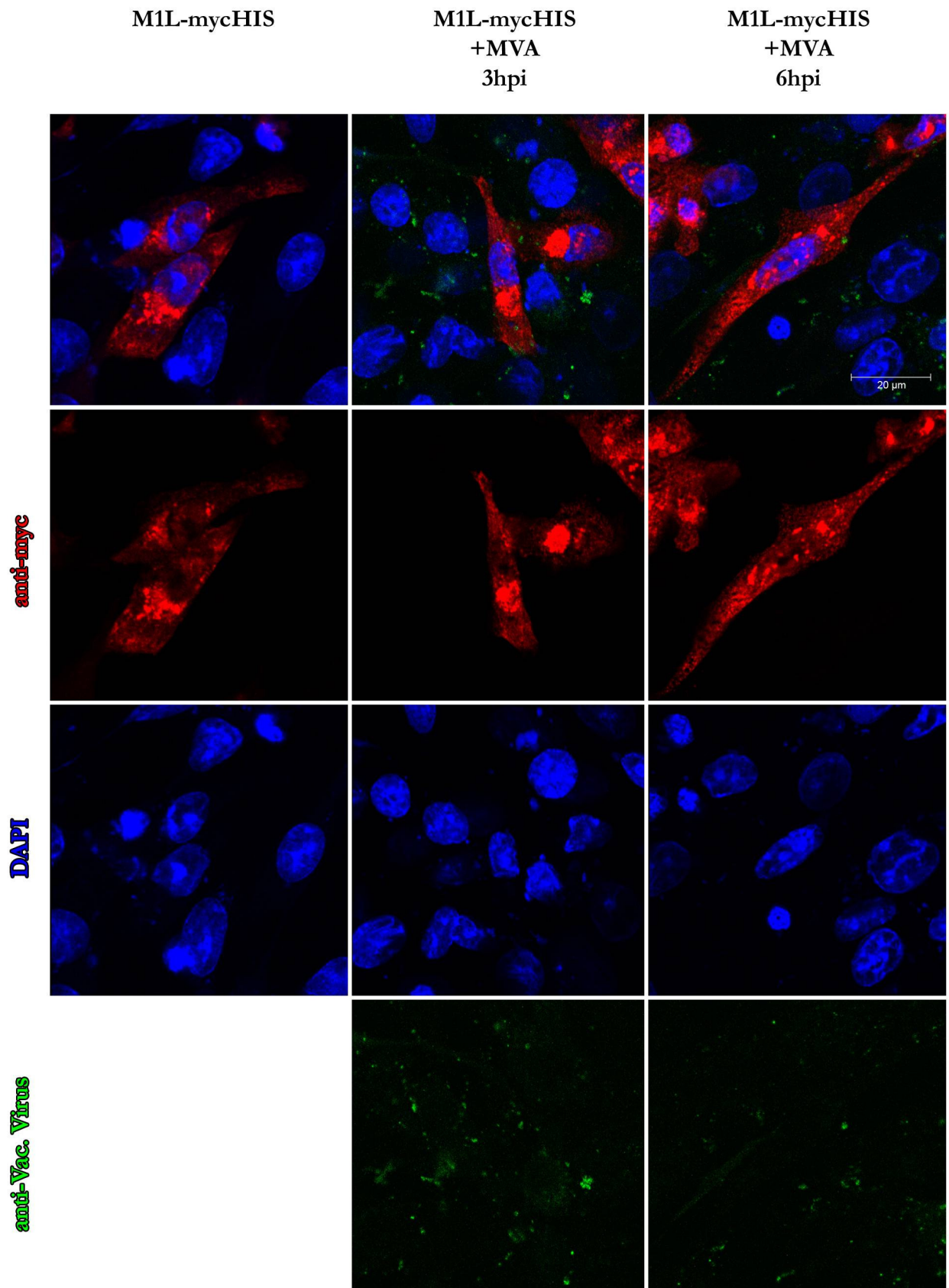
c)



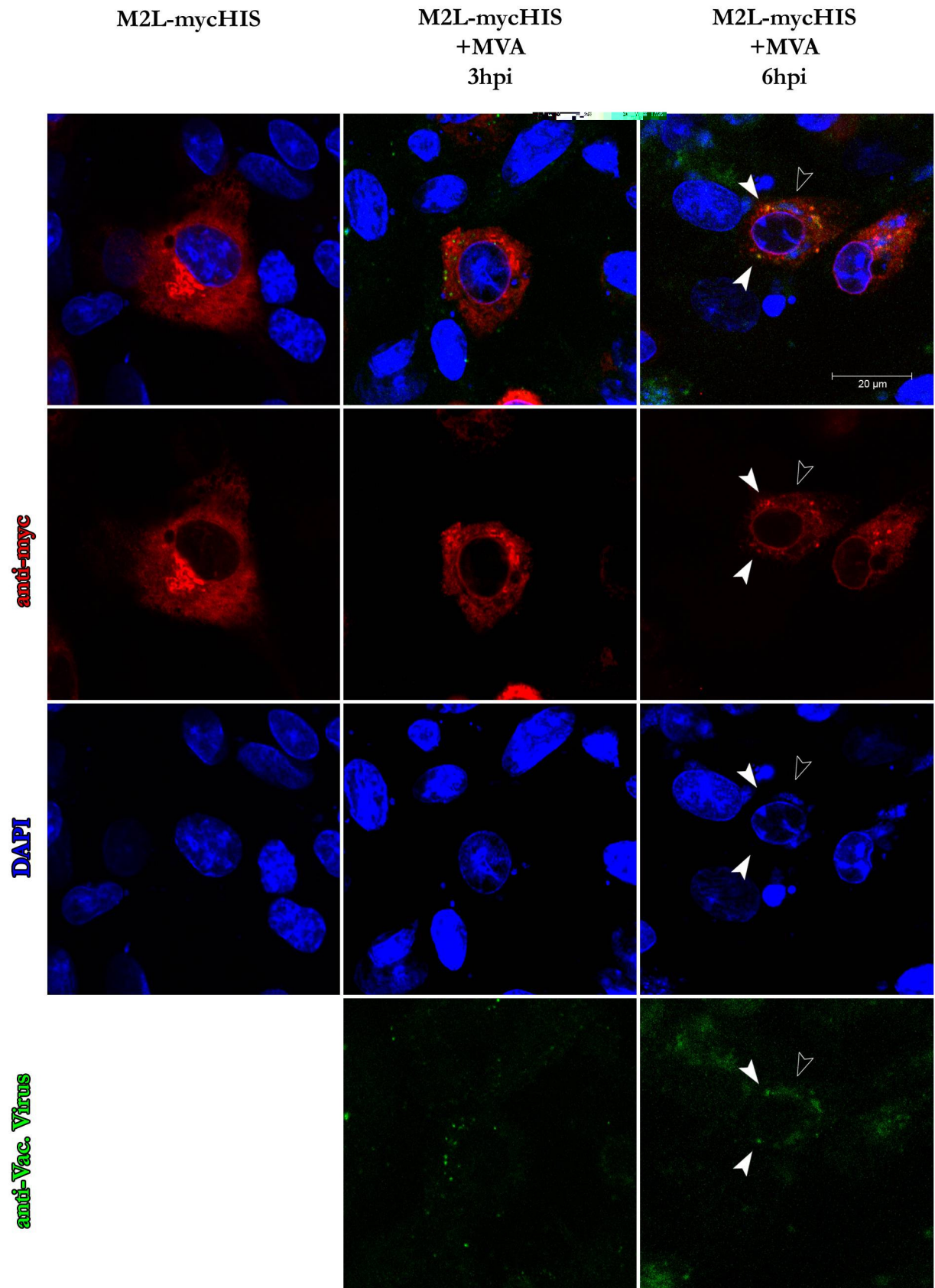
d)



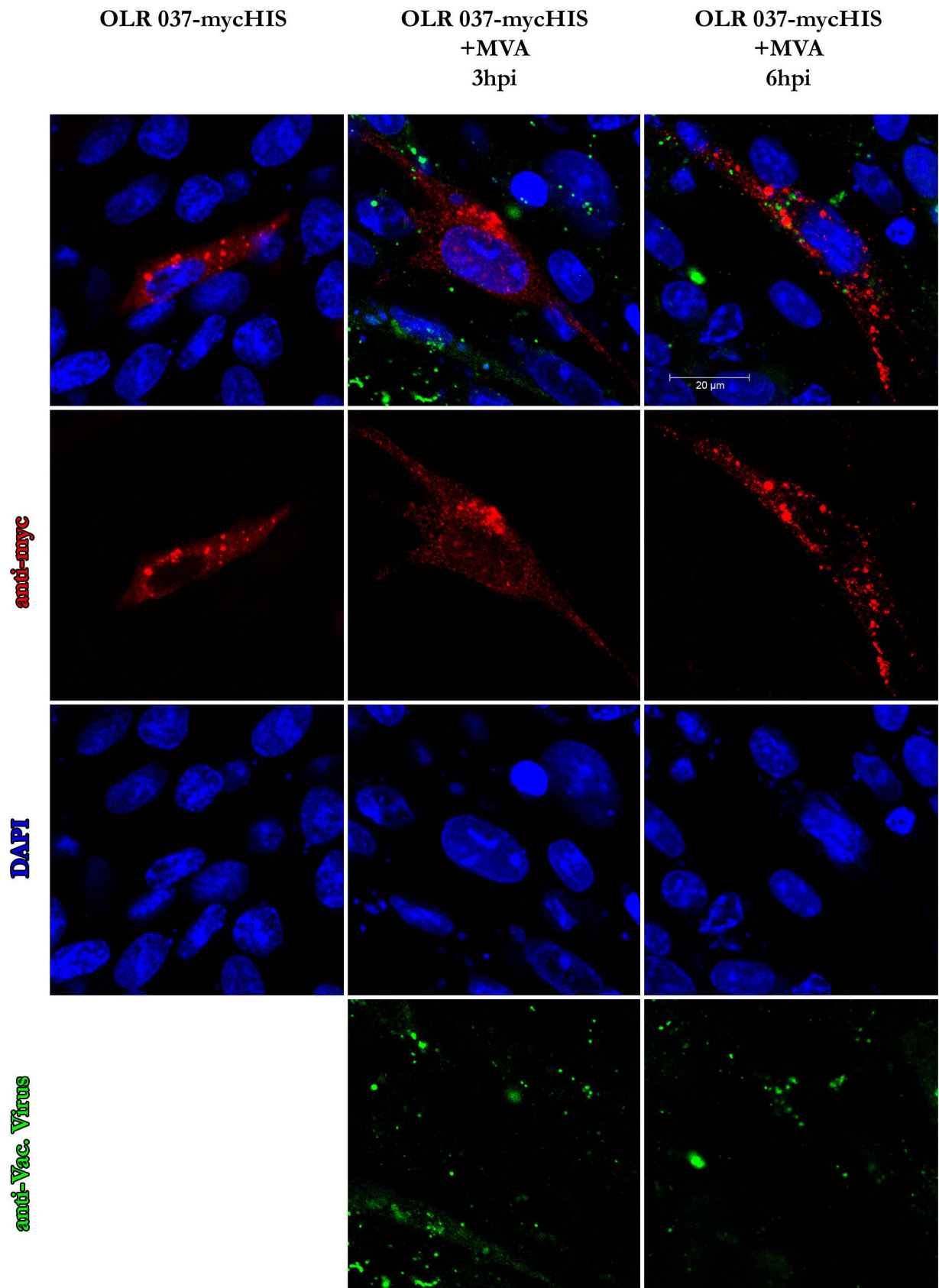
e)



f)



g)



h)

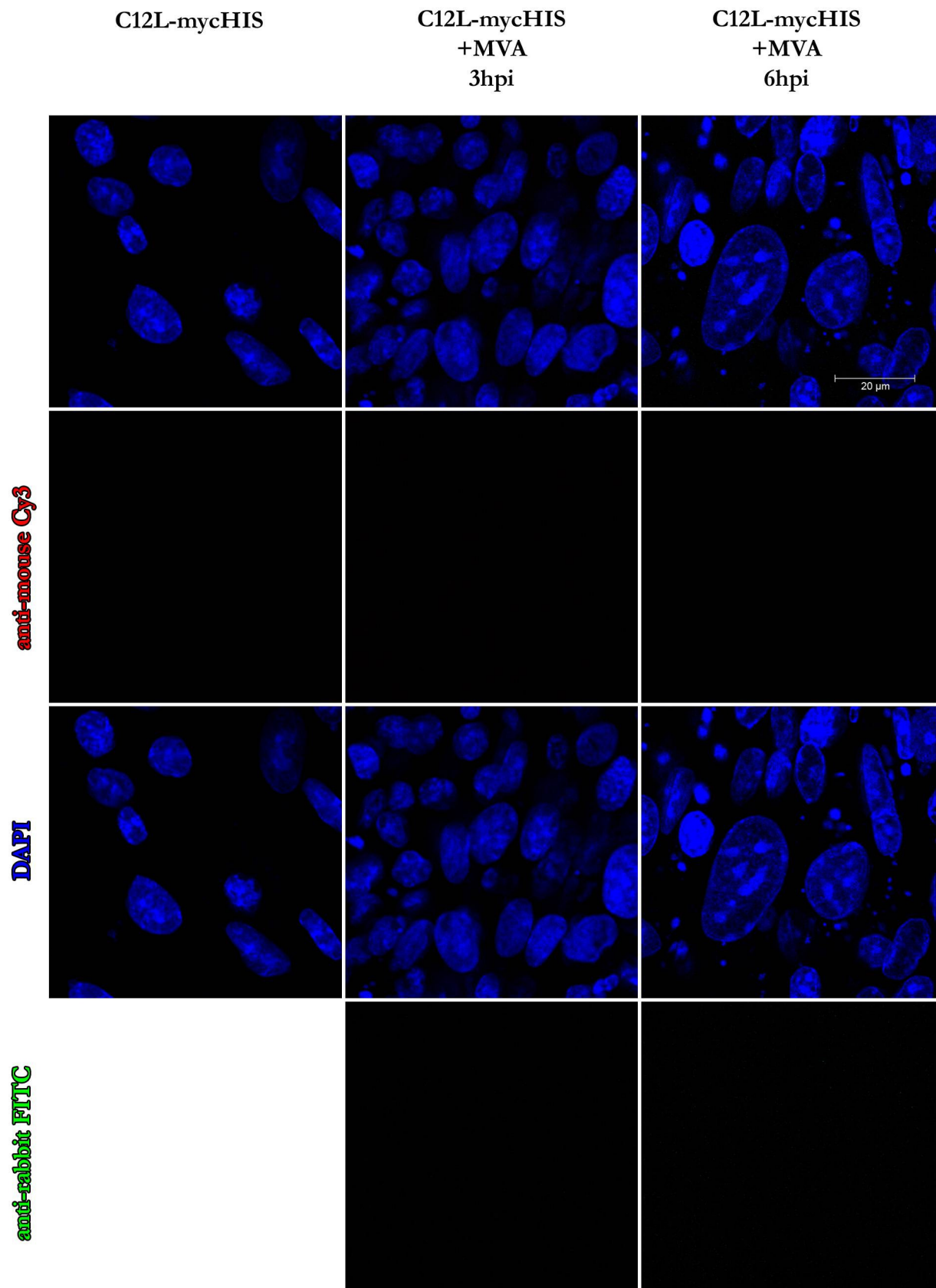


Abbildung 5.6.1: Immunfluoreszenzstudien der Gene der Deletion I und II innerhalb Plasmid-transfizierter BHK-Zellen. Es wurden jeweils uninfizierte (linke Spalte), sowie 3h (mittlere Spalte) und 6h (rechte Spalte) pI mit MVA F6 (Wildtyp-Isolat von MVA) fixierte Zellen untersucht. Zur Detektion der zu analysierenden Proteine (zweite Reihe) wurde anti-myc-tag (Maus, 1:250) verwendet. Die Zellkern-Färbung (dritte Reihe) erfolgte mittels DAPI (1:1000) und die Virus-Partikel (vierte Reihe) wurden über anti-VACV vom Lister-Stamm (Kaninchen, 1:2000) sichtbar gemacht. Durch Kolo-kalisation entstandene Überlagerungen von Protein- und Virus-Färbung erscheinen in der obersten Reihe als gelbe Bereiche. Zu jedem angefertigten Präparat wurde parallel im Sinne einer Spezifitäts-Kontrolle ein transfizierter (und gegebenenfalls infizierter) Ansatz nur mit dem sekundären AK versetzt. In **h**) sind derartige Aufnahmen am Beispiel von pc-DNA-C12L-mycHis exemplarisch dargestellt. Zusätzlich wurde mithilfe von untransfizierten bzw. uninfizierten Präparaten jeweils die Spezifität des primären AKs sichergestellt (Daten nicht gezeigt). Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20 μm .

Die von den Genen der Deletion I und II codierten Proteine zeigen ein breites Spektrum an subzellulären Verteilungsmustern. Hierbei wiesen einige Proteine deutliche Ähnlichkeit mit der spezifischen Färbung einzelner Zellkompartimente auf, während andere scheinbar diffus in der gesamten Zelle verstreut lagen. Im Folgenden sollen die einzelnen Proteine im Hinblick auf Lokalisation und potentielle virale Interaktionspartner innerhalb der viralen Fabriken der Reihe nach besprochen werden.

Das Protein **C12** (siehe Abbildung 5.6.1 a)) wies eine vergleichsweise homogene Verteilung innerhalb des gesamten Zytoplasmas und Nukleus auf. Hierbei zeigten sich keinerlei signifikante infektionsbedingte Unterschiede. Die vor allem in der linken und mittleren Spalte sichtbaren kreisförmigen Aussparungen im Zytoplasma waren lediglich relativer Art. (Die zur Aufnahme eingesetzte Empfindlichkeit des Mikroskops stellt immer einen Kompromiss dar, um die Zelle als Ganzes möglichst realitätsgetreu wiederzugeben.) Auch innerhalb des Kerns waren relative Aussparungen zu erkennen, und zwar vorwiegend in den Chromatin-dichten Bereichen. Dieses Phänomen lässt sich jedoch möglicherweise durch schlichte Verdrängung des Proteins in diesen Bereichen erklären.

In den infizierten Zellen (siehe Vergrößerung rechte Spalte) lassen sich einige Stellen erkennen, wo es zu Überlagerungen von Virus-Partikeln und C12 kam. Angesichts der Verteilung von C12 innerhalb der gesamten Zelle sind solche Punkte jedoch sehr wahrscheinlich rein statistisch bedingt und folglich ohne besondere biologische Relevanz.

Demgegenüber war das Protein **C14** (siehe Abbildung 5.6.1 b)) ausschließlich im Zytoplasma detektierbar. Die Verteilung war hierbei allerdings längst nicht so gleichmäßig, wie bei C12; vielmehr ließen sich zahlreiche, annähernd runde Strukturen von etwa $1\mu\text{m}$ Größe erkennen, die sich teilweise auch zu wurmartigen, kleinen Ketten aneinandergelagert hatten. Die C14-Färbung wies eine auffallende Ähnlichkeit mit spezifischen Mitochondrien-Färbungen auf und zwar offenbar unabhängig von einer im Anschluss an die Transfektion erfolgten Infektion.

Auch die subzelluläre Lokalisation von **C15** (siehe Abbildung 5.6.1 c)) zeigte eindeutige Analogien zur Formation einer Mitochondrien-Färbung. Im Gegensatz zu C14 bestand hier jedoch darüber hinaus eine schwache Färbung aller übrigen Zellbereiche inklusive Nukleus.

Das Ausmaß dieser zusätzlichen Verteilung variierte dabei von Zelle zu Zelle. Auch im Fall der pcDNA-C15L-mycHis-transfizierten Zellen hatte die nachfolgende Infektion keinen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins.

Das Protein **C16** (siehe Abbildung 5.6.1 d)) ließ in seiner Verteilung eine bemerkenswerte 3-Stufen-Intensität erkennen. Ins Auge stach zunächst die markante Akkumulation innerhalb des Zellkerns. Im Gegensatz zu C12 entstand hier nicht der Eindruck eines bloßen Ausfüllens des freien Raums; innerhalb der chromatinarmen Bereiche fanden sich noch teilweise scharf abgegrenzte Strukturen. Dennoch waren auch bei C16 die Aussparungen in den chromatindichten Arealen lediglich relativer Natur.

Auch die möglicherweise durch Mycoplasmen hervorgerufenen DAPI-gefärbten Punkte außerhalb des Zellkerns (siehe linke Spalte) waren ringförmig von C16 umgeben, was ebenfalls auf eine Affinität zu DNA schließen lässt.

Darüber hinaus ließen sich auch im vorwiegend kernnahen Zytoplasma Akkumulationen unterschiedlicher Anzahl beobachten, die an Intensität den intranukleären vergleichbar waren. Bereits deutlich schwächer ausgeprägt zeigten sich zytoskelettartige Stränge (siehe linke Spalte), die sich teilweise über die gesamte Länge der Zelle erstreckten und vornehmlich an deren Rändern lokalisiert waren. Es bestand eine starke Ähnlichkeit mit einer spezifischen Färbung von Aktin-Stressfasern.

Die dritte Abstufung in der Intensität bildete die Proteinverteilung innerhalb des übrigen Zytoplasmas, die von Zelle zu Zelle wechselnd homogen bis grobkörnig erschien.

Innerhalb 3 bzw. 6 h nach Infektion fixierter Zellen lies sich keine Ähnlichkeit mit Aktin-Stressfasern mehr feststellen. Die übrige zytoplasmatische Verteilung zeigte sich stärker kondensiert.

Ebenfalls im Zytoplasma sowie zusätzlichen Kernbereichen detektierbar war das Protein **M1** (siehe Abbildung 5.6.1e)). In seinem Fall ließen sich intensive Akkumulationen erkennen, die manchmal auch intranukleär, jedoch weit mehrheitlich in den kernnahen zytoplasmatischen Gebieten lokalisiert waren und teilweise an eine spezifische Färbung des Golgi-Apparats erinnerten. Innerhalb des verbleibenden Zytoplasmas war die Proteinverteilung wiederum fein- bis grobkörnig; eine Abhängigkeit der beschriebenen Phänomene von einer nach der Transfektion durchgeführten Infektion war nicht zu beobachten.

Das Protein **M2** (siehe Abbildung 5.6.1f)) zeigte sich dagegen ausschließlich in kernnahen Arealen des Zytoplasmas. Innerhalb feingliedriger, den Kern umgebender Linien ließen sich oft längliche, teils übereinander gestapelte Strukturen beobachten, die sich in puncto Breite wie auch Intensität auffallend von der übrigen Färbung abhoben. Waren die grün dargestellten Virus-Partikel in 3 h nach Infektion fixierten Zellen noch lediglich in der unmittelbaren

Umgebung der beschriebenen Bereiche angesiedelt, so kam es 6 h nach Infektion bereits zu vermehrten Kollokalisierungen (siehe weiß ausgefüllte Pfeilspitzen in der rechten Spalte). Ebenfalls 6 hpi sind in f) die kernnahen Überlagerungen von Virus- und DAPI-Färbung (siehe weiß umrandete Pfeilspitze) gut zu erkennen, die durch die DNA-haltigen viralen Fabriken hervorgerufen wurden. In allen drei Präparaten wies die subzelluläre Verteilung des Proteins M2 eindeutige Ähnlichkeit mit einer spezifischen Färbung des Golgi-Apparats und des endoplasmatischen Retikulums (ER) auf.

Das vom **OLR 037** codierte Protein (siehe Abbildung 5.6.1 g)) schließlich war hinsichtlich seiner intrazellulären Lokalisation von einer bemerkenswerten Inkonstanz gekennzeichnet. Allen Zellen gemeinsam waren zahlreiche, verstreut liegende Akkumulationen, die den Kern zumeist aussparten und deren Durchmesser, teils auch innerhalb der selben Zelle, beträchtlichen Schwankungen unterlag. Die kleineren Konglomerate erreichten dabei eine Größe von teils unter 1 μm und erstreckten sich bis in die Peripherie, während die größeren eine Tendenz zur kernnahen Lokalisation zeigten. Die Verteilung innerhalb des übrigen Zytoplasmas reichte dabei von nicht vorhanden bis homogen (siehe linke Spalte). Im Fall des vom OLR 037 codierten Proteins gab es wiederum keinerlei Anhaltspunkte für jegliche Einflussnahme einer Infektion mit MVA F6 auf die beschriebene Proteinverteilung.

5.6.2 Kollokalisationsstudien der Proteine C14, C15, C16, M1 und M2 mittels Immunfluoreszenz nach Kotransfektion bzw. spezifischer Kompartiment-Färbung

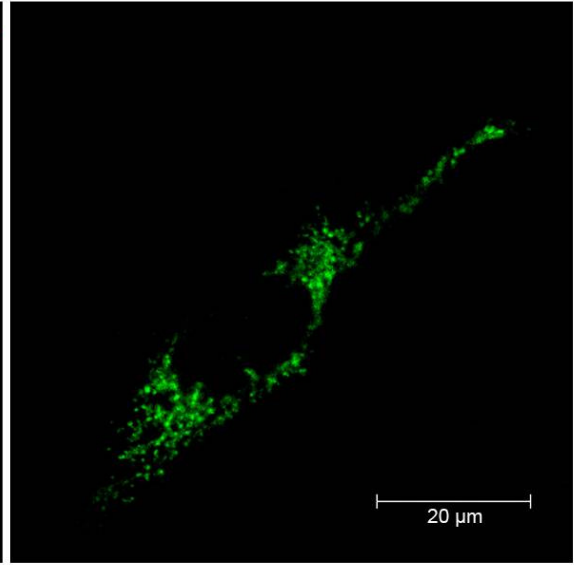
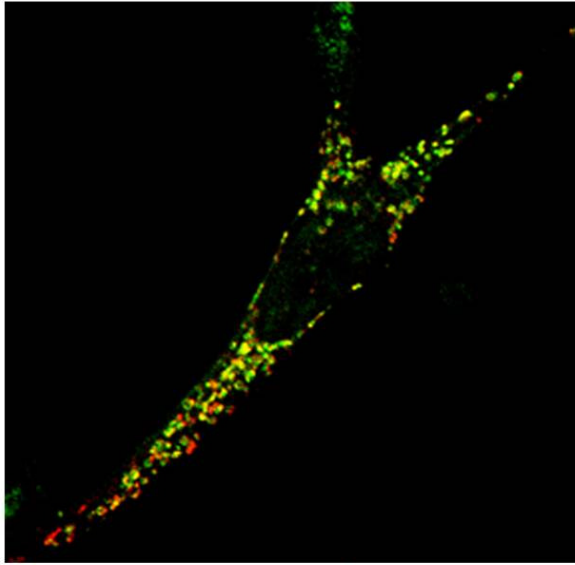
Im Abschnitt 5.6.1 zeichnete sich für einige Gene eine erhebliche Ähnlichkeit zwischen der Verteilung des entsprechenden Proteins und dem charakteristischen Erscheinungsbild bestimmter Zellorganellen ab. Im folgenden Abschnitt werden die für die betreffenden Proteine durchgeführten Kollokalisationsstudien geschildert. Es handelt sich hierbei im Einzelnen um C14 und C15 mit fraglicher Lokalisation innerhalb der Mitochondrien, C16 mit unklarer Kollokalisation mit F-Aktin und M1 bzw. M2 mit potentieller Lokalisation innerhalb des Golgi-Apparats. Die Kollokalisationsstudien erfolgten nach Inkubation mit *Rhodamine-Phalloidin* (F-Aktin-Färbung) und *MitoTracker[®] Red CMXRos* (Mitochondrien-Färbung) bzw. Kotransfektion mit dem Plasmid pEYFP-Golgi (CLONTECH Laboratories, USA), das für ein spezifisch in den medialen Golgi-Apparat translozierendes Protein codiert.

In der Abbildung 5.6.2 sind wiederum repräsentative Aufnahmen einzelner Zellen dargestellt.

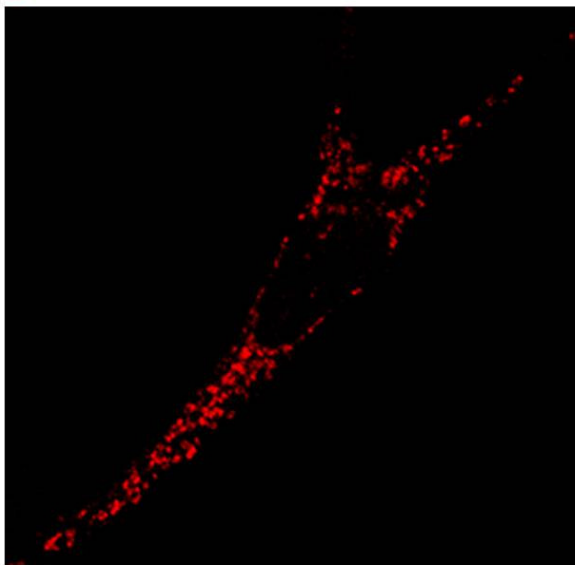
a)

**MitoTracker
C14L-mycHIS**

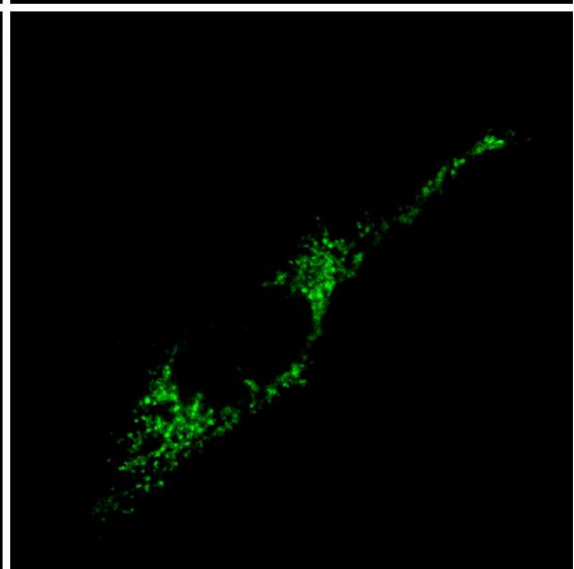
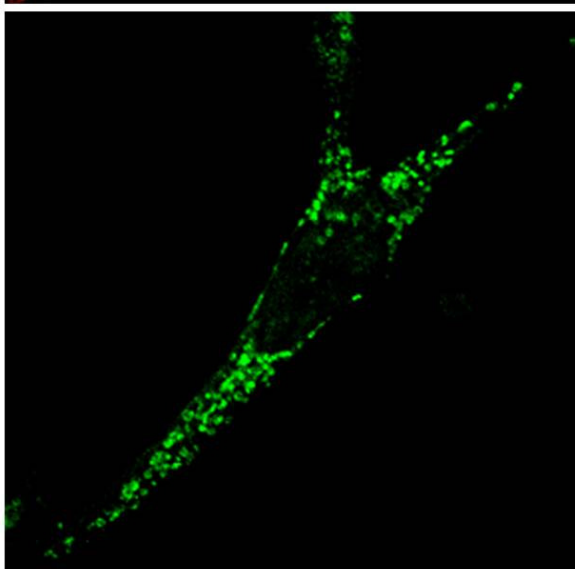
MitoTracker



anti-myc



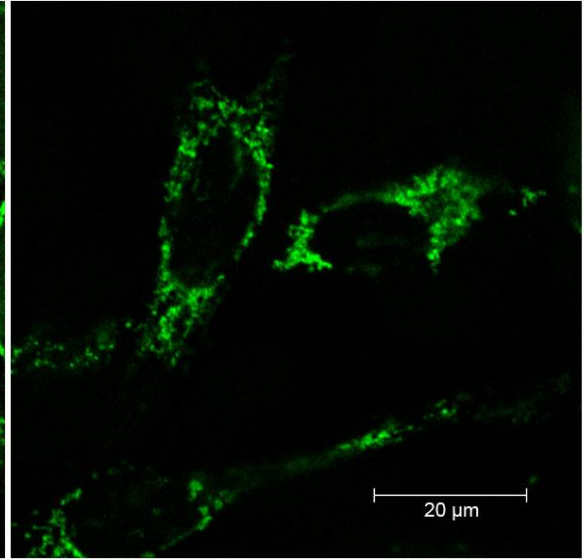
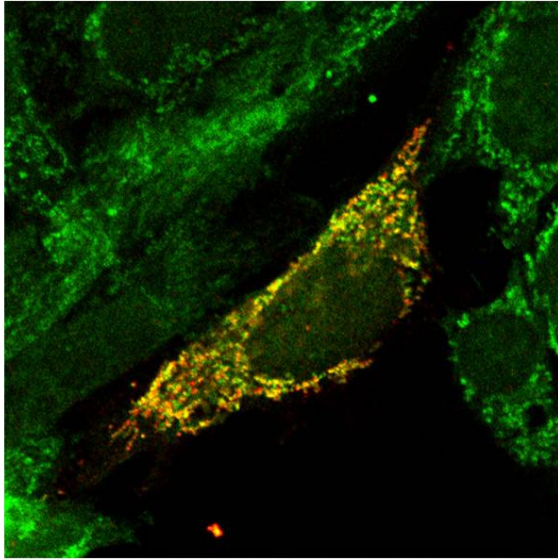
Mitochondrien



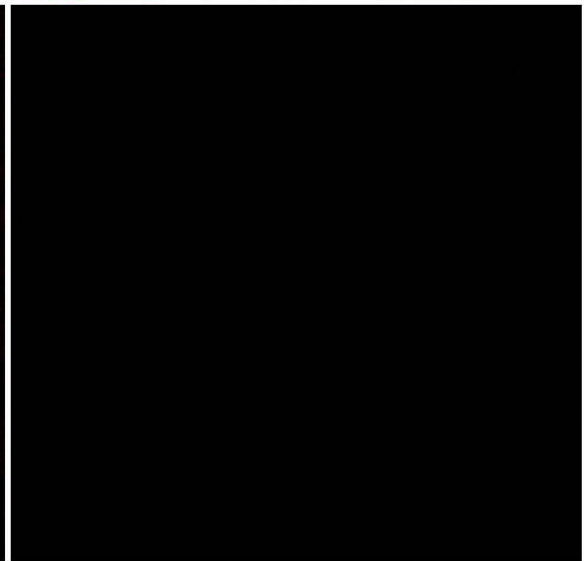
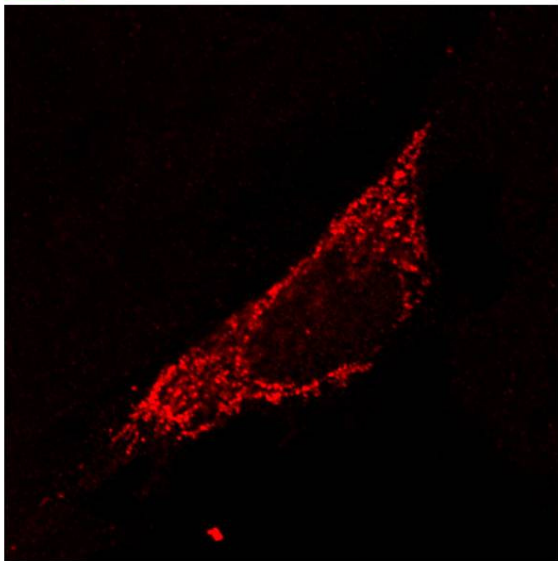
b)

**MitoTracker
C15L-mycHIS**

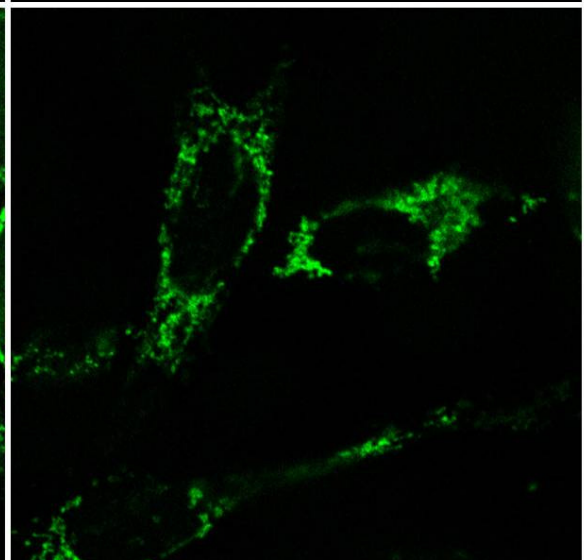
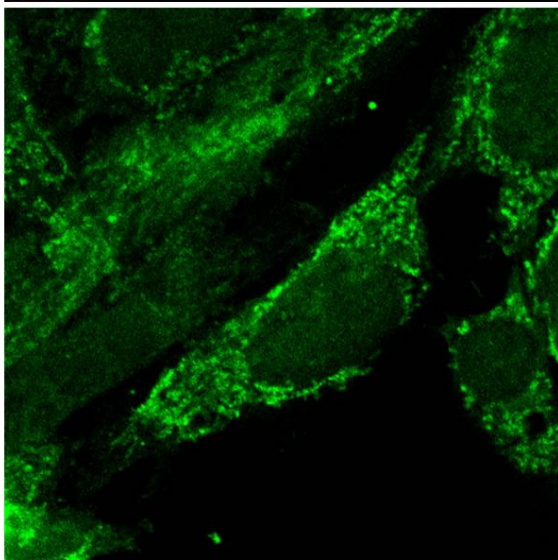
MitoTracker



anti-myc



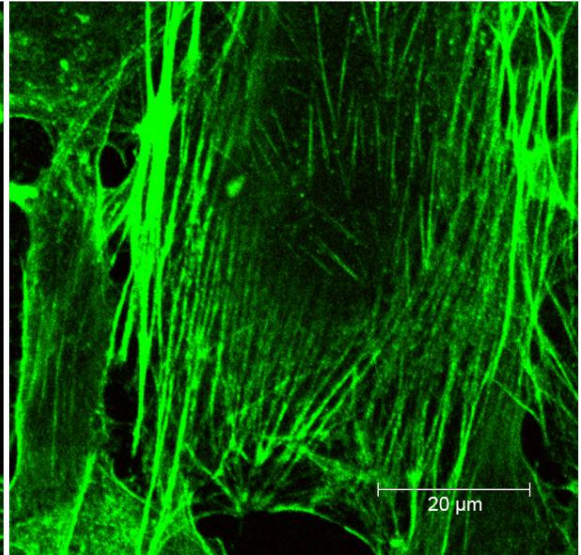
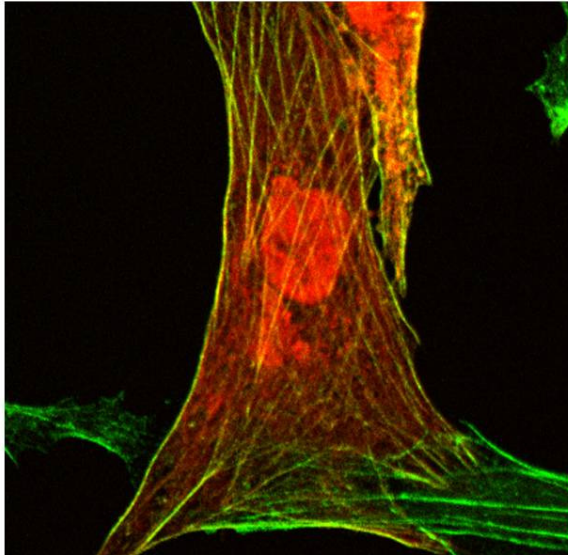
Mitochondrien



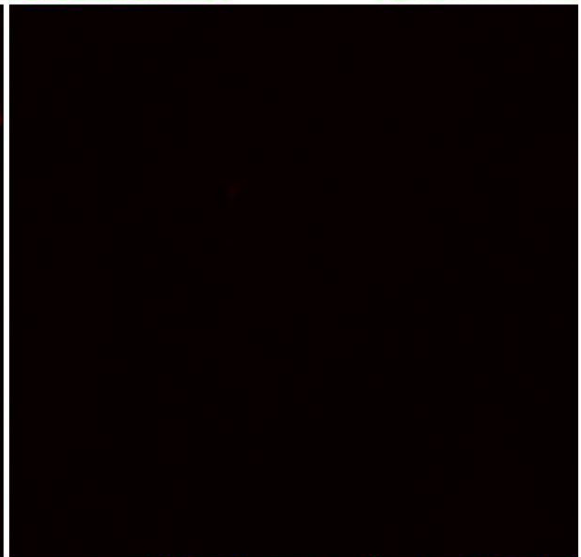
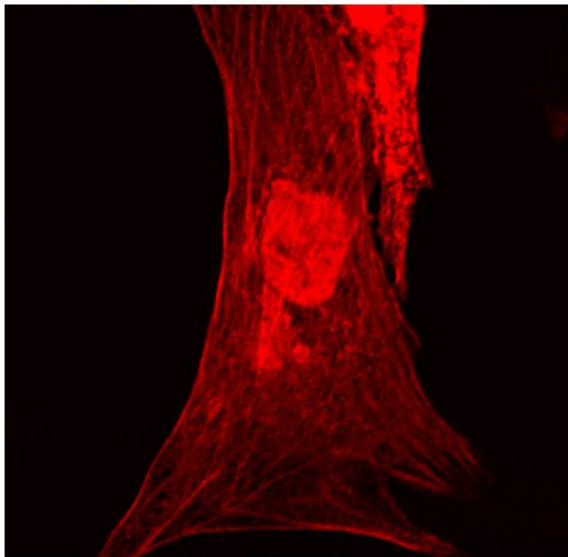
c)

Rhodamine-Phalloidin
C16L-mycHIS

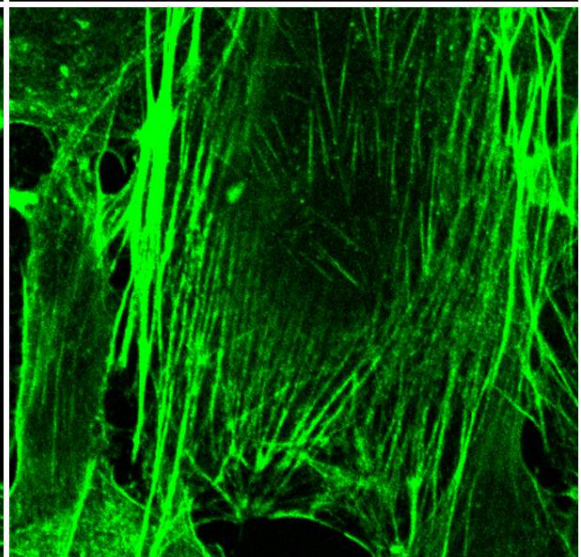
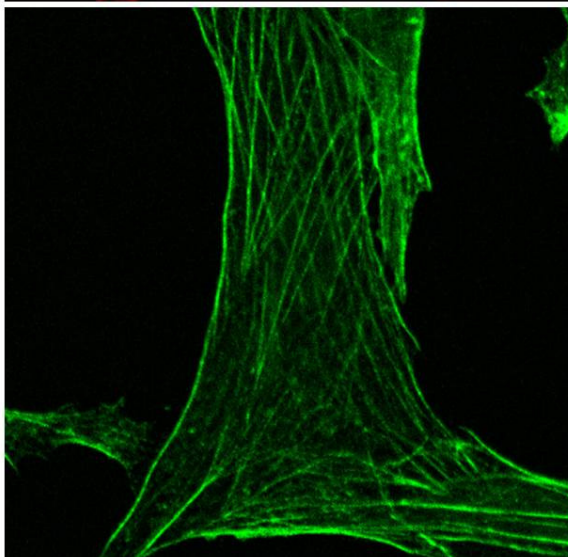
Rhodamine-Phalloidin



anti-myc



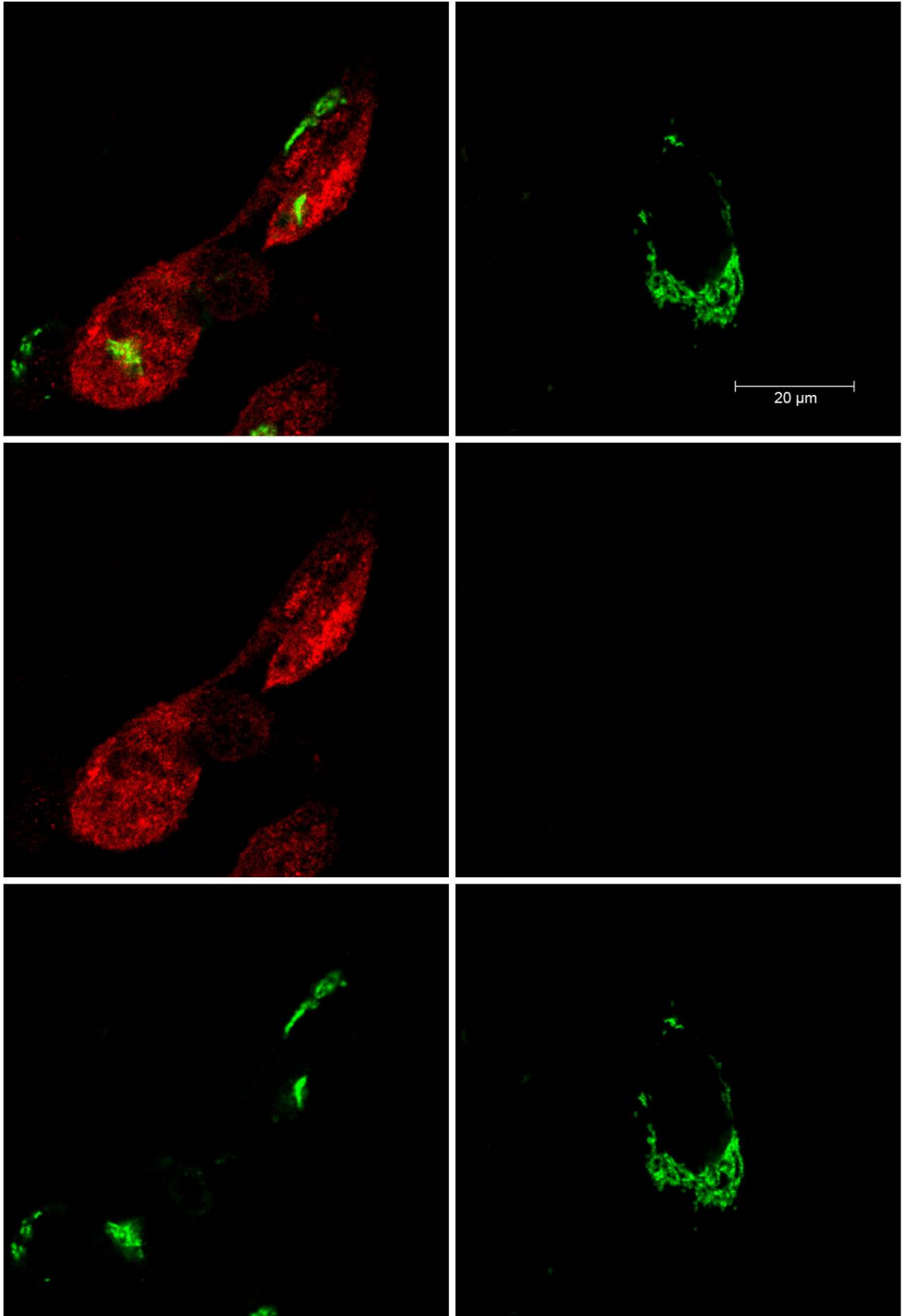
F-Aktin



d)

**pEYFPGolgi+
M1L-mycHIS**

pEYFPGolgi



e)

pEYFPGolgi+
M2L~mycHIS

pEYFPGolgi

anti-myc

trans-medialer Golgi-Apparat

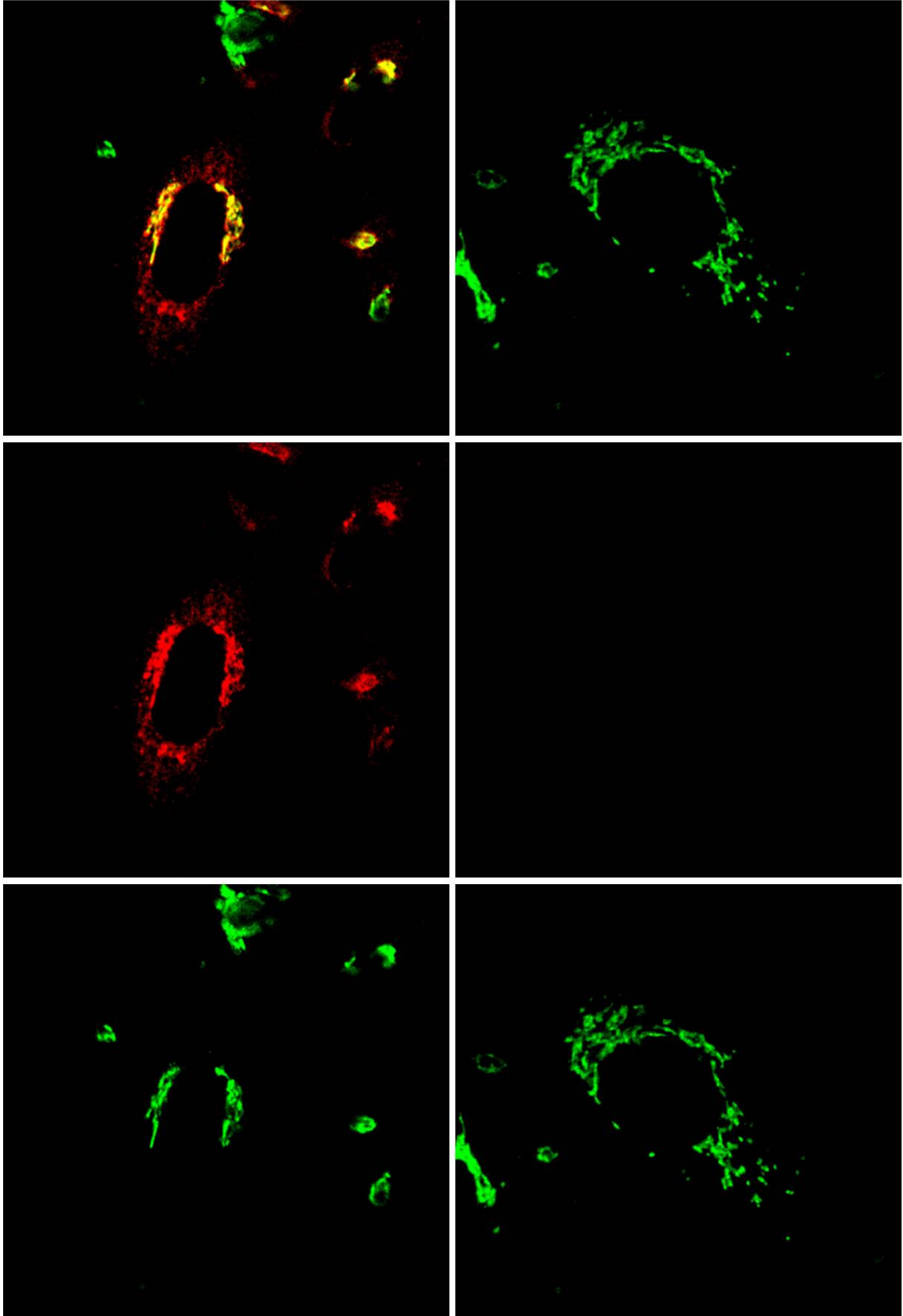


Abbildung 5.6.2: Kolokalisationsstudien der Proteine C14, C15, C16, M1, und M2 in BHK-Zellen nach Kotransfektion bzw. spezifischer Kompartiment-Färbung. In **a)** und **b)** erfolgte die gezielte Färbung der Mitochondrien. Zu diesem Zweck wurden die mit pcDNA-C14L-mycHis- bzw. pcDNA-C15L-mycHis-transfizierten Zellen vor der Fixierung 30 min mit *MitoTracker® Red CMXRos* (300nM) inkubiert. Als Spezifitätskontrolle der AK dienten untransfizierte, mit *MitoTracker® Red CMXRos* gefärbte Zellen, die mit primärem und sekundärem AK inkubiert wurden (siehe jeweils rechte Spalte). Die spezifische Färbung des F-Aktins pcDNA-C16L-mycHis-transfizierter Zellen in **c)** erfolgte anhand von *Rhodamine-Phalloidin* (1:200). Als Spezifitätskontrolle der AK dienten untransfizierte, mit *Rhodamine-Phalloidin* gefärbte Zellen, die mit primärem und sekundärem AK inkubiert wurden (siehe rechte Spalte). Die Abbildungen **d)** und **e)** zeigen pcDNA-M1L-mycHis- bzw. pcDNA-M2L-mycHis-transfizierte Zellen nach einer Kotransfektion mit dem Plasmid pEYFP-Golgi (CLONTECH *Laboratories*, USA; Emissionsmaximum: 527 nm), die in einer spezifischen Färbung des trans-medialen Golgi-Apparats resultierte. Als Spezifitätskontrolle der AK dienten mit lediglich pEYFP-Golgi transfizierte Zellen, die mit primärem und sekundärem AK inkubiert wurden (siehe wiederum rechte Spalte). In **a)** bis **e)** wurde als primärer AK jeweils der anti-myc-tag (Maus, 1:250) eingesetzt, als sekundärer AK kam in **a)**, **b)**, **c)**, und **e)** der anti-Maus Cy5 (1:500) und in **d)** der anti-Maus FITC (1:100) zur Anwendung. Der Maßstabsbalken entspricht jeweils 20µm.

Die unter **a)** und **b)** dargestellten Bildtafeln zeigen sowohl für C14 als auch C15 eindeutige Kolokalisationen mit Mitochondrien auf, die jeweils links oben in der Bildtafel als gelbe Überlagerungen erkennbar sind.

Auch die Bildtafel in **c)** offenbart ausgeprägte Überlagerungen, anhand derer sich die feinen, netzartigen Stränge in der C16-Färbung auf Kolokalisationen mit F-Aktin zurückführen lassen. Während sich für das Protein M1 eine spezifische Überlagerung mit dem trans-medialen Golgi-Apparat zweifellos ausschließen lässt, kommt es im Fall von M2 wiederum zu eindeutigen Kolokalisationen. Auffällig ist in diesem Fall, dass die M2-Färbung offenkundig noch erheblich über die spezifische Färbung des trans-medialen Golgi-Apparats hinausgeht. Die im Abschnitt 5.6.1 beschriebenen zarten Linien sind von der Golgi-Färbung weitestgehend ausgespart; die Überlagerungen erstrecken sich explizit auf die meist länglichen Strukturen gesteigerter Intensität und Breite.

Die Ergebnisse der Lokalisations- und Kolokalisationsstudien bezüglich der Proteine C12, C14, C15, C16, M1, M2 und des vom OLR 037 codierten Proteins sind in der Abbildung 5.6.3 tabellarisch zusammengefasst.

Protein	Nukleus	Zytoplasma		post Infektion	Kokalisation
		akkumuliert	verteilt		
C12	gleiche Intensität wie Zytoplasma	–	sehr intensiv; homogen	unverändert	–
C14	–	Ketten wurmartiger Strukturen	–	unverändert	Mitochondrien
C15	schwach; homogen	Ketten wurmartiger Strukturen	schwach; homogen	unverändert	Mitochondrien
C16	akkumuliert in chromatinarmen Bereichen	netzartig; an den Zellrändern verstärkt	homogen bis grobkörnig	keine netzartige Akkumulation; zytoplasmatisch kondensiert	F-Aktin
M1	detektierbar; manchmal akkumuliert	v.a. perinukleär; wechselnde Größe	homogen bis grobkörnig	unverändert	–
M2	–	perinukleär gestapelt; 2-Stufen-Intensität	–	6hpI Kokalisation Protein/Virus	trans-medialer Golgi-Apparat
037	teilweise detektierbar; selten akkumuliert	perinukleär größer, peripher kleiner	wechselnd	unverändert	–

Abbildung 5.6.3 Übersicht der subzellulären Verteilung von C12, C14, C15, C16, M1, M2 und des vom OLR 037 codierten Proteins. Die Tabelle fasst die Ergebnisse der Abschnitte 5.6.1 und 5.6.2 zusammen. Innerhalb des Zytoplasmas wurde zwischen „akkumuliert“ und scheinbar diffus („verteilt“) unterschieden.

5.7 Das sekretorische Protein M2 inhibiert die ERK-2-Phosphorylierung von außen

In den vorangehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass das Protein M2 N-glykosyliert ist (siehe 5.5), innerhalb des trans-medialen Golgi-Apparats pcDNA-M2L-mycHis-transfizierter BHK-Zellen kumuliert (siehe 5.6.2) und in den Überstand transfizierter 293-Zellen sekretiert wird (siehe 5.4).

Weiterhin wurde durch Gedey *et al.* (2005) bereits beschrieben, dass M2 die VACV-induzierte, NFK-B-vermittelte Immunantwort in 293T Zellen über eine Inhibition der ERK-2-Phosphorylierung signifikant herabsetzt. Um den hierfür verantwortlichen Wirkungsmechanismus zu ermitteln ist es folglich von grundlegendem Interesse, ob M2 vorwiegend intra- oder extrazellulär angreift.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde in 293T Zellen anhand von TPA/PMA (*Phorbol-12-myristate-13-acetate*, Calbiochem/Merck, Darmstadt) eine Phosphorylierung von ERK-2

induziert. Nachfolgend wurde die inhibitorische Wirkung von pcDNA-M2L-mycHis-Transfektion mit der einzig durch Behandlung mit dem Überstand pcDNA-M2L-mycHis-transfizierter Zellen erzielten Wirkung verglichen. Die Ergebnisse der Western Blot-Analyse sind in der Abbildung 5.7.1 dargestellt.

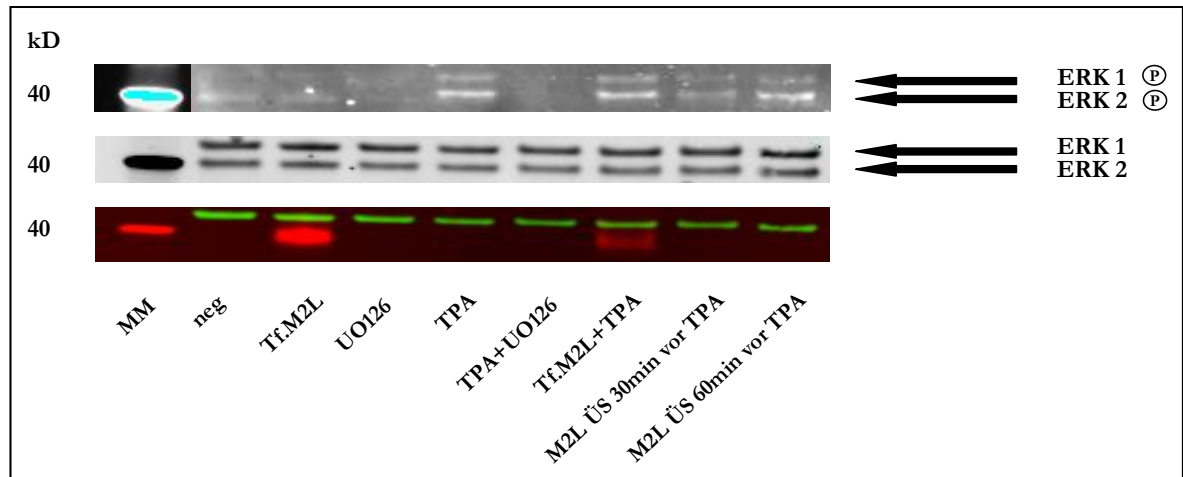


Abbildung 5.7.1: Western Blot-Analyse des inhibitorischen Effekts von M2 auf die mittels TPA induzierte ERK2-Phosphorylierung in 293T Zellen. Ein Ansatz wurde 48 h vor TPA-Behandlung mit pcDNA-M2L-mycHis transfiziert. Ein anderer transfizierter Ansatz blieb als Kontrolle ohne TPA-Behandlung. In zwei weiteren Ansätzen wurde 30 bzw. 60 min vor TPA-Behandlung jeweils 40 µg des Überstands pcDNA-M2L-mycHis-transfizierter Zellen auf die Zellen gegeben. Dieser Überstand war zuvor hinsichtlich seines M2-Gehalts überprüft worden (siehe Abbildung 5.4.1 c)). Als negativ-Kontrollen dienten untransfizierte, unbehandelte bzw. untransfizierte, mit TPA behandelte Zellen. Als positiv-Kontrollen wurden mit dem kommerziellen Inhibitor UO126 inkubierte, TPA-behandelte Zellen verwendet. Im unteren Blot wurde M2 mittels anti-His (1:10 000) detektiert. Als Ladekontrolle wurde zelluläres β-Aktin (1:10 000), sowie im mittleren Blot ERK1/2 (1:1000) angefärbt. Im oberen Blot wurde durch den anti-phospho-p44/42 MAP (1:1000) für jeden Ansatz die Menge an phosphoryliertem ERK1/2 bestimmt. UO 126 wurde 30 min vor TPA auf die Zellen gegeben. Die Inkubation mit TPA erfolgte jeweils für 10 min bei 37 °C. Pro Geltasche wurden jeweils 30µg Gesamtproteinlösung aufgetragen. Marker: *Magic Mark™ XP Western Protein Standard*.

Stellt man zunächst die ERK2 P -Bande des vor TPA-Behandlung transfizierten Ansatzes und des untransfizierten, TPA-behandelten Kontrollansatzes gegenüber, so lässt sich hierbei keinerlei Unterschied in der Intensität erkennen. Die scheinbar ausbleibende Inhibition der ERK2-Phosphorylierung könnte jedoch auch durch die im unteren Blot überprüfte, vergleichsweise geringe M2-Produktion bedingt sein. Auffällig ist dagegen, dass die Inkubation der Zellen mit M2-haltigem Überstand - vor allem 30 min vor TPA-Behandlung - einen eindeutigen Verlust an Bandenintensität des ERK2 P zur Folge hat. Hieraus lässt sich ableiten, dass sich die M2-vermittelte Inhibition der ERK2-Phosphorylierung in 293T Zellen zumindest partiell über einen extrazellulär eingeleiteten Wirkungsmechanismus vollzieht.

5.8 Analysen einer potentiell antiapoptotischen Wirkung der Gene C12L, C14L und C15L mittels Durchflusszytometrie

Im Abschnitt 5.6.2 konnte für die Proteine C14 sowie C15 eine subzelluläre Lokalisation innerhalb der Mitochondrien transfizierter BHK-Zellen gezeigt werden. Neben der zentralen Schaltstelle im Energiestoffwechsel haben die Mitochondrien eukaryontischer Zellen auch eine Schlüsselrolle bezüglich des programmierten Zelltods (Apoptose) inne (zum Überblick siehe Wang, 2001 oder 2.5.1). Um durch die Erhaltung der Wirtszelle ihre eigene Reproduktion zu sichern, haben deshalb zahlreiche Viren die unterschiedlichsten Strategien entwickelt, um Apoptose unter anderem auf Ebene der Mitochondrien zu blockieren (Hay and Kannourakis, 2002). Bekannte vacciniavirale Beispiele für Inhibitoren mitochondrialer Apoptose sind F1L, E3L und N1L (siehe 2.5.2).

Auch das innerhalb der verschiedenen Orthopockenviren stark konservierte Gen SPI-1 (C12L) wurde bereits mit Apoptoseinhibition in Verbindung gebracht. Nachdem SPI-1 sowohl auf humanen Lungenzellen (A549) als auch auf Schweinenierenzellen (PK15) für das *Rabbitpox Virus* (RPV), einen nahen Verwandten des VACV CVA, eine *host range*-Funktion besitzt (Ali et al., 1994), wurde nachfolgend spekuliert, dass diese auf einem innerhalb von A549-Zellen nachgewiesenen antiapoptotischen Effekt des RPV-SPI-1 beruht (Brooks et al., 1995).

Aufgrund dieser Anhaltspunkte sollten die Gene C12L (SPI-1), C14L und C15L aus CVA 152 hinsichtlich eines möglichen antiapoptotischen Effekts nach transienter Plasmidtransfektion untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden zunächst BHK-Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Um zu überprüfen, ob C14L und C15L eventuell nur in Kombination einen antiapoptotischen Effekt aufweisen, wurden in einem Ansatz pcDNA-C14L-mycHis und pcDNA-C15L-mycHis kotransfiziert. 18 h post Transfektion erfolgte die Induktion mitochondrial vermittelter Apoptose über Staurosporin, das die Translokation von endogenem Bax zu den Mitochondrien mit nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C auslöst (Tafani et al., 2002). Anschließend folgte eine Doppel-AK-Färbung der Zellen. Hierbei war ein AK gegen den myc-tag gerichtet, wodurch transfizierte von nicht transfizierten Zellen unterschieden werden konnten. Mithilfe des anderen, gegen aktive Caspase-3 gerichteten AKs, konnten zusätzlich apoptotische von nicht apoptotischen Zellen diskriminiert werden (siehe Abbildung 5.8.1).

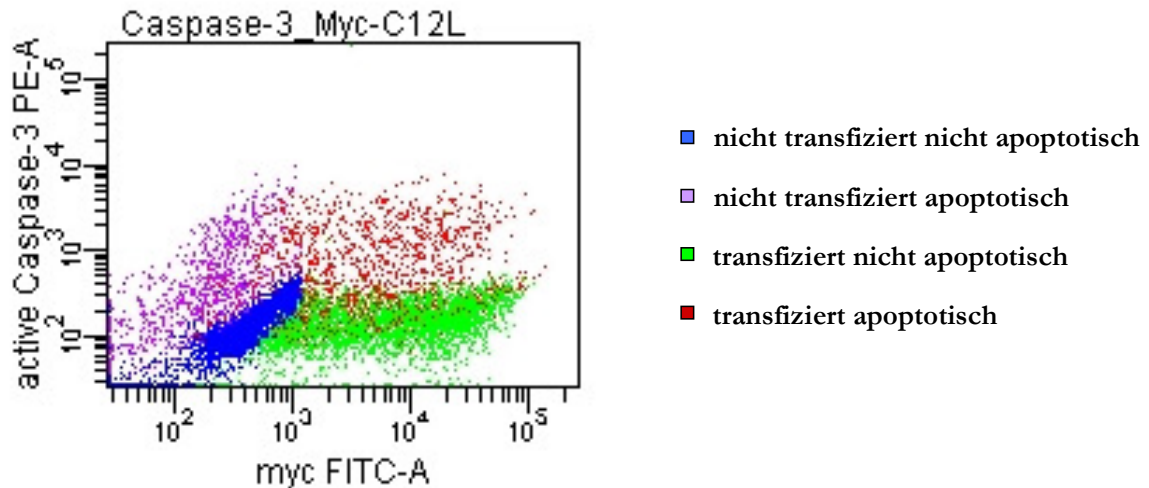
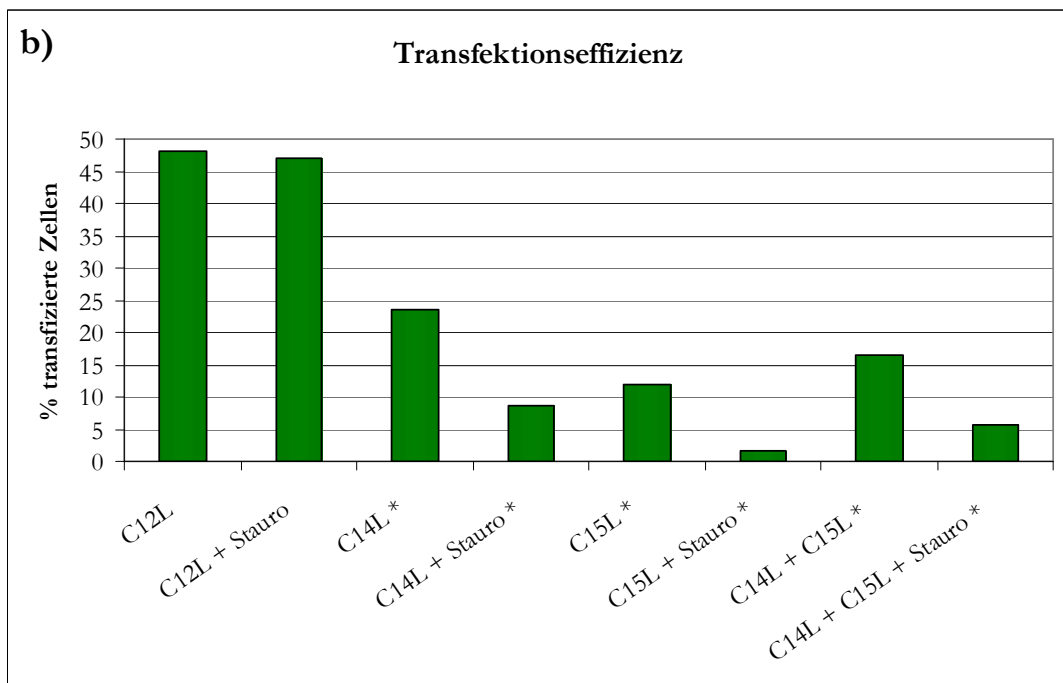
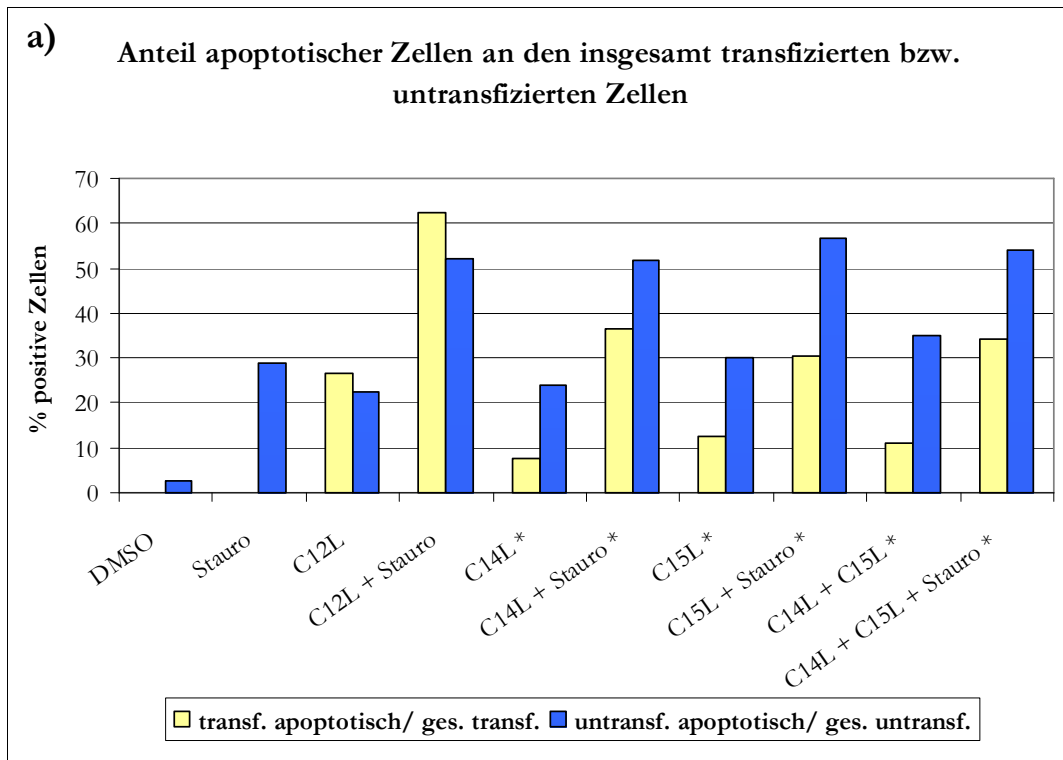


Abbildung 5.8.1: Auswertung der Doppelfärbung gegen myc und aktivierte Caspase-3 am Beispiel pcDNA-C12L-mycHis-transfizierter Zellen. Die farbigen Punkte innerhalb des Koordinatensystems repräsentieren jeweils eine mittels Durchflusszytometrie analysierte Zelle. Jedem dieser Punkte kann hierbei auf der x- bzw. y-Achse die Intensität der myc-Färbung bzw. der aktivierte-Caspase-3-Färbung zugeordnet werden. Anhand dieser Intensitäten wurden die Zellen für beide Färbungen entweder als positiv oder negativ gewertet. Hieraus ergeben sich 4 mögliche Kombinationen, die in der Abbildung durch die unterschiedlichen Farben symbolisiert werden. Die aktive-Caspase-3-Färbung erfolgte mithilfe des direkt Fluorophor-gekoppelten anti-aktive Caspase-3 PE (20µl/10⁶ Zellen). Zur myc-Färbung wurde der anti-myc (Maus, 1:250), sowie als sekundärer AK der anti-Maus FITC (1:100) verwendet.

Anhand dieser Doppelfärbung war es somit möglich, innerhalb des selben Ansatzes den Anteil apoptotischer und transfizierter an der Gesamtheit der transfizierten Zellen mit dem Anteil apoptotischer und nicht transfizierter an der Gesamtheit der nicht transfizierten Zellen zu vergleichen. Die beiden Gesamtheiten unterschieden sich hierbei ausschließlich bezüglich des Merkmals „transfiziert“, da sie, aus dem selben Ansatz stammend, exakt identischen Bedingungen ausgesetzt waren. Falls nun das jeweils transfizierte Gen einen inhibitorischen Einfluss auf die mitochondrial vermittelte Apoptose hätte, so sollte sich beim Vergleich der transfizierten mit den nicht transfizierten Zellen des selben Ansatzes für die transfizierten ein signifikant geringerer Anteil apoptotischer (das heißt aktive Caspase-3 positiver) Zellen ergeben, als im Fall der nicht transfizierten.

In der Abbildung 5.8.2 sind die Ergebnisse des Experiments grafisch dargestellt. Die mit einem * gekennzeichneten Spalten geben jeweils die Mittelwerte eines Doppelansatzes wieder. Für die zugrunde liegenden Daten der Durchflusszytometrie siehe Anhang.



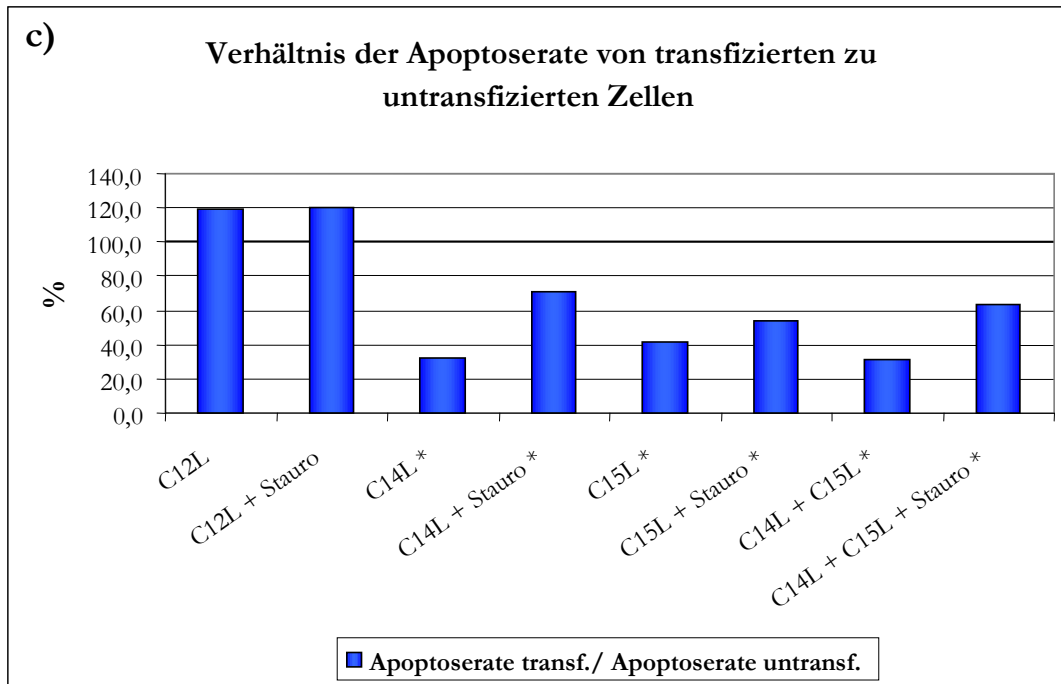


Abbildung 5.8.2: Durchflusszytometrie transfizierter Zellen nach Apoptoseinduktion durch Staurosporin. BHK-Zellen wurden mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert und 18 h später mit in DMSO gelöstem Staurosporin behandelt. Nach 6stündiger Inkubation erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen. **a)** Der Anteil apoptotischer Zellen an den insgesamt transfizierten bzw. untransfizierten ist für jeden Ansatz in Prozent dargestellt (blauer bzw. orangener Balken). Die mit einem * gekennzeichneten Ansätze wurden jeweils doppelt durchgeführt. Die Balken in a), b) und c) zeigen in diesen Fällen jeweils Mittelwerte. Das Diagramm in **b)** ordnet jedem Ansatz den Anteil transfizierter Zellen an den insgesamt enthaltenen zu (Transfektionseffizienz). In **c)** wurde jeweils innerhalb des selben Ansatzes die Apoptoserate der transfizierten Zellen in Relation gesetzt zur Apoptoserate der untransfizierten. Die Resultate sind prozentual dargestellt. Die Färbung erfolgte mittels anti-*myc* (Maus, 1:250) und anti-aktive-Caspase-3 PE-A (20 μ l pro 10^6 Zellen). Als sekundärer AK zur *myc*-Färbung wurde der anti-Maus-FITC (1:100) verwendet. Als Kontrolle dienten untransfizierte, mit Staurosporin bzw. lediglich DMSO behandelte Zellen, sowie für jedes Gen ein transfizierter, unbehandelter Ansatz. Die Spezifitätskontrolle des sekundären AKs bestand aus mit pcDNA-C14L-mycHis transfizierten Zellen, die nur mit anti-Maus-FITC (1:100) behandelt worden waren.

Auffällig ist zunächst, dass innerhalb der Ansätze ohne nachfolgende Staurosporinbehandlung bereits relativ viele Zellen apoptotisch sind (ca. 20-35%; siehe Abbildung 5.8.2 a)). Im Gegensatz hierzu ist die Apoptoserate der untransfizierten, mit DMSO behandelten Zellen sehr gering (2,8%). Dieser Effekt ist wahrscheinlich dem Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 zuzuschreiben.

Beim Vergleich der transfizierten (*myc*-positiven) mit den untransfizierten Zellen innerhalb des selben Ansatzes zeigte sich für C12L sowohl mit als auch ohne Staurosporinbehandlung eine um ca. 20% höhere Apoptoserate im Fall der transfizierten Zellen (siehe Abbildung 5.8.2 c)). Unter den gegebenen Umständen ließ sich somit kein antiapoptotischer Effekt für das überexprimierte C12L nachweisen.

Nach pcDNA-C14L-mycHis-Transfektion dagegen gingen von den transfizierten Zellen deutlich weniger in Apoptose, als aus dem selben Ansatz stammende untransfizierte Zellen.

Die Apoptoserate der transfizierten Zellen erreichte hierbei nur 70,5% der Apoptoserate der untransfizierten Zellen nach Staurosporininduktion bzw. 32% ohne Staurosporininduktion.

Im Fall von C15L lässt die ausgesprochen geringe Transfektionseffizienz (1,75%) für den mit Staurosporin behandelten Doppelansatz keine Interpretation zu. Allerdings sind auch hier bei der Probe ohne Staurosporininduktion anteilig wesentlich weniger transfizierte Zellen apoptotisch, als untransfizierte. Die Apoptoserate der transfizierten Zellen betrug in diesem Fall 41,6% der Apoptoserate der untransfizierten.

Auch innerhalb der mit pcDNA-C14L-mycHis und pcDNA-C15L-mycHis kotransfizierten Ansätze war der Anteil apoptotischer Zellen an den transfizierten erheblich geringer, als an den untransfizierten. Die Apoptoserate der transfizierten Zellen erreichte hierbei nur 63,4% der Apoptoserate der untransfizierten Zellen nach Staurosporininduktion bzw. 30,9% ohne Staurosporininduktion.

Zusammenfassend ergeben sich für die Gene C14L und C15L erste Hinweise auf eine Inhibition apoptotischer Prozesse, die allerdings aus verschiedenen Gründen zunächst zurückhaltend zu bewerten sind (siehe 6.2).

6 Diskussion

Das Modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) gilt als vielversprechender Kandidat eines Vektor-Vakzins sowohl gegen zahlreiche infektiöse Krankheiten als auch in der Tumor-assoziierten Immunotherapie (Amato, 2007; Sutter and Staib, 2003). Um die Eigenschaften des MVA in dieser Hinsicht weiter optimieren zu können, ist es notwendig, die genetischen Grundlagen seiner hochgradigen Attenuierung aufzuklären. Innerhalb von Wachstumsuntersuchungen zwischen zwei Vorgängern des MVA, CVA 152 und CVA 386, konnte gezeigt werden, dass sich humane HeLa Zellen gegenüber CVA 152 permissiv verhalten und gegenüber CVA 386 nur noch semipermissiv (Zwilling 2007, Diplomarbeit Universität Frankfurt a.M.). Im Rahmen eines Sequenzvergleiches der Genome von CVA 152 und CVA 386 konnten u.a. die Gene C12L, C14L, C15L und C16L der Deletion I und die Gene M1L, M2L und der OLR 037 der Deletion II als potentiell verantwortlich für die eingeschränkte Replikationsfähigkeit von CVA 386 auf HeLa Zellen identifiziert werden. In der Folge wurden von den sieben genannten Genen/OLR Expressions- und Lokalisationsstudien, sowie gegebenenfalls weiterführende Untersuchungen durchgeführt. Die Lokalisationsstudien innerhalb 24hpT MVA-infizierter Zellen sollten erste Hinweise auf mögliche virale Interaktionspartner z.B. innerhalb der *viral factories* geben. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Proteine, bedingt durch den Versuchsaufbau, zum Zeitpunkt der Infektion bereits innerhalb abgeschlossener Zellkompartimente befanden und für einen möglichen Interaktionspartner nicht mehr erreichbar waren.

Zur Interpretation der erhaltenen Ergebnisse wurde gegebenenfalls der Status der Gene innerhalb von Vorgängern des CVA 152 oder anderen Vacciniaviren miteinbezogen. Die hierzu durchgeführten Sequenzvergleiche sind im Anhang dargestellt.

6.1 Analysen des Gens C12L/SPI-1 bezüglich Expression, Lokalisation und potentieller Apoptoseinhibition

Während das bezüglich der Gene C14L, C15L und C16L verfügbare Wissen bis dato kaum über deren Existenz hinausgeht, stand das innerhalb der verschiedenen Orthopockenviren stark konservierte (Kettle et al., 1995) Gen C12L bereits zu Beginn der neunziger Jahre im Mittelpunkt des Interesses. So konnte eine strukturelle Ähnlichkeit von C12 mit Proteinen der *plasma serin protease inhibitor (Serpin)*-Familie festgestellt werden (Kotwal and Moss, 1989).

Hieraus resultierend hat sich in der Vergangenheit innerhalb der Orthopockenviren für die dem C12 homologen Proteine die Bezeichnung SPI-1 durchgesetzt. In der Folge konnte das SPI-1-Gen als essentiell für die Replikation von RPV in PK-15 Zellen und humanen A549 Zellen charakterisiert werden. Diese HR Funktion des RPV SPI-1 wurde im Anschluss einem innerhalb von A549 Zellen nachgewiesenen antiapoptotischen Effekt (Brooks et al., 1995), sowie der *in vitro* gezeigten Komplexbildung mit der Serin Protease Cathepsin G zugeschrieben (Moon et al., 1999). Neuere Daten geben dagegen Hinweise auf eine Rolle des RPV SPI-1 innerhalb der viralen DNA Replikation (Luttge and Moyer, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Expression des mycHis-tag-gekoppelten Gens C12L/SPI-1 aus CVA 152 innerhalb Plasmid-transfizierter 293T Zellen gezeigt werden. Das resultierende Protein wurde nicht sekretiert oder N-glykosyliert (siehe 5.5) und hatte die anhand der AS-Sequenz berechnete Größe (siehe 5.4). Eine zusätzliche Bande im Polyacrylamid-Gel mit erhöhtem Molekulargewicht (MG) und von wechselnder Intensität weist auf eine mögliche Sumoylierung hin, für die laut *SUMOplotTM prediction* an drei AS-Positionen eine große Wahrscheinlichkeit besteht (siehe 5.3). In der Laserscan Mikroskopie immunfluoreszenzgefärbter Zellen ließ sich eine homogene Verteilung des Proteins innerhalb der gesamten Zelle erkennen, die unabhängig von einer 24hpT durchgeführten Infektion mit MVA-F6 war (siehe 5.6.1). In der Durchflusszytometrie pcDNA-C12L-mycHis-transfizierter und 18hpT mit Staurosporin behandelte BHK-Zellen ergab sich keinerlei inhibitorische Wirkung des SPI-1_{CVA 152} auf die Caspase-3-Aktivierung (siehe Abbildung 5.8.2).

Die für SPI-1_{RPV} innerhalb von A549 Zellen beschriebene Apoptoseinhibition (Brooks et al., 1995) ließ sich somit für das SPI-1_{CVA 152} zumindest innerhalb von BHK-Zellen und mittels unseres Versuchsaufbaus nicht bestätigen. Ebenfalls gab es in der Laserscan Mikroskopie keinerlei Hinweise für eine Beteiligung des SPI-1_{CVA 152} an der viralen DNA-Replikation im Sinne einer verstärkten Interaktion mit Bestandteilen der *viral factories*. Zwar ließen sich einzelne Überlagerungen von Protein- und Virusfärbung erkennen (siehe Abbildung 5.6.1a), angesichts der Verteilung des C12 innerhalb der gesamten Zelle sind derartige Bereiche jedoch wahrscheinlich rein statistisch bedingt.

Auch für das VACV SPI-1 konnte in Untersuchungen mit einer VACV WRΔSPI-1-Deletionsmutante eine HR-Funktion innerhalb von A549 Zellen gezeigt werden. Diese Daten brachten den beobachteten Effekt allerdings vornehmlich mit einer in Abwesenheit von SPI-1 reduzierten Menge an intermediärer und später mRNA in Verbindung (Shisler et al., 1999).

Dennoch erscheint es unwahrscheinlich, dass die Proteine SPI-1_{WR} oder SPI-1_{CVA 152} eine gegenüber SPI-1_{RPV} gravierend veränderte Funktion haben, da ein Sequenzvergleich der drei homologen Gene lediglich Abweichungen in einzelnen AS aufweist (siehe Anhang).

Insbesondere der von Luttge et al. als *reactive center loop* charakterisierte Bereich, der für die inhibitorische Funktion eines Serpins von essentieller Bedeutung ist (Gettins, 2002), zeigt innerhalb von RPV und VACV WR bzw. VACV CVA 152 eine 100%ige Übereinstimmung. Ebenfalls gilt es zu bedenken, dass die antiapoptotische Wirkung des SPI-1_{RPV} vor dem Hintergrund einer Infektion von humanen A549 Zellen beschrieben wurde, während die Untersuchungen des SPI-1_{CVA 152} im Rahmen dieser Arbeit innerhalb transfizierter BHK Zellen durchgeführt wurden.

Um der Funktion des SPI-1 aus CVA 152 näher zu kommen, soll das analoge Protein im weiteren Verlauf hinsichtlich einer potentiellen Sumoylierung untersucht werden. Derartige Modifikationen kommen allerdings bei einer Vielzahl von Proteinen vor, die intrazellulär sehr unterschiedliche Aufgaben haben (Marx, 2005).

6.2 Die Proteine C14 und C15 sind innerhalb der Mitochondrien lokalisiert und geben Hinweise auf eine antiapoptotische Funktion

Die vacciniaviralen Gene C14L und C15L wurden in der Literatur bisher nur marginal beschrieben. Das C15L ist innerhalb des CVA und auch COP Bestandteil des linken ITR (Goebel et al., 1990; Meisinger-Henschel et al., 2007). Dementsprechend existiert innerhalb des rechten ITR ein identischer OLR namens B21R. Ein Sequenzvergleich zeigte jedoch, dass letzterer im Gegensatz zu C15L bereits in CVA 152 deletiert ist.

Sowohl für das C14L-mycHis als auch das C15L-mycHis konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Expression in Plasmid-transfizierten 293T Zellen gezeigt werden (siehe 5.4). Im Fall von C15L zeigte sich in der Western Blot-Analyse eine zusätzliche Bande, die ebenfalls mittels anti-His detektiert werden konnte (siehe Abbildung 5.4.2). Angesichts deren MG von wenig mehr als 20 kDa gegenüber der Größe der Hauptbande von 10,440 kDa könnte die Ursache für diese zweite Bande in der Bildung von Dimeren liegen, die in der SDS-PAGE nicht vollständig getrennt werden konnten. Für beide Proteine konnte ein beschleunigter Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System gezeigt werden, der sich durch den Proteasomeninhibitor Lactacystin herabsetzen ließ (siehe 5.4). Während sich hierbei für das C15 in sowohl 24 als auch 48hpT hergestellten Zellysaten nach Lactacystin-Behandlung deutlich mehr Protein detektieren ließ, konnten derartige, Lactacystin-bedingte Unterschiede in der Bandenintensität im Fall von C14 nur in 48hpT gewonnenen Proben beobachtet werden (siehe Abbildung 5.4.2.). Dies deutet darauf hin, dass die Degradierung des C15 bereits weniger als 24 h nach

erfolgreicher Transfektion begann, während der Abbau des C14 erst zwischen 24 und 48 hpT einsetzte.

Desweiteren konnte eine Kollokalisierung der beiden Proteine mit durch MitoTracker spezifisch angefärbten Mitochondrien gezeigt werden (Abbildung 5.6.2), die für C14 bereits mithilfe des Programms *MITOPROT: Prediction of mitochondrial targeting sequences* prognostiziert worden war (siehe 5.3). Im Fall von C15 zeigte sich außerdem eine homogene Färbung der übrigen Zelle von erheblich geringerer Intensität. Die subzelluläre Verteilung beider Proteine wurde nicht von einer anschließenden MVA-F6 Infektion beeinträchtigt (siehe Abbildung 5.6.1).

Aufgrund der Schlüsselrolle der Mitochondrien innerhalb der Apoptose (siehe 2.5.1) und angesichts zahlreicher viraler Proteine, die an dieser Stelle interferieren (siehe 2.5.2), wurden die Proteine C14 und C15 ferner im Hinblick auf eine mögliche antiapoptotische Funktion untersucht (siehe 5.8). Zu diesem Zweck wurden BHK Zellen jeweils im Doppelansatz Plasmid-transfiziert und 18h später mit Staurosporin inkubiert. Über die im Anschluss durchgeführte Doppelfärbung der fixierten Zellen mit anti-myc und anti-aktivierte Caspase-3 konnte innerhalb des selben Ansatzes die Apoptoserate der transfizierten Zellen mit der Apoptoserate der untransfizierten Zellen verglichen werden. Bis auf das Merkmal „transfiziert“ waren die transfizierten Zellen identischen Bedingungen unterworfen, wie die innerhalb des selben Ansatzes untransfizierten. Ein Unterschied in der Apoptoserate von erfolgreich transfizierten und untransfizierten, sofern statistisch signifikant, ist somit aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Expression des jeweiligen Gens zurückzuführen.

Sowohl nach Transfektion von pcDNA-C14L-mycHis als auch pcDNA-C15L-mycHis bzw. einer Kotransfektion beider Plasmide war die Apoptoserate der transfizierten Zellen erheblich geringer, als die Apoptoserate der untransfizierten (siehe Abbildung 5.8.2 c)). Ein derartiger Effekt ließ sich sowohl mit als auch ohne Staurosporinbehandlung beobachten. Das Verhältnis der Apoptoserate der transfizierten zur Apoptoserate der untransfizierten Zellen betrug für C14L, C15L bzw. C14L +C15L nach Staurosporinbehandlung 70,5%, 53,9% bzw. 63,4% und ohne Staurosporininduktion 32,0%, 41,6% bzw. 30,9%. In den unbehandelten, transfizierten Ansätzen war die Apoptoserate, verglichen mit dem untransfizierten, DMSO-behandelten Kontroll-Ansatz, generell bereits relativ hoch (ca. 20-35%; siehe Abbildung 5.8.2 a)). Obwohl für diesen wahrscheinlich durch das Lipofectamin 2000 bedingten Effekt die zugehörige Kaskade und damit eine potentielle Beteiligung der Mitochondrien unklar ist, kommt es offenbar auch hier zu einer Inhibition der Caspase-3-Aktivierung durch die Expression des jeweiligen Gens.

Eine antiapoptotische Funktion der Gene C14L und/oder C15L aus CVA 152 könnte die Erklärung für die veränderten Wachstumseigenschaften von CVA 386 gegenüber CVA 152 liefern.

Diese Ergebnisse sind jedoch aus verschiedenen Gründen vorerst mit Skepsis zu betrachten. Zum einen ist die mittlere Transfektionseffizienz vor allem für den pcDNA-C15L-mycHis-transfizierten, mit Staurosporin inkubierten (1,75%) aber auch für den kotransfizierten, mit Staurosporin inkubierten Doppelansatz (5,9%) zu gering, um eine hohe Aussagekraft zu gewährleisten (siehe Abbildung 5.8.2 b)). Dieses Problem könnte in der Zukunft möglicherweise über die Zugabe von Lactacystin gelöst werden.

Zusätzlich konnten die innerhalb der kotransfizierten Ansätze beobachteten Effekte nicht eindeutig zugeordnet werden. Mithilfe der kotransfizierten Ansätze sollte untersucht werden, ob für eine antiapoptotische Wirkung eine Interaktion der beiden Proteine nötig ist. Da die anti-myc-Färbung jedoch nicht zwischen C14 und C15 zu diskriminieren vermag, war die Transfektionseffizienz der beiden Plasmide innerhalb dieser Ansätze und damit der Anteil der beiden Gene an der erzielten Wirkung nicht feststellbar.

Zwar zeigte sich innerhalb der pcDNA-C12L-mycHis-transfizierten Ansätze jeweils eine Apoptoserate der erfolgreich transfizierten Zellen, die leicht oberhalb der Rate der untransfizierten lag. Dennoch fehlte dem Experiment eine Negativ-Kontrolle im Sinne eines definitiv nicht in apoptotische Prozesse involvierten Gens, sowie eine Positiv-Kontrolle.

Zusätzlich müssen diese Ergebnisse hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit überprüft werden. Zwar wurden alle sechs Ansätze zweifach durchgeführt und die Apoptoseraten unterschieden sich innerhalb der Doppelansätze absolut gesehen um maximal 6%. Dennoch gilt es in der Zukunft, diese ersten Hinweise innerhalb weiterer Experimente zu bestätigen und letztlich vor dem Hintergrund einer Infektion zu überprüfen.

6.3 C16L: Spezifische Interaktion mit F-Aktin?

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Expression des C16L-mycHis innerhalb transfizierter 293T Zellen gezeigt werden (siehe 5.4). Das entsprechende Protein hatte hierbei die zuvor anhand der AS-Sequenz berechnete Größe. Eine zusätzlich detektierte Bande mit einem MG von knapp über 20 kDa (siehe Abbildung 5.4.1) stammte vermutlich von einem Abbauprodukt. Innerhalb der Laserscan Mikroskopie immunfluoreszenzgefärbter Zellen zeigte sich für das C16 eine komplexe Verteilung mit dreistufiger Intensität (siehe

Abbildung 5.6.1). Die höchste Konzentration hatte das Protein hierbei innerhalb der chromatinarmen Bereiche des Nukleus sowie in wenigen, meist in Kernnähe angesiedelten, zytoplasmatischen Akkumulationen. Die zweite Intensitätsstufe der Färbung wurde durch zytoskelettartige Stränge gebildet, die in der Zellperipherie besonders deutlich ausgeprägt waren und sich auf Kollokationen mit F-Aktin zurückführen ließen (siehe Abbildung 5.6.2). Die Intensität dieser Strukturen war nach MVA-F6-Infektion deutlich herabgesetzt. Die zusätzliche Verteilung innerhalb des übrigen Zytoplasmas stellte die dritte Intensitätsstufe dar und war von wechselnder Homogenität.

Das Aktinzytoskelett spielt eine wesentliche Rolle innerhalb des vacciniaviralen Infektionszyklus (siehe 2.1.4). Nachdem sich bereits binnen 1hpi die Aktin-Stressfasern der infizierten Zelle auflösen (Meyer et al., 1981), kommt es ca. 6hpi zur CEV-vermittelten Bildung von Aktinschwänzen. Auf der Zelloberfläche an der Spitze solcher Aktinschwänze haftet jeweils ein CEV. Bedingt durch das Wachstum der Aktinschwänze kommt es zur Entstehung von Zellprojektionen. Hierdurch gelangen die CEV zwecks Infektion in die Nähe angrenzender Zellen (Cudmore et al., 1995).

Die Bildung von Aktinschwänzen ist für die effiziente Verbreitung der Viren auf angrenzende Zellen von grundlegender Bedeutung. So konnte u.a. gezeigt werden, dass die CEV-induzierte Bildung von Aktinschwänzen für die Formierung normal großer Plaques essentiell ist (Rodger and Smith, 2002).

Die mittels Laserscan Mikroskopie gezeigte Kollokation von C16 und F-Aktin Stressfasern innerhalb transfizierter BHK Zellen legt die Frage nach einer spezifischen Interaktion und einer potentiellen Beteiligung des C16 an der Bildung von Aktinschwänzen nahe.

Innerhalb der Färbung pcDNA-C16L-mycHis-transfizierter und zusätzlich MVA-infizierter Zellen ließ sich keinerlei Ähnlichkeit mehr mit Aktin-Stressfasern erkennen (siehe Abbildung 5.6.1 d)). Dies ist mit den Ergebnissen von Valderrama et al. vereinbar, die innerhalb von für MVA semipermissiven BSC-1 Zellen (grüne Meerkatzenierenzellen) nach MVA-Infektion einen Verlust der Aktin-Stressfasern beobachten konnten (Valderrama et al., 2006).

Die vergleichende Analyse von MVA gegenüber replikationskompetenten VACV-Stämmen ergab für MVA bei fehlender Induktion von Aktinschwänzen in nicht permissiven HeLa Zellen (Gallego-Gomez et al., 2003) eine erhaltene Induktion in permissiven CEF Zellen (Meiser et al., 2003) und ebenfalls permissiven BHK Zellen. Um die Frage zu klären, ob sich die C16-Färbung auch mit potentiellen Aktinschwänzen innerhalb MVA-infizierter BHK Zellen überlagert, gilt es deshalb, Kollokationsstudien vor dem Hintergrund einer Infektion durchzuführen.

Unabhängig davon erscheint es jedoch angebracht, die Frage nach einer spezifischen Funktion des C16 im Zusammenhang mit Aktin skeptisch zu betrachten. In der Literatur gibt es in dem vacciniaviralen Protein F17 bereits ein Beispiel eines mit Aktin assoziierten Proteins, für das eine Beteiligung an der Formierung von Aktinschwänzen ausgeschlossen wurde (Reckmann et al., 1997). Als eines der wesentlichen viralen Strukturproteine bindet F17 (VP11) an Doppel- und einzelsträngige DNA und hat eine primäre Funktion, die unabhängig von seiner Interaktion mit Aktin ist (Kao and Bauer, 1987). Letzteres wäre auch im Falle von C16 denkbar; zeigt es sich doch in erster Linie innerhalb Chromatin-freier Bereiche des Nukleus akkumuliert.

Laut *in silico*-Analyse mangelt es C16, genauso wie F17 (Reckmann et al., 1997), an einer spezifischen Aktin-Binde-Sequenz. Untersuchungen haben gezeigt, dass unter anderem polykationische Proteine allein aufgrund ihrer basischen Natur in der Lage sind, Aktinfilamente zu bündeln (Tang and Janmey, 1998). Angesichts des hohen Anteils an basischen AS innerhalb des C16 (12,5%) erscheint dies als Ursache für die Kolo-kalisation mit Aktin-Stressfasern durchaus plausibel.

Reckmann et al. konnten außerdem zeigen, dass die Assoziation von F17 mit Aktin, im Gegensatz zur Lokalisation innerhalb der *viral factories*, konzentrationsabhängig war. Im Hinblick auf die CMV-Promotor-vermittelte Überexpression der untersuchten Gene innerhalb dieser Arbeit ist es folglich notwendig, die Lokalisation des C16 nach Expression durch den eigenen VACV-Promotor zu überprüfen.

Auch eine Interaktion des C16 mit Aktin ohne Beteiligung an der Bildung von Aktinschwänzen wäre von Bedeutung. So wird vermutet, dass das Bündeln der Aktinfilamente durch virale basische Proteine dazu beiträgt, die Dichte der Aktinschwänze zu erhöhen und die Anzahl aktinreicher Zellfortsätze wie z.B. Mikrovilli zu steigern (Reckmann et al., 1997).

Auf der anderen Seite gilt es, die intranukleäre Funktion des C16 zu untersuchen. Zwar spielt sich die pockenvirale Replikation gänzlich extranukleär innerhalb der zytoplasmatischen *viral factories* ab. Dennoch gibt es Hinweise auf eine essentielle Bedeutung des Kerns und insbesondere des Transkriptionsapparats der Wirtszelle für die pockenvirale Replikation. So war innerhalb kernloser Zytoplasten keine effektive Produktion infektiöser Virusformen zu beobachten (Hruby et al., 1979; Pennington and Follett, 1974). Zusätzlich gibt es mit dem Protein E3, das u.a. Teile der antiviralen Genexpression der Wirtszelle blockiert (Langland et al., 2006), bereits ein Beispiel eines vacciniaviralen Proteins, dass intranukleär lokalisiert ist (Yuwen et al., 1993).

Unabhängig von der Funktion des C16L Gens ergeben sich jedoch Zweifel an seiner Bedeutung für die veränderten Replikationseigenschaften von CVA 386 gegenüber CVA 152.

Ebenso wie das C15L ist auch das C16L innerhalb von CVA und COP Bestandteil des linken ITR. In seinem Fall ist jedoch der entsprechende OLR des rechten ITR, B22R, innerhalb des CVA 152 und sogar des CVA 386 noch vorhanden. Hierbei weist das B22R aus CVA 386 (188 AS) gegenüber dem C16L/B22R aus CVA 152 (200 AS) allerdings eine Veränderung der AS 126-129 und eine Deletion der AS 130-141 auf (siehe Anhang).

Falls das mutierte B22R jedoch innerhalb von CVA 386 noch funktionsfähig wäre, so könnte es den Verlust des C16L möglicherweise kompensieren. In diesem Fall könnte folglich eine Rolle des C16L für den veränderten Wirtstropismus von CVA 152 gegenüber CVA 386 auf humanen Zellen ausgeschlossen werden.

6.4 M1L und OLR 037: Funktionsverlust oder neu entstandenes Gen?

Schon früh wurde eine ausgeprägte Homologie von M1L zu dem Vacciniavirus HR-Gen K1L beschrieben (Perkus et al., 1990). Ebenfalls wurde das analoge Protein M1 bezüglich der Proteininteraktion dienenden, Ankyrin-ähnlichen (*ankyrin-like*) Strukturen charakterisiert (Shchelkunov et al., 1993). In der Folge wurde eine mögliche HR-Funktion von M1L für VACV-WR innerhalb von humanen MRC-5 Zellen untersucht, die sich allerdings nicht bestätigen ließ (Perkus et al., 1989;Perkus et al., 1990).

Fügt man die AS-Sequenz des Gens M1L und des OLR 037 aus CVA 152 aneinander und vergleicht das Ergebnis mit der Sequenz des M1L aus VACV COP oder VACV WR, so ergibt sich bis auf eine kurze Zwischensequenz und wenige einzelne AS-Mutationen eine präzise Übereinstimmung (siehe Anhang A). Das Gen M1L und der OLR 037 innerhalb von CVA 152 sind folglich aller Wahrscheinlichkeit nach aus einer gemeinsamen Vorstufe entstanden, die einem dem M1L von COP und WR homologen Gen innerhalb von CVA entspricht. In einer kürzlich erschienenen Publikation der vollständigen DNA-Sequenz des CVA konnte mittels phylogenetischer Analyse der besonders enge Verwandtschaftsgrad zwischen MVA und CVA gezeigt und damit die These der Abstammung MVAs von CVA untermauert werden (Meisinger-Henschel et al., 2007). Überraschenderweise zeigte sich das M1L_{CVA} hierbei jedoch nicht nur deutlich verkürzt gegenüber dem M1L_{WR/COP}, sondern bereits wesentlich stärker deletiert als das M1L_{CVA 152}. Dieser scheinbar paradoxe Umstand beruht möglicherweise darauf, dass der von Meisinger-Henschel et al. zur Sequenzierung von CVA verwendete Virus-Klon nur einer aus einem *pool* von VACV CVA war. Es ist deshalb durchaus wahrscheinlich, dass innerhalb dieses *poools* weitere Viren existieren, deren Version des M1L noch intakt ist und der

des M1L_{WR/COP} ähnelt (Meisinger-Henschel et al., 2007). Ebenfalls lässt sich jedoch nicht restlos ausschließen, dass das von Meisinger-Henschel et al. sequenzierte Virus nicht der exakte Vorfahre des MVA ist.

Aus dem AS-Sequenz-Vergleich von M1_{COP/WR} und dem M1 bzw. des vom OLR 037 codierten Proteins aus CVA 152 ergeben sich demnach verschiedene alternative Hypothesen. Falls das 037-Fragment für die Funktion des M1L essentiell war, könnte dieses bereits innerhalb von CVA 152 seine Funktion eingebüßt haben und folglich irrelevant für den Wachstumsdefekt von CVA 386 gegenüber CVA 152 auf humanen HeLa Zellen sein. Ebenso ist es jedoch möglich, dass das gegenüber M1L_{COP/WR} um 16% verkürzte M1L_{CVA 152} seine unbekannte Funktion dennoch ausübt. Ebenfalls gibt es vacciniavirale Beispiele, bei denen das selbe Protein zwei unterschiedliche Funktionen über zwei unabhängige Domänen erfüllt (Langland and Jacobs, 2004; Webb et al., 2006). Insofern ist es sogar prinzipiell vorstellbar, dass das 037-Fragment eine eigene Funktion ausübt.

Innerhalb dieser Arbeit ergab die Western Blot-Analyse zunächst für beide Genprodukte eine intrazelluläre Expression mit der anhand der AS-Sequenz errechneten Proteingröße (siehe 5.4). Zusätzlich ließ sich im Fall von M1 eine ebenfalls mittels anti-His detektierbare zweite Bande erkennen, die unterhalb der erwarteten Proteingröße lief und möglicherweise auf ein Abbauprodukt des ursprünglichen Proteins zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte für das durch den OLR 037 codierte Protein mithilfe des Proteasomeninhibitors Lactacystin gezeigt werden, dass es in unbehandelten Zellen einer intensivierten Degradierung durch das Ubiquitin-Proteasomen-System unterliegt (siehe 5.4). Dies könnte seine Ursache auf der einen Seite in einer erhöhten Regulation der intrazellulären Konzentration eines funktionalen Proteins haben, auf der anderen Seite aber auch die Folge von mangelnder oder unkorrekter Faltung sein (Tanaka and Chiba, 1998). Letzteres erscheint angesichts der beschriebenen Entstehung des 037-Fragments durchaus plausibel. Andererseits ließ die intrazelluläre Verteilung des entsprechenden Proteins in der konfokalen Laserscan Mikroskopie (siehe 5.6.1) keinerlei Ähnlichkeit mit der typischen Färbung der 26S-Proteasomen (Brooks et al., 2000) erkennen. Sowohl für das Gen M1L als auch den OLR 037 zeigten die Plasmid-transfizierten Zellen eindeutige Akkumulationen wechselnder Ausdehnung, wobei die größeren Bereiche jeweils in Kernnähe zu finden waren (siehe 5.6.1). Für das Protein M1 konnte hierbei eine Lokalisation innerhalb des trans-medialen Golgi-Apparats ausgeschlossen werden (siehe 5.6.2). Ob diese scheinbar spezifische subzelluläre Lokalisation der beiden Proteine auf einer Funktion innerhalb dieser unbekannter Zellbereiche, oder auf bloßer Affinität zu bestimmten zellulären Strukturen beruht, bedarf in der Zukunft weiterer Aufklärung.

6.5 Das N-glykosylierte Sekretionsprotein M2_{CVA 152} inhibiert die NF-KB-Aktivierung über eine unbekannte, extrazelluläre Signalkaskade

Wenn eukaryontische Zellen einer viralen Infektion ausgesetzt sind, werden virale Fremdgene und -Proteine zunächst in die Zelle eingeschleust und anschließend, meist mithilfe zellulärer Enzyme und Ressourcen, in großen Mengen reproduziert. Um sich selbst und den gesamten Organismus zu schützen, verfügen betroffene Zellen in Verbindung mit dem angeborenen Immunsystem über vielfältige Mechanismen, um Bestandteile pathogener Organismen zu detektieren und zu bekämpfen. So werden beispielsweise virale Nukleinsäuren von der Gruppe der PRRs (*pattern recognition receptor*) erkannt, was letztlich zu einer Typ I Interferon-Antwort mit nachfolgender Induktion antiviraler Cytokine und Chemokine führt (Haller and Weber, 2007)). Auch die NF-KB (*nuclear factor K-B*)-abhängige Expression zahlreicher Gene, die für immunregulative und proinflammatorische Proteine codieren, stellt einen zentralen Aspekt der antiviralen Immunantwort dar (siehe 1.1.1). Vor diesem Hintergrund erscheint es durchaus folgerichtig, dass auch unter den Vacciniaviren bereits mehrere Proteine identifiziert werden konnten, die hier an verschiedenen Stellen modifizierend oder inhibitorisch angreifen (siehe 2.4.2).

Das Modifizierte Vaccinia Virus Ankara (MVA) hat im Vergleich zu seinen vacciniaviralen Vorgängern bereits viele immunregulatorische Gene verloren (Antoine et al., 1998). In diesem Zusammenhang konnte unlängst gezeigt werden, dass die MVA-induzierte NF-KB-Aktivierung über eine Phosphorylierung von ERK2 läuft und dass diese mittels (Re-)Insertion des Gens M2L inhibiert werden kann (Gedey et al., 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das M2L-mycHis innerhalb Plasmid-transfizierter 293T-Zellen exprimiert werden. Mithilfe des Enzyms PNGaseF wurde nachgewiesen, dass das Protein M2, entsprechend der *in silico*-Prognose (siehe 5.3), posttranslational N-glykosyliert wird (siehe 5.5). Desweiteren zeigte sich in der konfokalen Laserscan Mikroskopie nach Immunfluoreszenzfärbung, dass M2 zu einem Großteil im trans-medialen Golgi lokalisiert ist (siehe 5.6.2). Folgerichtig wurde das Protein in großen Mengen im Zellüberstand transfizierter 293T Zellen detektiert (siehe 5.4).

Interessanterweise ließen sich für das Protein M2, nach zusätzlicher MVA-Infektion der transfizierten Zellen, in der konfokalen Laserscan Mikroskopie außerdem Überlagerungen mit viralen Bestandteilen nachweisen (siehe 5.6.1). Hierbei fällt auf, dass Kollokalisierungen erst in 6h pI fixierten Zellen vorhanden waren, während sich die Verteilung des Virus innerhalb 3h pI fixierter Zellen auf die unmittelbare Umgebung des Proteins beschränkte (siehe

Abbildung 5.6.1 f)). Was zunächst den Anschein einer Interaktion von M2 mit viralen Bestandteilen spät innerhalb des Replikationszyklus erweckt, ist vermutlich durch den grundsätzlichen Ablauf der vacciniaviralen Virionenmorphogenese bedingt. Hierbei erhält die Zwischenstufe des IMV u.a. am Trans Golgi Netzwerk (TGN) eine zusätzliche Membran und wird nachfolgend IEV genannt (Schmelz et al., 1994). Dies erklärt die beobachtete Überlagerung mit dem Protein M2, für das ebenfalls eine Lokalisation innerhalb des trans-medialen Golgi-Apparats gezeigt werden konnte.

In Abschnitt 5.7 wird zusätzlich deutlich, dass M2-haltige Überstände die TPA-induzierte NF-KB-Aktivierung inhibieren konnten.

Zusammen genommen legen diese Daten die Vermutung nahe, dass das vacciniavirale Protein M2 von infizierten Zellen sekretiert wird und im Anschluss über einen unbekanntem, Rezeptor-vermittelten Mechanismus die NF-KB Aktivierung herabsetzt. Hierbei ist auf der einen Seite eine direkte Inhibition an der extrazellulären Domäne z.B. eines Toll/IL-1 (*Toll-like/Interleukin-1-like*)-Rezeptors denkbar. Ebenfalls möglich wäre eine Interaktion mit einem anderen Rezeptor, in deren Folge das Produkt einer hierdurch ausgelösten Kaskade weiter abwärts im Aktivierungsweg des NF-KB angreift.

Unabhängig von diesen Ergebnissen ist kürzlich eine neue Publikation erschienen, welche die Charakterisierung von vacciniaviralem M2L zum Gegenstand hat (Hinthong et al., 2008). Diese Daten machen deutlich, dass M2 früh innerhalb des viralen Reproduktionszyklus entsteht und bestätigen die posttranslationale N-Glykosylierung des Proteins. Ein in silico charakterisiertes aminoterminales Signalpeptid konnte verifiziert werden, mit dessen Hilfe das Protein in das endoplasmatische Retikulum (ER) synthetisiert wird und das für die NF-KB-inhibitorische Funktion von M2 essentiell ist.

Überraschenderweise wurde das Protein hierbei mittels konfokaler Laser Scan Mikroskopie jedoch nicht im Golgi-Apparat, sondern lediglich im ER infizierter 293T Zellen detektiert. Zusätzlich verlief die Analyse des Überstands infizierter Zellen auf sekretiertes M2 mittels Immunopräzipitation negativ (Hinthong et al., 2008).

Über die Ursache der beschriebenen Abweichung zwischen den publizierten Daten und den innerhalb dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen bezüglich M2L lässt sich zunächst einmal nur spekulieren. Interessanterweise ist aber die AS-Sequenz des von Hinthong et al. charakterisierten M2_{WR} nicht absolut identisch mit der AS-Sequenz des innerhalb dieser Arbeit untersuchten M2_{CVA 152}. An Position 189 bzw. 211 weist das M2_{WR} aus der Publikation ein Glycin (im Einbuchstabencode G) bzw. Glutamat (E) auf, die innerhalb des M2_{CVA 152} durch ein Serin (S) bzw. Lysin (K) ersetzt sind (siehe Anhang). Hierbei erscheint es allerdings verwirrend, dass die Sequenz des von Hinthong et al. aus WR erhaltenen M2 nicht der auf

www.poxvirus.org publizierten Version des M2_{WR} entspricht, welches sich lediglich durch das Glutamat an der AS-Position 211 vom M2_{CVA 152} unterscheidet. Das von Hinthong et al. charakterisierte Protein soll deshalb in der Folge M2_{WR}* genannt werden.

Auf den beschriebenen Unterschieden zwischen der AS-Sequenz des M2_{WR}* und des M2_{CVA 152} basierend, kommen als Erklärung für die abweichenden Daten grundsätzlich zwei alternative Hypothesen in Frage: Entweder das fragliche Protein M2_{WR}* war innerhalb des publizierten Versuchsaufbaus nicht im Überstand vorhanden, oder es war zwar vorhanden, konnte dort aber aus unbekanntem Gründen nicht detektiert werden. Im Folgenden sollen die beiden Annahmen im Sinne von pro und contra diskutiert werden.

Proteine, die ihre Funktion innerhalb des ER ausüben, tragen carboxy-(C-)terminal so genannte *retrieval signals*. Derartige Erkennungssequenzen sind dafür verantwortlich, dass diese Proteine, wenn sie versehentlich oder routinemäßig in Vesikel verpackt und Richtung Golgi-Apparat transportiert wurden, wieder zurück zum ER gelangen. Für lösliche Proteine des ER ist dies im Einbuchstabencode die AS-Sequenz KDEL (Munro and Pelham, 1987), oder eine Sequenz mit großer Ähnlichkeit (Pelham, 1990) und für membranständige Proteine des ER u. a. die Sequenz KXKXX (Jackson et al., 1990), wobei X in diesem Fall jede AS sein kann. Die AS-Sequenz des M2_{WR}* weist in der Nähe des Carboxyterminus die Motive KDKYL und IDEL bzw. IKEL auf, die Ähnlichkeit mit dem *retrieval signal* KDEL haben. Hinthong et al. konnten zeigen, dass die intrazelluläre Verteilung eines mutierten M2_{WR}*, dem die 42 C-terminalen AS inklusive der drei potentiellen *retrieval signals* fehlen, nicht mehr vollständig auf das ER beschränkt ist. Interessanterweise ist nun innerhalb des am weitesten C-terminal gelegenen Motivs IKEL in der AS-Sequenz von M2_{CVA 152} die AS Glutamat (E) durch Lysin (K) ersetzt, wodurch die Ähnlichkeit mit KDEL verloren geht. Für das im ER ansässige Chaperon-Protein BiP (*heavy chain binding protein*) konnte bereits gezeigt werden, dass eine Deletion der Sequenz KDEL in einer Sekretion des Proteins resultiert (Munro and Pelham, 1987). Sollten die drei beschriebenen Motive für eine ER-begrenzte Lokalisation des M2_{WR}* verantwortlich sein, so könnte die Aminosäuremutation in M2_{CVA 152} möglicherweise eine Erklärung für dessen Sekretion in den Überstand transfizierter Zellen liefern.

Auch die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der beiden Proteine innerhalb immunfluoreszenzgefärbter Zellen ist mit der Theorie eines M2_{WR}*, das seine Funktion im ER ausübt (Hinthong et al., 2008), gegenüber eines sekretorischen M2_{CVA 152} (diese Arbeit) vereinbar. Die oben beschriebenen *retrieval signals* verhindern zwar nicht den gelegentlichen Transport betroffener Proteine Richtung Golgi-Apparat, sorgen aber für eine zügige Rückgewinnung und folglich für eine stark vorherrschende Lokalisation im ER (Gaynor et al., 1994). Vor diesem Hintergrund erscheint die auf das ER-Netzwerk begrenzte subzelluläre

Verteilung des $M2_{WR}^*$ mit Aussparung des Golgi-Apparats (Hinthong et al., 2008) durchaus folgerichtig. Für Exportproteine dagegen ist die Konzentration innerhalb des ER wesentlich geringer als innerhalb des Golgi-Apparats (Balch et al., 1994). Entsprechend zeigt sich das $M2_{CVA 152}$ nach Immunfluoreszenzfärbung besonders stark innerhalb des trans-medialen Golgi-Apparats akkumuliert (siehe Abbildung 5.6.2). Die weniger intensiv gefärbten ebenfalls kernnahen Strukturen stellen vermutlich ER bzw. cis-Sacculus des Golgi-Apparats dar.

Dennoch ist die dargestellte Theorie mit einer gewissen Skepsis zu betrachten. Beide innerhalb des $M2_{WR}^*$ vorhandenen *retrieval signals* sind in der Literatur bisher nur als für die ER-Rückgewinnung bedeutungsvoll beschrieben worden, wenn sie absolut C-terminal lokalisiert waren. Vielmehr resultierte bereits der Zusatz von lediglich zwei weiteren AS an die C-terminale Sequenz KDEL des ER-ansässigen Proteins BiP in dessen Sekretion (Munro and Pelham, 1987). Diese Daten werfen die Frage nach der Bedeutung der drei Motive innerhalb des $M2_{WR}^*$ für eine ER-Rückgewinnung und folglich auch der beiden mutierten AS für die unterschiedlichen Eigenschaften von $M2_{WR}^*$ und $M2_{CVA 152}$ auf. Zwar resultierte die Deletion der 42 C-terminalen AS einschließlich der drei denkbaren *retrieval signals* in einer zusätzlichen Verteilung des $M2_{WR}^*$, jedoch erstreckte sich diese nicht auf den Golgi-Apparat, was auf eine Sekretion des veränderten Proteins hingedeutet hätte, sondern auf zytoplasmatische Bereiche (Hinthong et al., 2008). Es ist daher ebenso vorstellbar, dass das veränderte $M2_{WR}^*$ durch den vergleichsweise großen Verlust von 42 AS bei einer Gesamtgröße von 220 AS nicht mehr korrekt gefaltet werden konnte und anschließend zur Degradierung ins Zytoplasma transportiert wurde. Dies würde ebenfalls erklären, warum das veränderte $M2_{WR}^*$ seine inhibitorische Funktion hinsichtlich der NF-KB-Aktivierung verloren hat.

Viele sekretorische Proteine werden auf dem Weg vom Golgi-Apparat zum Extrazellulärraum proteolytisch prozessiert (Kozlov and Grishin, 2007). Innerhalb dieser Arbeit wurde das $M2_{CVA 152}$ mittels anti-His bzw. anti-myc detektiert, während Hinthong et al. zur Detektion des $M2_{WR}^*$ einen spezifischen M2-AK mit unbekannter Erkennungssequenz verwendeten. Angesichts dessen erscheint es auch prinzipiell denkbar, dass ein Teil des M2 vor der Sekretion abgespalten wird, wodurch es im Überstand durch den M2-spezifischen AK nicht mehr detektiert werden konnte. Hinthong et al. hatten diesbezüglich bereits Daten gezeigt, die darauf hindeuten, dass der M2-spezifische Ak die ursprüngliche, N-glykosylierte Form des $M2_{WR}^*$ wesentlich besser bindet, als ein mutiertes $M2_{WR}^*$, dem die N-terminale Signalsequenz und als Folge dessen ebenfalls die N-Glykosylierung fehlt. In diesem Zusammenhang gilt es ebenfalls zu bedenken, dass die Wahrscheinlichkeit, dass zwei derart ähnliche Proteine die gleiche Wirkung (NF-KB-Inhibition) einmal über einen extrazellulären Rezeptor ($M2_{CVA 152}$) und einmal ER-vermittelt ($M2_{WR}^*$) ausüben, eher gering ist. Dies macht es einerseits

notwendig, die im Abschnitt 5.7 beschriebene Inhibition der ERK2-Phosphorylierung durch die Behandlung mit M2_{CVA 152}-haltigem Überstand hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit zu überprüfen. Andererseits wird hierdurch aber auch die These eines sekretierten, aber mittels spezifischem M2-AK nicht mehr detektierbaren M2 gestützt. Eine vergleichende Analyse des M2_{CVA 152} aus Zelllysaten und -überstand (siehe Abbildung 5.5.1) ergab allerdings keinerlei Unterschiede hinsichtlich Größe oder N-Glykosylierung, die auf eine derartige proteolytische Prozessierung des M2 vor seiner Sekretion hinweisen könnten.

Sicherlich gilt es ebenfalls zu bedenken, dass die Charakterisierung des M2L_{CVA 152} jeweils nach transienter Plasmidtransfektion erfolgte, während die Untersuchungen des M2L_{WR}* vor dem Hintergrund einer Infektion erfolgten.

Die Frage nach der tatsächlichen Ursache der abweichenden Daten bezüglich VACV-M2L kann letztendlich nur im Experiment beantwortet werden. Ein erster Schritt könnte hierbei die Klonierung eines Plasmids pcDNA-M2L_{WR}*-mycHis mit nachfolgender Expressions- und Lokalisationsanalyse nach transienter Plasmidtransfektion sein. Umgekehrt könnte eine Western Blot-Analyse des Überstands pcDNA-M2L_{CVA 152}-mycHis-transfizierter Zellen unter Verwendung des spezifischen M2-AKs ebenfalls zur Aufklärung beitragen.

7 Literaturverzeichnis

Adams, JM, 2003, Ways of dying: multiple pathways to apoptosis: *Genes Dev.*, v. 17, p. 2481-2495.

Albert, ML, 2008, Death-defying immunity: do apoptotic cells influence antigen processing and presentation?: *Nat.Rev.Immunol.*, v. 4, p. 223-231.

Ali, AN, P C Turner, M A Brooks, R W Moyer, 1994, The SPI-1 gene of rabbitpox virus determines host range and is required for hemorrhagic pox formation: *Virology*, v. 202, p. 305-314.

Amato, RJ, 2007, 5T4-modified vaccinia ankar: progress in tumor-associated antigen-based immunotherapy: *Expert.Opin.Biol.Ther.*, v. 7, p. 1463-1469.

Antoine, G, F Scheiflinger, F Dorner, F G Falkner, 1998, The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: comparison with other orthopoxviruses: *Virology*, v. 244, p. 365-396.

Armstrong, JA, D H Metz, M R Young, 1973, The mode of entry of vaccinia virus into L cells: *J.Gen.Virol.*, v. 21, p. 533-537.

Ashkenazi, A, V M Dixit, 1998, Death receptors: signaling and modulation: *Science*, v. 281, p. 1305-1308.

Assarsson, E, J A Greenbaum, M Sundstrom, L Schaffer, J A Hammond, V Pasquetto, C Oseroff, R C Hendrickson, E J Lefkowitz, D C Tschärke, J Sidney, H M Grey, S R Head, B Peters, A Sette, 2008, Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 105, p. 2140-2145.

Balch, WE, J M McCaffery, H Plutner, M G Farquhar, 1994, Vesicular stomatitis virus glycoprotein is sorted and concentrated during export from the endoplasmic reticulum: *Cell*, v. 76, p. 841-852.

Boatright, KM, M Renatus, F L Scott, S Sperandio, H Shin, I M Pedersen, J E Ricci, W A Edris, D P Sutherlin, D R Green, G S Salvesen, 2003, A unified model for apical caspase activation: *Mol.Cell*, v. 11, p. 529-541.

Bonizzi, G, M Karin, 2004, The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity: *Trends Immunol.*, v. 25, p. 280-288.

Brooks, MA, A N Ali, P C Turner, R W Moyer, 1995, A rabbitpox virus serpin gene controls host range by inhibiting apoptosis in restrictive cells: *J.Virol.*, v. 69, p. 7688-7698.

Brooks, P, G Fuertes, R Z Murray, S Bose, E Knecht, M C Rechsteiner, K B Hendil, K Tanaka, J Dyson, J Rivett, 2000, Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells: *Biochem.J.*, v. 346 Pt 1, p. 155-161.

Broyles,SS, X Liu, M Zhu, M Kremer, 1999, Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promoter activator: *J.Biol.Chem.*, v. 274, p. 35662-35667.

Burgers,WA, E Shephard, J E Monroe, T Greenhalgh, A Binder, E Hurter, J H Van Harmelen, C Williamson, A L Williamson, 2008, Construction, Characterization, and Immunogenicity of a Multigene Modified Vaccinia Ankara (MVA) Vaccine Based on HIV Type 1 Subtype C: *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, v. 24, p. 195-206.

Carroll,MW, B Moss, 1997, Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line: *Virology*, v. 238, p. 198-211.

Carter,GC, G Rodger, B J Murphy, M Law, O Krauss, M Hollinshead, G L Smith, 2003, Vaccinia virus cores are transported on microtubules: *J.Gen.Virol.*, v. 84, p. 2443-2458.

Chai,J, C Du, J W Wu, S Kyin, X Wang, Y Shi, 2000, Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO: *Nature*, v. 406, p. 855-862.

Chang,W, J C Hsiao, C S Chung, C H Bair, 1995, Isolation of a monoclonal antibody which blocks vaccinia virus infection: *J.Virol.*, v. 69, p. 517-522.

Chen,L, S N Willis, A Wei, B J Smith, J I Fletcher, M G Hinds, P M Colman, C L Day, J M Adams, D C Huang, 2005, Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function: *Mol.Cell*, v. 17, p. 393-403.

Chen,Z, Y Huang, X Zhao, L Ba, W Zhang, D D Ho, 2008, Design, construction, and characterization of a multigenic modified vaccinia ankara candidate vaccine against human immunodeficiency virus type 1 subtype c/b': *J.Acquir.Immune.Defic.Syndr.*, v. 47, p. 412-421.

Chung,CS, J C Hsiao, Y S Chang, W Chang, 1998, A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate: *J.Virol.*, v. 72, p. 1577-1585.

Cooray,S, M W Bahar, N G Abrescia, C E McVey, N W Bartlett, R A Chen, D I Stuart, J M Grimes, G L Smith, 2007, Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein: *J.Gen.Virol.*, v. 88, p. 1656-1666.

Cory,S, J M Adams, 2002, The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch: *Nat.Rev.Cancer*, v. 2, p. 647-656.

Cosma,A, R Nagaraj, C Staib, C Diemer, F Wopfner, H Schatzl, D H Busch, G Sutter, F D Goebel, V Erfle, 2007, Evaluation of modified vaccinia virus Ankara as an alternative vaccine against smallpox in chronically HIV type 1-infected individuals undergoing HAART: *AIDS Res.Hum.Retroviruses*, v. 23, p. 782-793.

Coulibaly,S, P Bruhl, J Mayrhofer, K Schmid, M Gerencer, F G Falkner, 2005, The nonreplicating smallpox candidate vaccines defective vaccinia Lister (dVV-L) and modified vaccinia Ankara (MVA) elicit robust long-term protection: *Virology*, v. 341, p. 91-101.

Cuconati,A, E White, 2002, Viral homologs of BCL-2: role of apoptosis in the regulation of virus infection: *Genes Dev.*, v. 16, p. 2465-2478.

Cudmore,S, P Cossart, G Griffiths, M Way, 1995, Actin-based motility of vaccinia virus: *Nature*, v. 378, p. 636-638.

- Cyrklaff,M, C Risco, J J Fernandez, M V Jimenez, M Esteban, W Baumeister, J L Carrascosa, 2005, Cryo-electron tomography of vaccinia virus: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 102, p. 2772-2777.
- Dejardin,E, N M Droin, M Delhase, E Haas, Y Cao, C Makris, Z W Li, M Karin, C F Ware, D R Green, 2002, The lymphotoxin-beta receptor induces different patterns of gene expression via two NF-kappaB pathways: Immunity., v. 17, p. 525-535.
- DiPerna,G, J Stack, A G Bowie, A Boyd, G Kotwal, Z Zhang, S Arvikar, E Latz, K A Fitzgerald, W L Marshall, 2004, Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors: J.Biol.Chem., v. 279, p. 36570-36578.
- Doms,RW, R Blumenthal, B Moss, 1990, Fusion of intra- and extracellular forms of vaccinia virus with the cell membrane: J.Virol., v. 64, p. 4884-4892.
- Drexler,I, K Heller, B Wahren, V Erfle, G Sutter, 1998, Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells: J.Gen.Virol., v. 79 (Pt 2), p. 347-352.
- Drexler,I, C Staib, G Sutter, 2004, Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?: Curr.Opin.Biotechnol., v. 15, p. 506-512.
- Drillien,R, F Koehren, A Kirn, 1981, Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells: Virology, v. 111, p. 488-499.
- Drillien,R, D Spohner, A Kirn, 1978, Host range restriction of vaccinia virus in Chinese hamster ovary cells: relationship to shutoff of protein synthesis: J.Virol., v. 28, p. 843-850.
- Eppstein,DA, Y V Marsh, A B Schreiber, S R Newman, G J Todaro, J J Nestor, Jr., 1985, Epidermal growth factor receptor occupancy inhibits vaccinia virus infection: Nature, v. 318, p. 663-665.
- Erbs,P, A Findeli, J Kintz, P Cordier, C Hoffmann, M Geist, J M Balloul, 2008, Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy: Cancer Gene Ther., v. 15, p. 18-28.
- Fenner,F, D A Henderson, I Arita, Z Jezek, I D Ladnyi, 1988, Smallpox and its eradication. World Health Organisation, Geneva.
- Fischer,SF, H Ludwig, J Holzapfel, M Kvensakul, L Chen, D C Huang, G Sutter, M Knese, G Hacker, 2006, Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis: Cell Death.Differ., v. 13, p. 109-118.
- Frischknecht,F, V Moreau, S Rottger, S Gonfloni, I Reckmann, G Superti-Furga, M Way, 1999, Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling: Nature, v. 401, p. 926-929.
- Frischknecht,F, M Way, 2001, Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization: Trends Cell Biol., v. 11, p. 30-38.
- Gallego-Gomez,JC, C Risco, D Rodriguez, P Cabezas, S Guerra, J L Carrascosa, M Esteban, 2003, Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA

and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells: *J.Virol.*, v. 77, p. 10606-10622.

Garon,CF, E Barbosa, B Moss, 1978, Visualization of an inverted terminal repetition in vaccinia virus DNA: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 75, p. 4863-4867.

Gaynor,EC, H S te, T R Graham, M Aebi, S D Emr, 1994, Signal-mediated retrieval of a membrane protein from the Golgi to the ER in yeast: *J.Cell Biol.*, v. 127, p. 653-665.

Gedey,R, X L Jin, O Hinthong, J L Shisler, 2006, Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells: *J.Virol.*, v. 80, p. 8676-8685.

Gettins,PG, 2002, Serpin structure, mechanism, and function: *Chem.Rev.*, v. 102, p. 4751-4804.

Ghosh,S, M J May, E B Kopp, 1998, NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses: *Annu.Rev.Immunol.*, v. 16, p. 225-260.

Gilbert,SC, V S Moorthy, L Andrews, A A Pathan, S J McConkey, J M Vuola, S M Keating, T Berthoud, D Webster, H McShane, A V Hill, 2006, Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis: *Vaccine*, v. 24, p. 4554-4561.

Gillard,S, D Spehner, R Drillien, 1985, Mapping of a vaccinia host range sequence by insertion into the viral thymidine kinase gene: *J.Virol.*, v. 53, p. 316-318.

Gillard,S, D Spehner, R Drillien, A Kirn, 1986, Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 83, p. 5573-5577.

Goebel,SJ, G P Johnson, M E Perkus, S W Davis, J P Winslow, E Paoletti, 1990, The complete DNA sequence of vaccinia virus: *Virology*, v. 179, p. 247-263.

Griffiths,GJ, L Dubrez, C P Morgan, N A Jones, J Whitehouse, B M Corfe, C Dive, J A Hickman, 1999, Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis: *J.Cell Biol.*, v. 144, p. 903-914.

Gunasinghe,SK, A E Hubbs, C F Wright, 1998, A vaccinia virus late transcription factor with biochemical and molecular identity to a human cellular protein: *J.Biol.Chem.*, v. 273, p. 27524-27530.

Haller,O, F Weber, 2007, Pathogenic viruses: smart manipulators of the interferon system: *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, v. 316, p. 315-334.

Hay,S, G Kannourakis, 2002, A time to kill: viral manipulation of the cell death program: *J.Gen.Virol.*, v. 83, p. 1547-1564.

Henson,I, M Bratton, V A Fadok, 2008, The phosphatidylserine receptor: a crucial molecular switch?: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, v. 2, p. 627-633.

Herrlich,A, A Mayr, 1957, [Smallpox vaccine from tissue culture from a bull's tongue; at the same time a contribution to the question of culture vaccines.]: *Arch.Gesamte Virusforsch.*, v. 7, p. 284-296.

Hiller,G, K Weber, 1985, Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment: *J.Virol.*, v. 55, p. 651-659.

Hinthong,O, X L Jin, J L Shisler, 2008, Characterization of wild-type and mutant vaccinia virus M2L proteins' abilities to localize to the endoplasmic reticulum and to inhibit NF-kappaB activation during infection: *Virology*.

Hornemann,S, O Harlin, C Staib, S Kisling, V Erfle, B Kaspers, G Hacker, G Sutter, 2003, Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L: *J.Virol.*, v. 77, p. 8394-8407.

Hruby,DE, D L Lynn, J R Kates, 1979, Vaccinia virus replication requires active participation of the host cell transcriptional apparatus: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 76, p. 1887-1890.

Hsiao,JC, C C Chao, M J Young, Y T Chang, E C Cho, W Chang, 2006, A poxvirus host range protein, CP77, binds to a cellular protein, HMG20A, and regulates its dissociation from the vaccinia virus genome in CHO-K1 cells: *J.Virol.*, v. 80, p. 7714-7728.

Hsiao,JC, C S Chung, W Chang, 1998, Cell surface proteoglycans are necessary for A27L protein-mediated cell fusion: identification of the N-terminal region of A27L protein as the glycosaminoglycan-binding domain: *J.Virol.*, v. 72, p. 8374-8379.

Hsiao,JC, C S Chung, W Chang, 1999, Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells: *J.Virol.*, v. 73, p. 8750-8761.

Hsiao,JC, C S Chung, R Drillien, W Chang, 2004, The cowpox virus host range gene, CP77, affects phosphorylation of eIF2 alpha and vaccinia viral translation in apoptotic HeLa cells: *Virology*, v. 329, p. 199-212.

Hugin,AW, C Hauser, 1994, The epidermal growth factor receptor is not a receptor for vaccinia virus: *J.Virol.*, v. 68, p. 8409-8412.

Jackson,MR, T Nilsson, P A Peterson, 1990, Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum: *EMBO J.*, v. 9, p. 3153-3162.

Jenner,E, 1798, *An Inquiry Into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, A Disease Discovered in Some of the Western Countries of England, Particularly Near Gloucestershire, and Known by the Name of the Cow Pox*, London, Dover, New York, p. 213-240.

Jiang,X, X Wang, 2000, Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1: *J.Biol.Chem.*, v. 275, p. 31199-31203.

Kao,SY, W R Bauer, 1987, Biosynthesis and phosphorylation of vaccinia virus structural protein VP11: *Virology*, v. 159, p. 399-407.

Katsafanas,GC, B Moss, 2004, Vaccinia virus intermediate stage transcription is complemented by Ras-GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein (G3BP) and cytoplasmic activation/proliferation-associated protein (p137) individually or as a heterodimer: *J.Biol.Chem.*, v. 279, p. 52210-52217.

Kent,S, R R De, E Rollman, 2007, Drug evaluation: DNA/MVA prime-boost HIV vaccine: *Curr.Opin.Investig.Drugs*, v. 8, p. 159-167.

- Kettle,S, N W Blake, K M Law, G L Smith, 1995, Vaccinia virus serpins B13R (SPI-2) and B22R (SPI-1) encode M(r) 38.5 and 40K, intracellular polypeptides that do not affect virus virulence in a murine intranasal model: *Virology*, v. 206, p. 136-147.
- Kotwal,GJ, B Moss, 1989, Vaccinia virus encodes two proteins that are structurally related to members of the plasma serine protease inhibitor superfamily: *J.Virol.*, v. 63, p. 600-606.
- Kozlov,SA, E V Grishin, 2007, The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors: *Toxicon*, v. 49, p. 721-726.
- Kreijtz,JH, Y Suezer, A G van, M G de, B S Schnierle, J M Wood, T Kuiken, R A Fouchier, J Lower, A D Osterhaus, G Sutter, G F Rimmelzwaan, 2007, Recombinant modified vaccinia virus Ankara-based vaccine induces protective immunity in mice against infection with influenza virus H5N1: *J.Infect.Dis.*, v. 195, p. 1598-1606.
- Kuwana,T, L Bouchier-Hayes, J E Chipuk, C Bonzon, B A Sullivan, D R Green, D D Newmeyer, 2005, BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly: *Mol.Cell*, v. 17, p. 525-535.
- Lalani,AS, J Masters, W Zeng, J Barrett, R Pannu, H Everett, C W Arendt, G McFadden, 1999, Use of chemokine receptors by poxviruses: *Science*, v. 286, p. 1968-1971.
- Langland,JO, B L Jacobs, 2004, Inhibition of PKR by vaccinia virus: role of the N- and C-terminal domains of E3L: *Virology*, v. 324, p. 419-429.
- Langland,JO, J C Kash, V Carter, M J Thomas, M G Katze, B L Jacobs, 2006, Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the vaccinia virus E3L proteins: *J.Virol.*, v. 80, p. 10083-10095.
- Law,M, G C Carter, K L Roberts, M Hollinshead, G L Smith, 2006, Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 103, p. 5989-5994.
- Law,M, R Hollinshead, G L Smith, 2002, Antibody-sensitive and antibody-resistant cell-to-cell spread by vaccinia virus: role of the A33R protein in antibody-resistant spread: *J.Gen.Virol.*, v. 83, p. 209-222.
- Lisowska,K, J M Witkowski, 2003, Viral strategies in modulation of NF-kappaB activity: *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)*, v. 51, p. 367-375.
- Luttge,BG, R W Moyer, 2005, Suppressors of a host range mutation in the rabbitpox virus serpin SPI-1 map to proteins essential for viral DNA replication: *J.Virol.*, v. 79, p. 9168-9179.
- Marx,J, 2005, Cell biology. SUMO wrestles its way to prominence in the cell: *Science*, v. 307, p. 836-839.
- Masters,J, A A Hinek, S Uddin, L C Plataniias, W Zeng, G McFadden, E N Fish, 2001, Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 48371-48375.
- Mayr,A, V Hochstein-Mintzel, H Stickl, 1975, Passage History, Properties and Applicability of Attenuated Vaccinia virus Strain MVA: *Infection - Journal for the Clinical Study and Treatment of Infection*, v. 3, p. 6-14.

McCurdy,LH, B D Larkin, J E Martin, B S Graham, 2004, Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine: *Clin.Infect.Dis.*, v. 38, p. 1749-1753.

Meiser,A, D Boulanger, G Sutter, L J Krijnse, 2003, Comparison of virus production in chicken embryo fibroblasts infected with the WR, IHD-J and MVA strains of vaccinia virus: IHD-J is most efficient in trans-Golgi network wrapping and extracellular enveloped virus release: *J.Gen.Virol.*, v. 84, p. 1383-1392.

Meisinger-Henschel,C, M Schmidt, S Lukassen, B Linke, L Krause, S Konietzny, A Goesmann, P Howley, P Chaplin, M Suter, J Hausmann, 2007, Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara: *J.Gen.Virol.*, v. 88, p. 3249-3259.

Meng,X, J Chao, Y Xiang, 2008, Identification from diverse mammalian poxviruses of host-range regulatory genes functioning equivalently to vaccinia virus C7L: *Virology*, v. 372, p. 372-383.

Meng,X, Y Xiang, 2006, Vaccinia virus K1L protein supports viral replication in human and rabbit cells through a cell-type-specific set of its ankyrin repeat residues that are distinct from its binding site for ACAP2: *Virology*, v. 353, p. 220-233.

Mercer,J, A Helenius, 2008, Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells.: *Science*, v. 320.

Meyer,H, G Sutter, A Mayr, 1991, Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence: *J.Gen.Virol.*, v. 72 (Pt 5), p. 1031-1038.

Meyer,RK, M M Burger, R Tschannen, R Schafer, 1981, Actin filament bundles in vaccinia virus infected fibroblasts: *Arch.Virol.*, v. 67, p. 11-18.

Mikhailov,V, M Mikhailova, D J Pulkrabek, Z Dong, M A Venkatachalam, P Saikumar, 2001, Bcl-2 prevents Bax oligomerization in the mitochondrial outer membrane: *J.Biol.Chem.*, v. 276, p. 18361-18374.

Moon,KB, P C Turner, R W Moyer, 1999, SPI-1-dependent host range of rabbitpox virus and complex formation with cathepsin G is associated with serpin motifs: *J.Virol.*, v. 73, p. 8999-9010.

Mordmuller,B, D Krappmann, M Esen, E Wegener, C Scheidereit, 2003, Lymphotoxin and lipopolysaccharide induce NF-kappaB-p52 generation by a co-translational mechanism: *EMBO Rep.*, v. 4, p. 82-87.

Moss,B, 2006, Poxvirus entry and membrane fusion: *Virology*, v. 344, p. 48-54.

Moss,B, 2007, Poxviridae: The viruses and Their Replication, in DM Knipe and PM Howley (eds), *Fields Virology*.

Munro,S, H R Pelham, 1987, A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins: *Cell*, v. 48, p. 899-907.

Najera,JL, C E Gomez, E Domingo-Gil, M M Gherardi, M Esteban, 2006, Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene: *J.Virol.*, v. 80, p. 6033-6047.

Nechushtan,A, C L Smith, I Lamensdorf, S H Yoon, R J Youle, 2001, Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis: *J.Cell Biol.*, v. 153, p. 1265-1276.

Newsome,TP, N Scaplehorn, M Way, 2004, SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus: *Science*, v. 306, p. 124-129.

Okeke,MI, O Nilssen, T Traavik, 2006, Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines: *J.Gen.Virol.*, v. 87, p. 21-27.

Pelham,HR, 1990, The retention signal for soluble proteins of the endoplasmic reticulum: *Trends Biochem.Sci.*, v. 15, p. 483-486.

Pennington,TH, E A Follett, 1974, Vaccinia virus replication in enucleate BSC-1 cells: particle production and synthesis of viral DNA and proteins: *J.Virol.*, v. 13, p. 488-493.

Perkus,ME, S J Goebel, S W Davis, G P Johnson, K Limbach, E K Norton, E Paoletti, 1990, Vaccinia virus host range genes: *Virology*, v. 179, p. 276-286.

Perkus,ME, K Limbach, E Paoletti, 1989, Cloning and expression of foreign genes in vaccinia virus, using a host range selection system: *J.Virol.*, v. 63, p. 3829-3836.

Plummer,TH, Jr., A L Tarentino, 1991, Purification of the oligosaccharide-cleaving enzymes of *Flavobacterium meningosepticum*: *Glycobiology*, v. 1, p. 257-263.

Postigo,A, J R Cross, J Downward, M Way, 2006, Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis: *Cell Death.Differ.*, v. 13, p. 1651-1662.

Reckmann,I, S Higley, M Way, 1997, The vaccinia virus F17R protein interacts with actin: *FEBS Lett.*, v. 409, p. 141-146.

Rodger,G, G L Smith, 2002, Replacing the SCR domains of vaccinia virus protein B5R with EGFP causes a reduction in plaque size and actin tail formation but enveloped virions are still transported to the cell surface: *J.Gen.Virol.*, v. 83, p. 323-332.

Rosales,R, N Harris, B Y Ahn, B Moss, 1994a, Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit: *J.Biol.Chem.*, v. 269, p. 14260-14267.

Rosales,R, G Sutter, B Moss, 1994b, A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, v. 91, p. 3794-3798.

Sanderson,CM, F Frischknecht, M Way, M Hollinshead, G L Smith, 1998, Roles of vaccinia virus EEV-specific proteins in intracellular actin tail formation and low pH-induced cell-cell fusion: *J.Gen.Virol.*, v. 79 (Pt 6), p. 1415-1425.

Sanderson,CM, M Hollinshead, G L Smith, 2000, The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles: *J.Gen.Virol.*, v. 81, p. 47-58.

- Scaplehorn,N, A Holmstrom, V Moreau, F Frischknecht, I Reckmann, M Way, 2002, Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus: *Curr.Biol.*, v. 12, p. 740-745.
- Schmelz,M, B Sodeik, M Ericsson, E J Wolffe, H Shida, G Hiller, G Griffiths, 1994, Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network: *J.Virol.*, v. 68, p. 130-147.
- Shchelkunov,SN, V M Blinov, L S Sandakhchiev, 1993, Ankyrin-like proteins of variola and vaccinia viruses: *FEBS Lett.*, v. 319, p. 163-165.
- Shisler,JL, S N Isaacs, B Moss, 1999, Vaccinia virus serpin-1 deletion mutant exhibits a host range defect characterized by low levels of intermediate and late mRNAs: *Virology*, v. 262, p. 298-311.
- Shisler,JL, X L Jin, 2004, The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation: *J.Virol.*, v. 78, p. 3553-3560.
- Smith,GL, A Vanderplasschen, M Law, 2002, The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus: *J.Gen.Virol.*, v. 83, p. 2915-2931.
- Smith,GL, 2007, Genus *Orthopoxvirus: Vaccinia virus*, in AA Mercer, A Schmidt, and O Weber (eds), *Poxviruses*: Birkhäuser.
- Spehner,D, S Gillard, R Drillien, A Kirn, 1988, A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells: *J.Virol.*, v. 62, p. 1297-1304.
- Staib,C, I Drexler, M Ohlmann, S Wintersperger, V Erfle, G Sutter, 2000, Transient host range selection for genetic engineering of modified vaccinia virus Ankara: *Biotechniques*, v. 28, p. 1137-6, 1148.
- Staib,C, M Lowel, V Erfle, G Sutter, 2003, Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara: *Biotechniques*, v. 34, p. 694-6, 698, 700.
- Stittelaar,KJ, L S Wyatt, R L de Swart, H W Vos, J Groen, A G van, R S van Binnendijk, S Rozenblatt, B Moss, A D Osterhaus, 2000, Protective immunity in macaques vaccinated with a modified vaccinia virus Ankara-based measles virus vaccine in the presence of passively acquired antibodies: *J.Virol.*, v. 74, p. 4236-4243.
- Sun,Y, D W Leaman, 2005, Involvement of Noxa in cellular apoptotic responses to interferon, double-stranded RNA, and virus infection: *J.Biol.Chem.*, v. 280, p. 15561-15568.
- Sutter,G, B Moss, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, v. 89, p. 10847-10851.
- Sutter,G, A Ramsey-Ewing, R Rosales, B Moss, 1994a, Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant: *J.Virol.*, v. 68, p. 4109-4116.
- Sutter,G, C Staib, 2003, Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery: *Curr.Drug Targets.Infect.Disord.*, v. 3, p. 263-271.

- Sutter,G, L S Wyatt, P L Foley, J R Bennink, B Moss, 1994b, A recombinant vector derived from the host range-restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus stimulates protective immunity in mice to influenza virus: *Vaccine*, v. 12, p. 1032-1040.
- Tafani,M, J A Cohn, N O Karpnich, R J Rothman, M A Russo, J L Farber, 2002, Regulation of intracellular pH mediates Bax activation in HeLa cells treated with staurosporine or tumor necrosis factor-alpha: *J.Biol.Chem.*, v. 277, p. 49569-49576.
- Tanaka,K, T Chiba, 1998, The proteasome: a protein-destroying machine: *Genes Cells*, v. 3, p. 499-510.
- Tang,JX, P A Janmey, 1998, Two distinct mechanisms of actin bundle formation: *Biol.Bull.*, v. 194, p. 406-408.
- Thornberry,NA, 1998, Caspases: key mediators of apoptosis: *Chem.Biol.*, v. 5, p. R97-103.
- Tooze,J, M Hollinshead, B Reis, K Radsak, H Kern, 1993, Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes: *Eur.J.Cell Biol.*, v. 60, p. 163-178.
- Townsley,AC, A S Weisberg, T R Wagenaar, B Moss, 2006, Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway: *J.Virol.*, v. 80, p. 8899-8908.
- Tulman,ER, G Delhon, C L Afonso, Z Lu, L Zsak, N T Sandybaev, U Z Kerembekova, V L Zaitsev, G F Kutish, D L Rock, 2006, Genome of horsepox virus: *J.Virol.*, v. 80, p. 9244-9258.
- Valderrama,F, J V Cordeiro, S Schleich, F Frischknecht, M Way, 2006, Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling: *Science*, v. 311, p. 377-381.
- van Eijl,H, M Hollinshead, G L Smith, 2000, The vaccinia virus A36R protein is a type Ib membrane protein present on intracellular but not extracellular enveloped virus particles: *Virology*, v. 271, p. 26-36.
- Vanderplassen,A, G L Smith, 1997, A novel virus binding assay using confocal microscopy: demonstration that the intracellular and extracellular vaccinia virions bind to different cellular receptors: *J.Virol.*, v. 71, p. 4032-4041.
- Vollmar,J, N Arndtz, K M Eckl, T Thomsen, B Petzold, L Mateo, B Schlereth, A Handley, L King, V Hulsemann, M Tzatzaris, K Merkl, N Wulff, P Chaplin, 2006, Safety and immunogenicity of IMVAMUNE, a promising candidate as a third generation smallpox vaccine: *Vaccine*, v. 24, p. 2065-2070.
- Wagenaar,TR, B Moss, 2007, Association of vaccinia virus fusion regulatory proteins with the multicomponent entry/fusion complex: *J.Virol.*, v. 81, p. 6286-6293.
- Wallin,A, Z Luksiene, K Zagminas, G Surkiene, 2007, Public health and bioterrorism: renewed threat of anthrax and smallpox: *Medicina (Kaunas)*, v. 43, p. 278-284.
- Wang,X, 2001, The expanding role of mitochondria in apoptosis: *Genes Dev.*, v. 15, p. 2922-2933.
- Ward,BM, 2005, Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions: *J.Virol.*, v. 79, p. 4755-4763.

Wasilenko,ST, T L Stewart, A F Meyers, M Barry, 2003, Vaccinia virus encodes a previously uncharacterized mitochondrial-associated inhibitor of apoptosis: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 100, p. 14345-14350.

Webb,TJ, R A Litavec, M A Khan, W Du, J Gervay-Hague, G J Renukaradhya, R R Brutkiewicz, 2006, Inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation by the vaccinia virus B1R and H5R molecules: Eur.J.Immunol., v. 36, p. 2595-2600.

Wolffe,EJ, A S Weisberg, B Moss, 1998, Role for the vaccinia virus A36R outer envelope protein in the formation of virus-tipped actin-containing microvilli and cell-to-cell virus spread: Virology, v. 244, p. 20-26.

Wyatt,LS, P L Earl, L A Eller, B Moss, 2004, Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge: Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, v. 101, p. 4590-4595.

Wyatt,LS, S S Whitehead, K A Venanzi, B R Murphy, B Moss, 1999, Priming and boosting immunity to respiratory syncytial virus by recombinant replication-defective vaccinia virus MVA: Vaccine, v. 18, p. 392-397.

Xiang,Y, D A Simpson, J Spiegel, A Zhou, R H Silverman, R C Condit, 1998, The vaccinia virus A18R DNA helicase is a postreplicative negative transcription elongation factor: J.Virol., v. 72, p. 7012-7023.

Yuwen,H, J H Cox, J W Yewdell, J R Bennink, B Moss, 1993, Nuclear localization of a double-stranded RNA-binding protein encoded by the vaccinia virus E3L gene: Virology, v. 195, p. 732-744.

8 Anhang

Anhang A: Sequenzen der Proteine C12, C16, M1, M2 und 037 aus CVA 152

Im Folgenden sind die Aminosäuresequenzen der Proteine C12/SPI-1, C16, M1, M2 und des Proteins 037 aus CVA 152 im Einbuchstabencode aufgeführt. Beim Sequenzvergleich (*alignment*) mit homologen Proteinen aus verwandten Vacciniaviren sind übereinstimmende Bereiche jeweils gelb unterlegt. Eine blaue Markierung kennzeichnet Bereiche, in denen nicht alle verglichenen Viren identische Sequenzen aufweisen, eine grüne Markierung steht für AS mit ähnlichen Eigenschaften.

		1		50
SPI-1 CVA 152	(1)	MDIFKELI	VKHP	DENVLISPVSILSTLSILNHGAAGSTAEQLSKYIENMN
SPI-1 RPX	(1)	MDIFKELI	LKHP	DENVLISPVSILSTLSILNHGAAGSTAEQLSKYIENVN
SPI-1 WR	(1)	MDIFKELI	LKHT	DENVLISPVSILSTLSILNHGAAGSTAEQLSKYIENMN
Consensus	(1)	MDIFKELILKHP	DENVLISPVSILSTLSILNHGAAGSTAEQLSKYIENMN	
		51		100
SPI-1 CVA 152	(51)	ENTP	----	DDNNDMDVDIPYCATLATANKIY
SPI-1 RPX	(51)	ENTP	DDKK	DDNNDMDVDIPYCATLATANKIY
SPI-1 WR	(51)	ENTP	----	DDNNDMDVDIPYCATLATANKIY
Consensus	(51)	ENTP	DDNNDMDVDIPYCATLATANKIY	SDSIEFHASFLQKIKDDF
		101		150
SPI-1 CVA 152	(97)	QTVNFNNANQTKELINEWVKMTMTNGKINSLLTSPLSINTRMTVVS	SAVHFK	
SPI-1 RPX	(101)	QTVNFNNANQTKELINEWVKMTMTNGKINSLLTSPLSINTRMTVVS	SAVHFK	
SPI-1 WR	(97)	QTVNFNNANQTKELINEWVKMTMTNGKINSLLTSPLSINTRMTVVS	SAVHFK	
Consensus	(101)	QTVNFNNANQTKELINEWVKMTMTNGKINSLLTSPLSINTRMTVVS	SAVHFK	
		151		200
SPI-1 CVA 152	(147)	AMWKYPFSKHLTYTDKFIYSKNIVTSVDMMV	GTENN	LQYVHINELFGGFS
SPI-1 RPX	(151)	AMWKYPFSKHLTYTDKFIYSKNIVTSVDMMV	STENN	LQYVHINELFGGFS
SPI-1 WR	(147)	AMWKYPFSKHLTYTDKFIYSKNIVTSVDMMV	GTENN	LQYVHINELFGGFS
Consensus	(151)	AMWKYPFSKHLTYTDKFIYSKNIVTSVDMMV	STENN	LQYVHINELFGGFS
		201		250
SPI-1 CVA 152	(197)	IIDIPYEGNSSMVIILPDDIEGIYNI	EKNITDEKFKKWC	GMLSTKSIDLY
SPI-1 RPX	(201)	IIDIPYEGNSSMVIILPDDIEGIYNI	EKNITDEKFKKWC	GMLSTKSIDLY
SPI-1 WR	(197)	IIDIPYEGNSSMVIILPDDIEGIYNI	EKNITDEKFKKWC	GMLSTKSIDLY
Consensus	(201)	IIDIPYEGNSSMVIILPDDIEGIYNI	EKNITDEKFKKWC	GMLSTKSIDLY
		251		300
SPI-1 CVA 152	(247)	MPKFKVEMTEPYNLVPILENLGLTNIF	GYADF	SKMCNETITVEKFLH
SPI-1 RPX	(251)	MPKFKVEMTEPYNLVPILENLGLTNIF	GYADF	SKMCNETITVEKFLH
SPI-1 WR	(247)	MPKFKVEMTEPYNLVPILENLGLTNIF	GYADF	SKMCNETITVEKFLH
Consensus	(251)	MPKFKVEMTEPYNLVPILENLGLTNIF	GYADF	SKMCNETITVEKFLHT
		301		350
SPI-1 CVA 152	(297)	FIDVNEEY	TEASAVTG	VFM
SPI-1 RPX	(301)	FIDVNEEY	TEASAVTG	VFM
SPI-1 WR	(297)	FIDVNEEY	TEASAVTG	VFM
Consensus	(301)	FIDVNEEY	TEASAVTG	VFM

			351
SPI-1 CVA 152	(347)	GKYCYPQ	
SPI-1 RPX	(351)	GKYCYPQ	
SPI-1 WR	(347)	GKYCYPQ	
Consensus	(351)	GKYCYPQ	

Abbildung 7.1: Sequenzvergleich der Proteine SPI-1/C12_{CVA 152}, SPI-1_{RPV} und SPI-1_{WR}. Der Bereich des *reactive center loop*, der ausschlaggebend ist für die inhibitorische Funktion der Serpine, wird durch die blau umrandete Sequenz gebildet und zeigt innerhalb von CVA 152, RPX und WR 100%ige Übereinstimmung.

			1		50
B22 CVA 386	(1)	MKPKVNNIGNTPLHNYVSQYDITLIPHPQPIKKWKLKPSISINGYRSTFT			
C16/B22 CVA 152	(1)	MKPKVNNIGNTPLHNYVSQYDITLIPHPQPIKKWKLKPSISINGYRSTFT			
Consensus	(1)	MKPKVNNIGNTPLHNYVSQYDITLIPHPQPIKKWKLKPSISINGYRSTFT			
			51		100
B22 CVA 386	(51)	MAFPCAQFRPCHCHATKDSLNTVADVRHCLTEYILWVSHRWTHRESAGSL			
C16/B22 CVA 152	(51)	MAFPCAQFRPCHCHATKDSLNTVADVRHCLTEYILWVSHRWTHRESAGSL			
Consensus	(51)	MAFPCAQFRPCHCHATKDSLNTVADVRHCLTEYILWVSHRWTHRESAGSL			
			101		150
B22 CVA 386	(101)	YRL LISFR TDATELFGGELKDSL PWR S L N ----- DSMKTAEEL			
C16/B22 CVA 152	(101)	YRL LISFR TDATELFGGELKDSL PWR N I DNCVEI I KCF I R N DSMKTAEEL			
Consensus	(101)	YRL LISFR TDATELFGGELKDSL PWR I DSMKTAEEL			
			151		200
B22 CVA 386	(139)	RAI IGLCTQSAIVSGRVFN DKY I D I L L M L R K I L N E N D Y L T L L D H I R T A K Y			
C16/B22 CVA 152	(151)	RAI IGLCTQSAIVSGRVFN DKY I D I L L M L R K I L N E N D Y L T L L D H I R T A K Y			
Consensus	(151)	RAI IGLCTQSAIVSGRVFN DKY I D I L L M L R K I L N E N D Y L T L L D H I R T A K Y			

Abbildung 7.2: Sequenzvergleich der Proteine C16/B22_{CVA 152} und B22_{CVA 386}. Die AS-Positionen 126-129 sind innerhalb von B22_{CVA 386} gegenüber C16/B22_{CVA 152} mutiert und die AS-Positionen 130 bis 141 zusätzlich deletiert.

			1		50
M1 152	(1)	MIFVIESKLLQIYRNRN--INFYTTMDNIMS AEYYLSLYAKYNSKNLDVF			
M1 COP	(1)	MIFVIESKLLQIYRNRNRNINFYTTMDNIMS AEYYLSLYAKYNSKNLDVF			
Protein037 152	(1)	-----			
Consensus	(1)	MIFVIESKLLQIYRNRN INFYTTMDNIMS AEYYLSLYAKYNSKNLDVF			
			51		100
M1 152	(49)	RNMLQAI E P S G N N Y H I L H A Y C G I K G L D E R F V E E L L H R G Y S P N E T D D D G N Y			
M1 COP	(51)	RNMLQAI E P S G N N Y H I L H A Y C G I K G L D E R F V E E L L H R G Y S P N E T D D D G N Y			
Protein037 152	(1)	-----			
Consensus	(51)	RNMLQAI E P S G N N Y H I L H A Y C G I K G L D E R F V E E L L H R G Y S P N E T D D D G N Y			
			101		150
M1 152	(99)	PLHIASKINNNRIVAMLLTHGADPNACDKQHKTPLYL SGT D D E V I E R I N			
M1 COP	(101)	PLHIASKINNNRIVAMLLTHGADPNACDKHNKTPLYL SGT D D E V I E R I N			
Protein037 152	(1)	-----			
Consensus	(101)	PLHIASKINNNRIVAMLLTHGADPNACDK K T P L Y L S G T D D E V I E R I N			
			151		200
M1 152	(149)	LLVQYGAKINNSVDEEGCGPLLACTDPSERVF KK I M S I G F E A R I V D K F G K			
M1 COP	(151)	LLVQYGAKINNSVDEEGCGPLLACTDPSERVF KK I M S I G F E A R I V D K F G K			
Protein037 152	(1)	-----			
Consensus	(151)	LLVQYGAKINNSVDEEGCGPLLACTDPSERVF KK I M S I G F E A R I V D K F G K			
			201		250
M1 152	(199)	NHIHRHLS D N P K A S T I S W M M K L G I S P S K P D H D G N T P L H I V C S K T V K N V D			
M1 COP	(201)	NHIHRHLS D N P K A S T I S W M M K L G I S P S K P D H D G N T P L H I V C S K T V K N V D			
Protein037 152	(1)	-----			
Consensus	(201)	NHIHRHLS D N P K A S T I S W M M K L G I S P S K P D H D G N T P L H I V C S K T V K N V D			

			251		300
	M1 152	(249)	IIDL LLPSTDVNKQNKFGDSPLTLLIKTLSPAHLINKLLSTSNVITDQTV		
	M1 COP	(251)	IIDL LLPSTDVNKQNKFGDSPLTLLIKTLSPAHLINKLLSTSNVITDQTV		
	Prot. 037 152	(1)	-----		
	Consensus	(251)	IIDL LLPSTDVNKQNKFGDSPLTLLIKTLSPAHLINKLLSTSNVITDQTV		
			301		350
	M1 152	(299)	NICIFYDRDDVLEIINDKGG---QYDFKMAVEVGSIRCVKYLLDNDIICE		
	M1 COP	(301)	NICIFYDRDDVLEIINDKGGQYDSTDFKMAVEVGSIRCVKYLLDNDIICE		
	Prot. 037 152	(1)	-----		
	Consensus	(301)	NICIFYDRDDVLEIINDKGGDFKMAVEVGSIRCVKYLLDNDIICE		
			351		400
	M1 152	(346)	DAMYYAVLSEYETMVDYLLFNHFSVDSV VNGHTCMSECVKLNNRHFTEAD		
	M1 COP	(351)	DAMYYAVLSEYETMVDYLLFNHFSVDSV VNGHTCMSECVRLNNPVITLSKL		
	Prot. 037 152	(1)	-----		
	Consensus	(351)	DAMYYAVLSEYETMVDYLLFNHFSVDSV VNGHTCMSECVKLNN I		
			401		450
	M1 152	(396)	VT-----		
	M1 COP	(401)	MLHNPTSETMYLTMKAI EKDKLDKSI IIPF IAYFVLMHPDFCKNRRYFTS		
	Prot. 037 152	(1)	MLHNPTSETMYLTMKAI EKDKLDKSI IIPF IAYFVLMHPDFCKNRRYFTS		
	Consensus	(401)	MLHNPTSETMYLTMKAI EKDKLDKSI IIPF IAYFVLMHPDFCKNRRYFTS		
			451		472
	M1 152	(398)	-----		
	M1 COP	(451)	YKRFVTDYVHEGVSYEVFDDYF		
	Prot. 037 152	(51)	YKRFVTDYVHEGVSYEVFDDYF		
	Consensus	(451)	YKRFVTDYVHEGVSYEVFDDYF		

Abbildung 7.3: Sequenzvergleich der Proteine M1 und 037 aus CVA 152 sowie des M1_{COP}. Bis auf wenige Aminosäuren ergänzen sich die Proteine M1 und 037 aus CVA 152 zum M1_{COP}. Dies deutet darauf hin, dass M1_{CVA 152} und 037_{CVA 152} aus einer gemeinsamen Vorstufe entstanden sind, die dem M1_{COP} entspricht.

			1		50
	M2 WR*	(1)	MVYKLVLLFCIASLGY SVEYKNTICPPRQDYRYWYFAAELTIGVNYDINS		
	M2 WR	(1)	MVYKLVLLFCIASLGY SVEYKNTICPPRQDYRYWYFAAELTIGVNYDINS		
	M2 CVA 152	(1)	MVYKLVLLFCIASLGY SVEYKNTICPPRQDYRYWYFAAELTIGVNYDINS		
			51		100
	M2 WR*	(51)	TIIGECHMSES YIDRNANIVLTGYGLEINMTIMDTDQRFVAAAEGVGKDN		
	M2 WR	(51)	TIIGECHMSES YIDRNANIVLTGYGLEINMTIMDTDQRFVAAAEGVGKDN		
	M2 CVA 152	(51)	TIIGECHMSES YIDRNANIVLTGYGLEINMTIMDTDQRFVAAAEGVGKDN		
			101		150
	M2 WR*	(101)	KLSVLLFTTQRLDKVHHNISVTITCMEMNCGTTKYDSDLPESIHKSSSCD		
	M2 WR	(101)	KLSVLLFTTQRLDKVHHNISVTITCMEMNCGTTKYDSDLPESIHKSSSCD		
	M2 CVA 152	(101)	KLSVLLFTTQRLDKVHHNISVTITCMEMNCGTTKYDSDLPESIHKSSSCD		
			151		200
	M2 WR*	(151)	ITINGSCVTCVNLETDP TKINPHYLHPKDKYLYHNSEYGMRGSYGVTRFD		
	M2 WR	(151)	ITINGSCVTCVNLETDP TKINPHYLHPKDKYLYHNSEYSMRGSYGVTRFD		
	M2 CVA 152	(151)	ITINGSCVTCVNLETDP TKINPHYLHPKDKYLYHNSEYSMRGSYGVTRFD		
			201		220
	M2 WR*	(201)	ELNQCLLDIKELSYDICYRE		
	M2 WR	(201)	ELNQCLLDIKELSYDICYRE		
	M2 CVA 152	(201)	ELNQCLLDIKKLSYDICYRE		

Abbildung 7.4: Sequenzvergleich der Proteine M2_{WR}*, M2_{WR} und M2_{CVA 152}. Potentielle *retrieval signals* sind gekennzeichnet. Das von Hinthong et al. (2007) charakterisierte M2_{WR}* unterscheidet sich vom M2_{CVA 152} in den Aminosäurepositionen 189 und 211.

Anhang B: Durchflusszytometrie

Im Abschnitt 5.8 wurde die Analyse der Proteine SPI-1/C12, C14 und C15 hinsichtlich einer potentiell antiapoptotischen Funktion beschrieben. Im Rahmen dessen wurde eine Doppel-AK-Färbung gegen den *myc-tag* der Proteine sowie aktivierte Caspase-3 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Durchflusszytometrie und ist nachfolgend auszugsweise dargestellt.

Im linken Diagramm der Abbildungen sind jeweils ausschließlich *myc*-negative (untransfizierte) und im rechten Diagramm ausschließlich *myc*-positive (transfizierte) Zellen erfasst, die über die aktivierte Caspase-3-Färbung (x-Achse) jeweils zusätzlich in apoptotische und nicht apoptotische Zellen differenziert werden können. Dadurch ist es möglich, den Anteil apoptotischer Zellen an den nicht transfizierten mit dem Anteil apoptotischer Zellen an den transfizierten Zellen zu vergleichen (siehe Legende).

Die farbliche Zuordnung innerhalb der Legende ist hierbei etwas verwirrend. Die Menge der transfizierten Zellen wird durch die Gesamtheit des rechten Diagramms und die der untransfizierten durch die Gesamtheit des linken Diagramms gebildet; nicht nur, wie in der Legende angezeigt, durch die grün bzw. blau gefärbten Zellen.

Einige Ansätze wurden doppelt durchgeführt und die Ergebnisse ihrer Auswertung nachfolgend gemittelt (siehe 5.8). In diesen Fällen sind hier die Daten lediglich eines Ansatzes dargestellt.

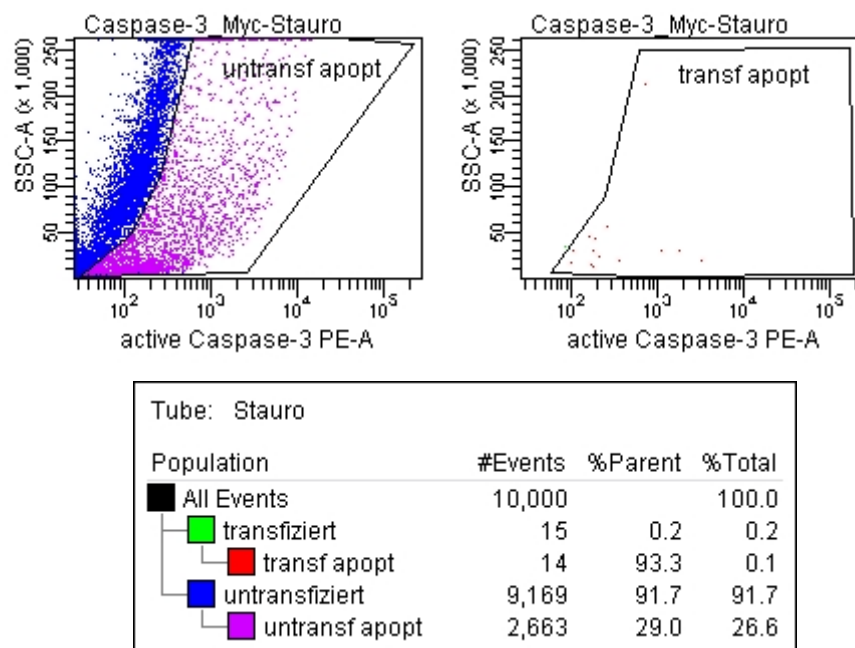


Abbildung 7.5: Durchflusszytometrie untransfizierter, mit Staurosporin behandelter Zellen.

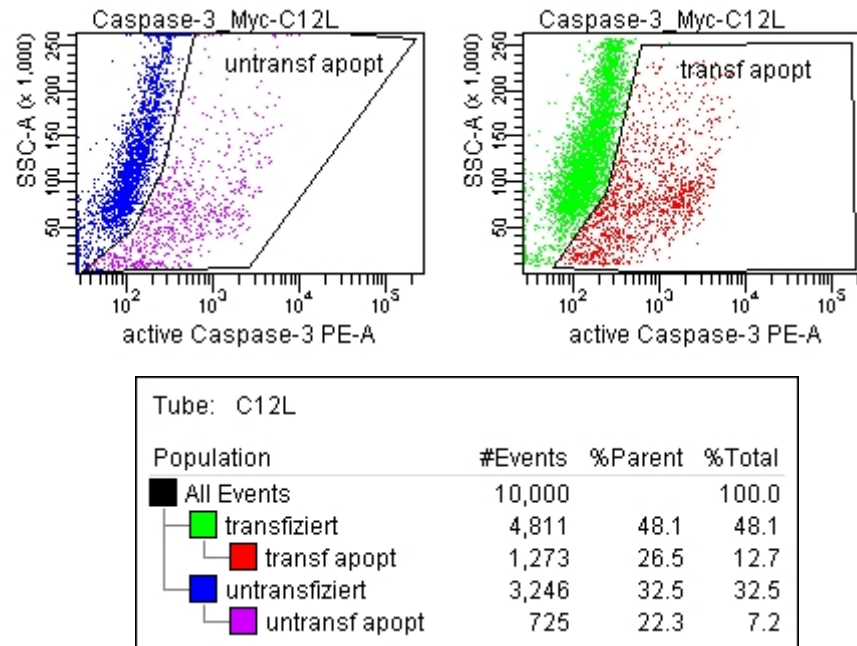


Abbildung 7.6: Durchflusszytometrie pcDNA-C12L-mycHis transfizierter, unbehandelter Zellen.

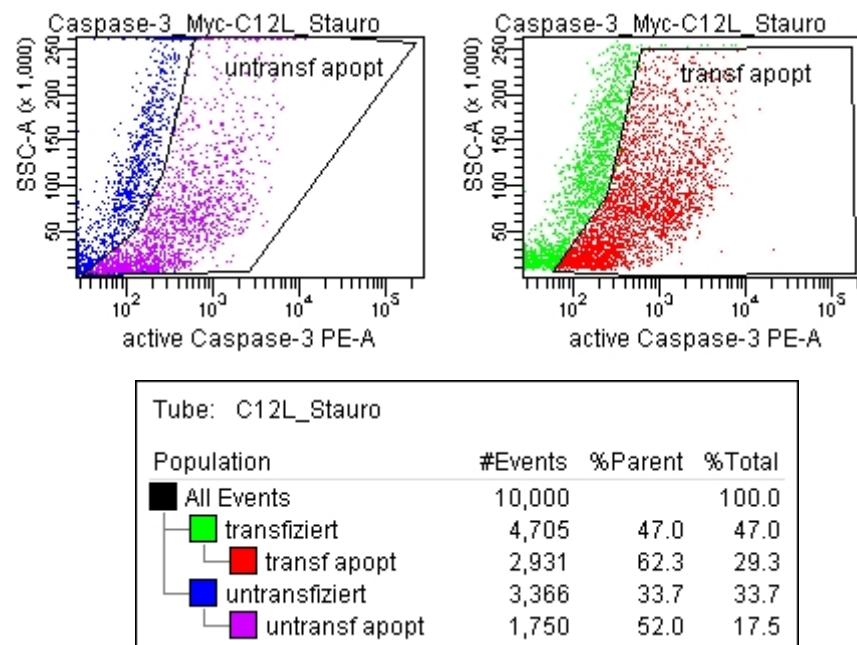


Abbildung 7.7: Durchflusszytometrie pcDNA-C12L-mycHis transfizierter, mit Staurosporin behandelte Zellen.

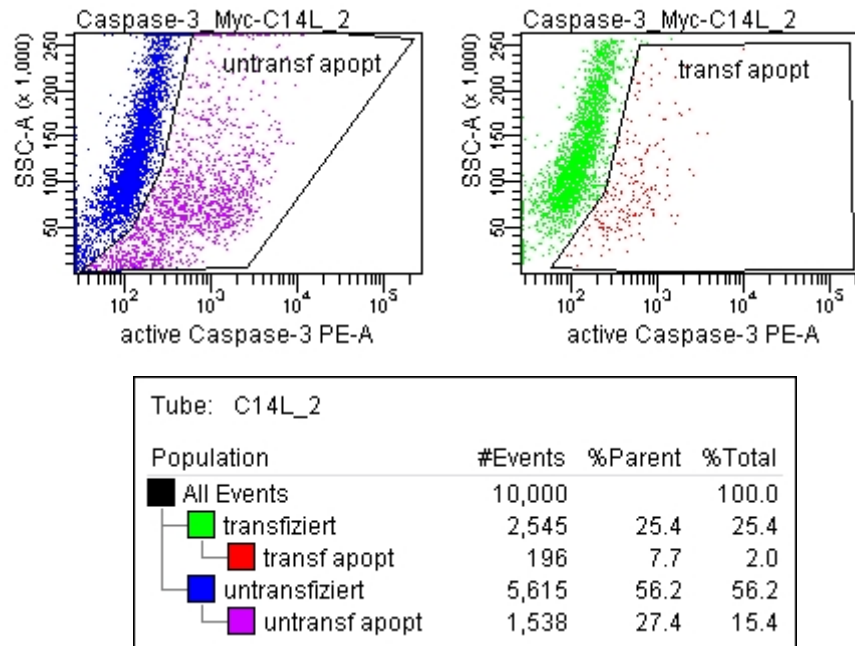


Abbildung 7.8: Durchflusszytometrie pcDNA-C14L-mycHis transfizierter, unbehandelter Zellen.

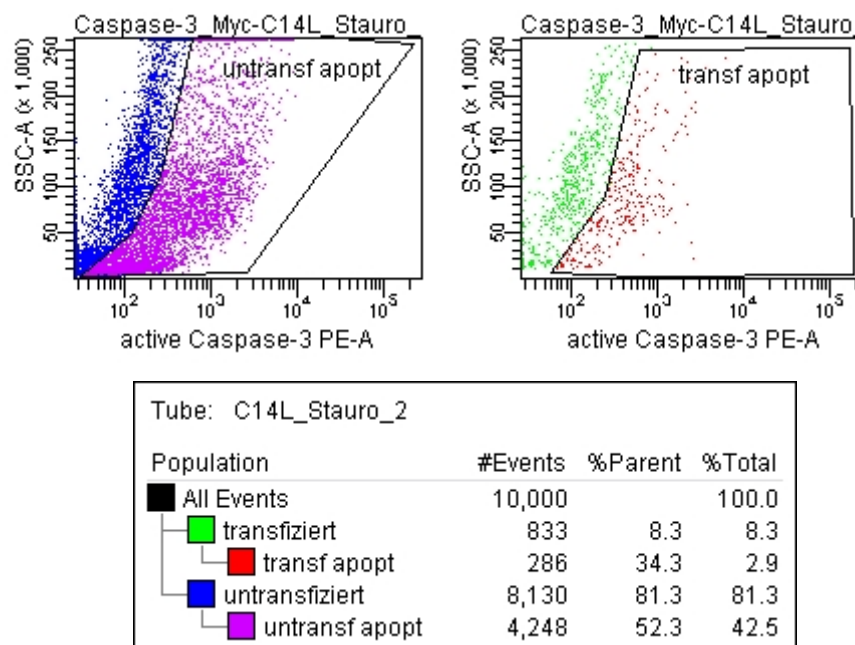


Abbildung 7.9: Durchflusszytometrie pcDNA-C14L-mycHis transfizierter, mit Staurosporin behandelte Zellen.

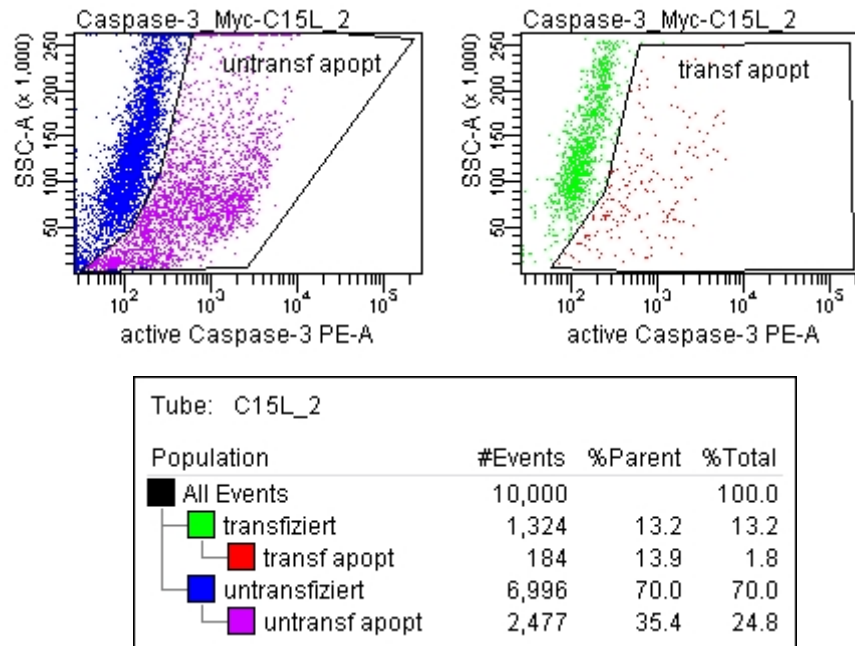


Abbildung 7.10: Durchflusszytometrie pcDNA-C15L-mycHis transfizierter, unbehandelter Zellen.

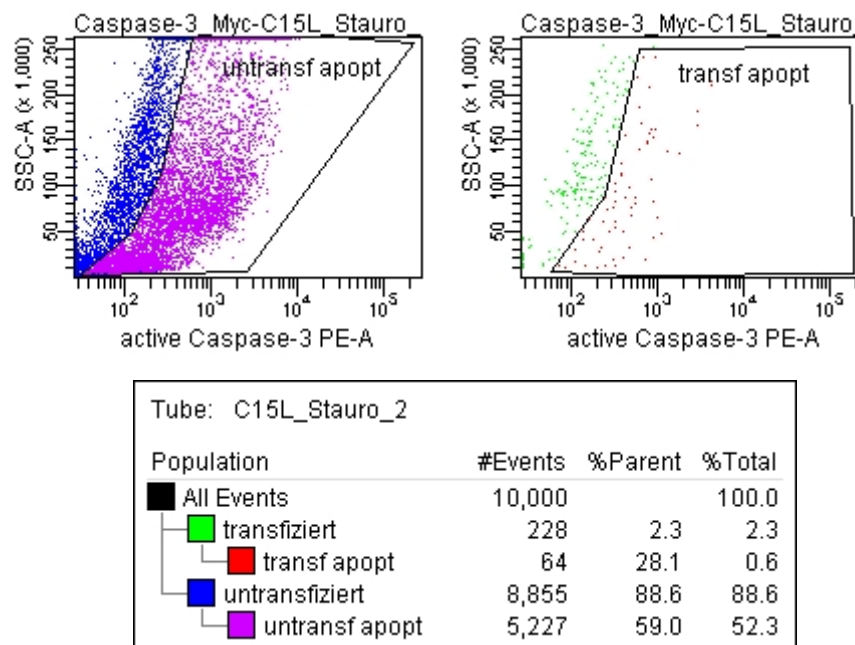


Abbildung 7.11: Durchflusszytometrie pcDNA-C15L-mycHis transfizierter, mit Staurosporin behandelte Zellen.

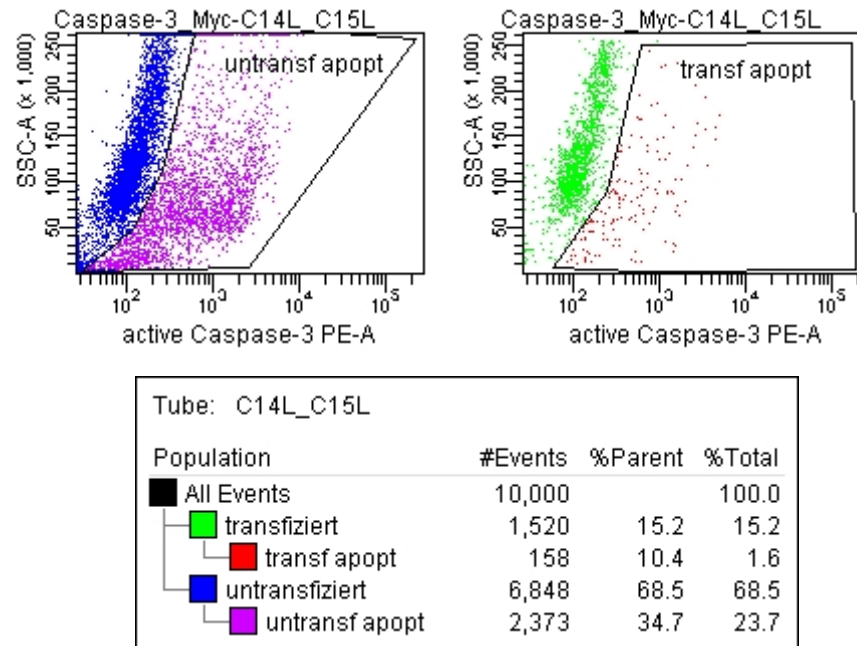


Abbildung 7.12: Durchflusszytometrie pcDNA-C14L-mycHis und pcDNA-C15L-mycHis transfizierter, unbehandelter Zellen.

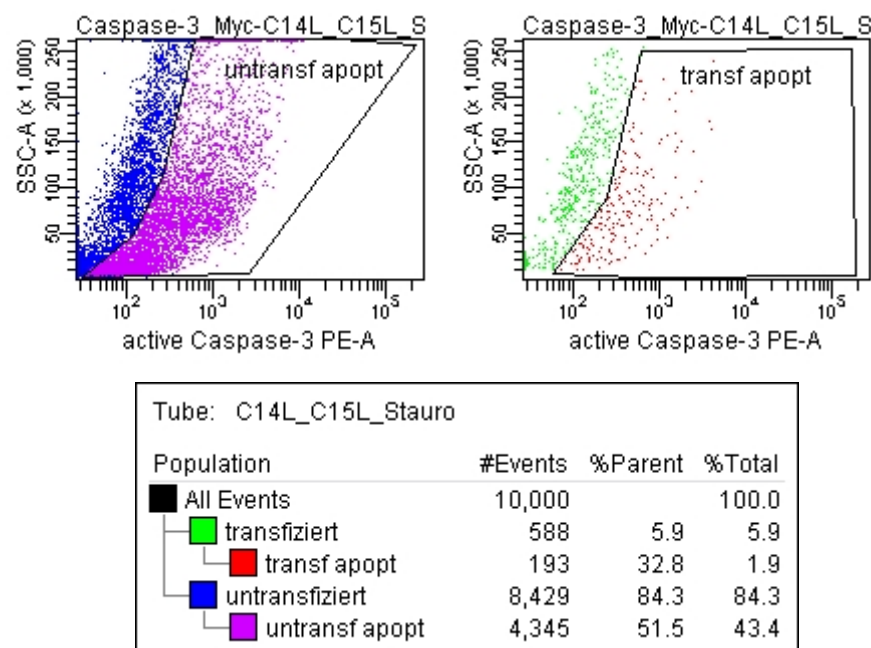


Abbildung 7.13: Durchflusszytometrie pcDNA-C14L-mycHis und pcDNA-C15L-mycHis transfizierter, mit Staurosporin behandelter Zellen.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter und Frau Prof. Dr. Barbara Schnierle für die Möglichkeit der Anfertigung dieser Doktorarbeit und die herzliche Aufnahme innerhalb der Arbeitsgruppe sowie für die entgegengebrachte Unterstützung und Hilfsbereitschaft.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hans Wilhelm Doerr für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur.

Ein ganz besonderer Dank geht an Katja Sliva, die mir eine in fachlicher wie auch menschlicher Hinsicht absolut einzigartige Betreuung zukommen ließ. Ebenfalls danke ich Ulrike Mettler für die vorbildliche Betreuung meiner Immunfluoreszenzprojekte.

Ich bedanke mich herzlich bei Melanie Kremer für ihre Fachkenntnisse und aufopfernde Hilfsbereitschaft, nicht nur bei diversen Apoptoseassays.

Mein ausdrücklicher Dank gilt ebenfalls Dr. Klaus Boller vom Fachgebiet Morphologie, der sich innerhalb zahlreicher gemeinsamer Stunden vor dem Laserscanmikroskop stets Zeit auch für teilweise komplexe Problemstellungen nahm.

Ein großes Dankeschön geht auch an Christine von Rhein für ihre herzliche Hilfsbereitschaft, v.a. in der ersten Zeit meiner Doktorarbeit. Weiterhin danke ich Karin Sperling für eine enorme Diskussionsbereitschaft selbst zu teilweise ungewöhnlichen Tageszeiten.

Ebenfalls möchte ich mich bei Yasemin Süzer, Astrid Schwantes und Matthias Hamdorf bedanken, die mich durch viele hilfreiche Ratschläge nicht zuletzt auch bei der Fertigstellung dieser Arbeit wesentlich unterstützt haben.

Für die herzliche Labornachbarschaft bedanke ich mich bei Daniela Müller, Yolanda Martinez-Fernandez und Maja Teklic.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Virologie des Paul-Ehrlich-Instituts, namentlich Melanie Albrecht, Madlen Dildey, Jasminka Geise, Meike Gratz, Dagmar Fecht-Schwarz, Matthias Hamdorf, Melanie Kremer, Markus Lantermann, Michael Lehmann, Yolanda Martinez-Fernandez, Daniela Müller, Marcos Palomo, Alexandra Pinczolits, Thomas Preuss, Timo Schippers, Astrid Schwantes, Katja Sliva, Karin Sperling, Yasemin Sützer, Christine von Rhein, Christine Wrede, Angela Zeiler, Stefan Zimmerling und Joachim Zwilling möchte ich mich für die mir entgegengebrachte, immer währende Hilfsbereitschaft bedanken. Danke für eine tolle Zeit, in der ich viele wunderbare Menschen kennen lernen durfte!!!

Schließlich geht mein Dank an meine Familie und Freunde, die mein monatelanges „Verschwinden“ nahezu anstandslos toleriert haben und mich dennoch in jeglicher Hinsicht unterstützt haben, wo es nur möglich war. Insbesondere danke ich meiner Mutter Katharina und meinem Vater Jürgen, dem es u.a. gelungen ist, in mir die Freude am „Wissen um des Wissens willen“ zu entfachen. Danke, dass ihr da seid.

Curriculum vitae

Robert Merget

Persönliche Angaben

19.04.1985 in Aschaffenburg geboren
Vater: Jürgen Merget, Dipl.Kfm, Dipl. Math., selbstständig
Mutter: Katharina Merget, Verwaltungsangestellte
Geschwister: 2 Schwestern (geb. 1984, 1992)

Schule

1991 – 1994 Bürgerhausschule Nieder Roden
1994 – 2000 Gymnasium der Einhardschule, Seligenstadt
2000 – 2003 Claus-von-Stauffenberg-Schule, Rodgau (gymnasiale Oberstufe)
2003 Abitur

Universität

ab Wintersemester 2003 Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt a. M.,
Studium der Humanmedizin
2005 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2007 – 2008 Doktorarbeit am Paul-Ehrlich-Institut, Langen
ab Februar 2009 Praktisches Jahr am Bürgerhospital, Frankfurt

Sonstige Tätigkeiten und Hobbies

	Leistungstennis
	Trompete in verschiedenen Orchestern/ Bands
1998 – 2002	Ausbilder für Blockflöten
2001 – 2005	Mathematiknachhilfelehrer für Oberstufe
seit 2003	Tennistrainer im Jugend- und Erwachsenenbereich
seit 2009	Sportwart im 1. TC Nieder Roden
2006 – 2007	Studentische Hilfskraft im Diabetes-Therapiezentrum der Universitätsklinik Frankfurt

Rodgau, den 30.10.2009

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel "Funktionelle Analyse von Vacciniavirus Proteinen" in der Abteilung Virologie des Paul-Ehrlich-Instituts Langen unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Barbara Schnierle, Dr. Katja Sliva und Dr. Ulrike Mettler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Ort und Datum

Robert Merget

