



**Untersuchung der Ursachen des eingeschränkten  
Wirtstropismus des modifizierten Vacciniavirus Ankara unter  
Berücksichtigung der viralen Gene C7L, K1L und F11L**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Joachim Zwillig**  
aus Langen (Hessen)

Frankfurt am Main 2010  
(D30)

vom Fachbereich Biowissenschaften (15)  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter:

Datum der Disputation:

---

---

---

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden.

Mörfelden, den 12.11.2010

---

Joachim Zwilling

*Meiner Familie*



Wesentlich Teile dieser Dissertation wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht bzw. werden zur Veröffentlichung vorbereitet:

**Backes S\*, Sperling KM\*, Zwilling J\*, Gasteiger G, Ludwig H, Kremmer E, Schwantes A, Staib C and Sutter G.** Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ . **J Gen Virol.** 2010 Feb;91(Pt 2): 470-82.

\* Geteilte Erstautorenschaft

**Zwilling J, Sliva K, Schwantes A, Schnierle B and Sutter G.** Functional F11L and K1L genes in modified vaccinia virus Ankara restore virus induced cell motility but not growth in human and murine cells. **Virology.** 2010 Sep 1;404(2): 231-9.

**Zwilling J, Lehmann MH, Schwantes A and Sutter G.** Vaccinia virus host-range factor C7 prevents NF- $\kappa$ B activation in human and murine cells. Manuskript in Vorbereitung.

Zur Veröffentlichung vorgesehene Manuskripte, deren Daten nicht in die Dissertation mit einbezogen wurden:

**Zwilling J\*, Schwantes A\*, Sammons SA\*, Suezer Y, Sliva K, Pinczolits A, Boller K, Schnierle B, Damon IK, Esposito JJ and Sutter G.** Genomic sequencing and phenotypical characterization of precursor isolates of the modified vaccinia virus Ankara predict gene profiles responsible for its replication deficiency and attenuation. Manuskript in Vorbereitung.

\* Geteilte Erstautorenschaft

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Vorwort.....	2
2.2	Pockenviren – Krankheitserreger und Impfstoff.....	2
2.2.1	Aufbau und Nomenklatur der Pockenviruspartikel .....	3
2.2.2	Replikationszyklus der Pockenviren .....	5
2.3	Das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) .....	7
2.3.1	Entstehung und Charakteristika von MVA .....	8
2.4	VACV <i>host-range</i> -Gene .....	9
2.4.1	Die Funktion der <i>host-range</i> -Gene E3L und K3L.....	10
2.4.2	Die Funktion der <i>host-range</i> -Gene K1L und C7L.....	12
2.4.3	Das potentielle <i>host-range</i> -Gen F11L.....	14
2.5	Zielsetzung der Dissertation.....	15
3	Material und Methoden.....	16
3.1	Material .....	16
3.1.1	Chemikalien und Reagenzien.....	16
3.1.2	Gebrauchslösungen.....	17
3.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	20
3.1.4	Geräte und Apparaturen.....	21
3.1.5	Zellkulturmedien und -reagenzien.....	23
3.1.6	Zusammensetzung der Zellkulturmedien .....	23
3.1.7	Eukaryotische Zelllinien .....	24
3.1.8	Kommerziell erhältliche Systeme, <i>Kits</i> und Standards.....	25
3.1.9	Plasmide .....	26
3.1.10	Viren.....	28
3.1.11	Oligonukleotide ( <i>Primer</i> ).....	29
3.1.12	Antikörper.....	30
3.2	Methoden.....	32
3.2.1	Zellbiologische Methoden.....	32
3.2.2	Molekularbiologische Methoden - Arbeiten mit DNA.....	34
3.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	41
3.2.4	Massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen nach tryptischem Verdau.....	52

---

3.2.5	Hefe-2-Hybrid-Analysen .....	53
3.2.6	Virologische Methoden.....	53
3.2.7	Elektronenmikroskopische Untersuchung der Virionenmorphologie .....	58
4	Ergebnisse .....	60
4.1	Analyse der Genexpression der verwendeten rekombinanten MVA-Viren.....	60
4.2	Untersuchungen zur MVA-induzierten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung.....	63
4.2.1	K1 und C7 inhibieren die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung.....	64
4.2.2	Die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase R (PKR) verursacht .....	66
4.2.3	Eine reduzierte E3-Expression in MVA $\Delta$ C7L infizierten Zellen ist nicht verantwortlich für die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch die PKR.....	69
4.2.4	Das Fehlen der PKR reicht nicht aus, um die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L wiederherzustellen .....	71
4.3	Untersuchungen zur MVA-induzierten Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs .....	73
4.3.1	C7 reduziert den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$ .....	73
4.3.2	C7 reduziert die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Nukleus.....	75
4.3.3	Die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist unabhängig von der späten Genexpression .....	77
4.3.4	In PKR <sup>-/-</sup> -MEF ist die NF $\kappa$ B-Aktivierung nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion teilweise aufgehoben.....	79
4.4	Identifizierung möglicher Interaktionspartner von K1 und C7 .....	80
4.4.1	Interaktionspartner von K1 und C7 im Hefe-2-Hybrid-System.....	81
4.4.2	Generierung und Charakterisierung von MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5	82
4.4.3	Co-Immunpräzipitierung von K1 und C7 mit den möglichen Interaktionspartnern .....	92
4.4.4	Identifizierung der Interaktionspartner von K1 und C7 mittels Massenspektrometrie .....	96
4.5	Untersuchungen zur möglichen Wiederherstellung der Replikation von MVA in humanen und murinen Zellen durch K1L und F11L.....	102
4.5.1	Generierung und Charakterisierung von MVA-F11L und MVA-F11L-K1L	103
4.5.2	Das inserierte F11L-Gen ist funktional.....	106
4.5.3	Die F11L-Expression hat keinen Einfluss auf die <i>host-range</i> von MVA.....	109
4.5.4	Die F11L-Expression hat keinen Einfluss auf die Virionenmorphogenese von MVA	111
5	Diskussion .....	113

---

5.1	Die K1- und C7-Proteine ermöglichen die späte Genexpression von MVA in bestimmten Zellen .....	113
5.2	K1 und C7 inhibieren die PKR-induzierte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung.....	115
5.3	C7 reduziert die NF $\kappa$ B-Aktivierung durch die MVA-Infektion.....	118
5.4	Verifizierung der Hefe-2-Hybrid-Interaktionspartner von C7 und K1 .....	121
5.5	Eine massenspektrometrische Analyse identifiziert HNRPK als möglichen Interaktionspartner von C7-V5.....	124
5.6	Die Insertion von F11L und K1L in MVA stellt die Virus-induzierte Zellbewegung, jedoch nicht das virale Wachstum in Säugerzellen wieder her .....	125
5.7	Ausblick .....	127
6	Literaturangaben.....	130
7	Anhang.....	142
7.1	Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse.....	142
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	143
7.3	Abbildungsverzeichnis.....	145
7.4	Tabellenverzeichnis.....	147
8	Danksagung.....	148
9	Publikationen .....	149
10	Lebenslauf .....	151

# 1 Zusammenfassung

Orthopockenviren sind große DNA-Viren, die im Zytoplasma der Wirtszelle replizieren und für über 200 Proteine kodieren. Sie besitzen ein breites Wirtszellspektrum (*host-range*) und modulieren auf komplexe Art und Weise zelluläre Prozesse, um ihre Replikation zu gewährleisten. Zu diesem Genus der Familie der Pockenviren gehört auch das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA). MVA ist ein hoch attenuiertes, replikationsdefizientes Impfvirus, dem im Vergleich zu ursprünglichen Vacciniavirus-Stämmen viele virale Genfunktionen fehlen. Zu diesen verlorengegangenen Genen zählen so genannte *host-range*-Gene, die für das breite Wirtszellspektrum des Vacciniavirus (VACV) verantwortlich sind, deren molekulare Funktion aber größtenteils unbekannt ist. Diese Arbeit befasste sich zum einen mit der Untersuchung der Rolle der *host-range*-Gene K1L und C7L in der MVA-Infektion. Zum anderen sollte geprüft werden, ob der im MVA-Genom unvollständige Leserahmen F11L durch Wiederherstellung seiner Funktionalität den Wirtstropismus von MVA erweitern kann.

Das Fehlen von K1L und C7L in MVA ist mit dem Verlust der späten viralen Genexpression verbunden. Als mögliche Ursache hierfür wurde in dieser Arbeit die Phosphorylierung des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors  $2\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ) entdeckt, welche zum Abbruch der Proteinsynthese in der infizierten Zelle führt. Unter den möglichen Kinasen wurde die Proteinkinase R (PKR) als das verantwortliche Schlüsselenzym identifiziert und somit gezeigt, dass das K1- und C7-Protein den anti-viralen PKR-eIF2 $\alpha$ -Signalweg inhibieren. Es stellte sich heraus, dass die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung alleine jedoch nicht für das Fehlen der späten Genexpression verantwortlich ist. Neben dem inhibitorischen Einfluss auf den PKR-eIF2 $\alpha$ -Signalweg zeigte sich, dass C7 die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs reduziert, welcher für eine anti-virale Antwort der Wirtszelle wichtig ist. Ein weiterer Ansatz zur Aufklärung der K1- und C7-Funktion bestand darin, zelluläre Interaktionspartner zu identifizieren. Hierbei konnte das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (HNRPK) als möglicher Interaktionspartner von C7 entdeckt werden.

Neben den bisher bekannten *host-range*-Genen gibt es vermutlich weitere Gene, die den Wirtsbereich des VACV definieren. Das im MVA-Genom defekte F11L-Gen war ein guter Kandidat für eine solche Genfunktion, da es bei der Virionenmorphogenese, Virusausbreitung und der Migration VACV-infizierter Zellen eine Rolle zu spielen scheint. Deshalb wurde ein rekombinantes MVA mit vollständiger F11L-Gensequenz konstruiert und das Wirtszellspektrum dieses Virus untersucht. Die Reparatur des F11L-Gens ermöglichte MVA die Induktion von Zellbewegung nach Infektion, jedoch blieben seine unvollständige Morphogenese und eingeschränkte Vermehrungsfähigkeit in Säugetierzellen unbeeinflusst. F11L hat daher zumindest keine selbstständige Funktion als VACV *host-range*-Gen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind ein Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Virus-Wirts-Interaktionen des VACV sowie des eingeschränkten Wirtstropismus des Impfvirus MVA.

## 2 Einleitung

### 2.1 Vorwort

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse führten zu neuen Erkenntnissen über die intrazellulären Virus-Wirts-Interaktionen der Pockenviren. Kürzlich kam es zu einigen neuen Veröffentlichungen in diesem wissenschaftlichen Kontext, was die hier gezeigten Daten mit einschließt (Backes *et al.*, 2010; Zwilling *et al.*, 2010). Aus diesem Grund wird in der folgenden Einleitung das Wissen zu Beginn der Doktorarbeit wiedergegeben. Die gewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit werden in der Diskussion mit dem zwischenzeitlich hinzu gekommenen Wissen diskutiert.

### 2.2 Pockenviren – Krankheitserreger und Impfstoff

Die Familie der *Poxviridae* umfasst viele Viren, die meist ein breit gefächertes Wirtsspektrum aufweisen. Zu den Wirten der unterschiedlichen Viren zählen nicht nur Säugetiere, sondern auch Vögel und Insekten. Der Genus *Orthopoxviridae*, zu welchem auch das humanpathogene Variolavirus zählt, beinhaltet auch das Vacciniavirus, mit welchem in dieser Dissertation gearbeitet wurde.

Die Pockenerkrankung des Menschen, welche durch das Variolavirus hervorgerufen wird, gehörte zu den schlimmsten Seuchen in der Geschichte der Menschheit. Erste Erwähnungen finden sich schon zur Zeit des antiken China vor über 3.000 Jahren. Im Jahre 1796 begründete der englische Landarzt Edward Jenner die Impfung gegen die Pocken, indem er das Material getrockneter Pockenpusteln von Kühen nutzte, um einen Probanden damit zu infizieren. Gegen eine darauffolgende Infektion mit Variolavirus war die Person immun. Das davon abgeleitete Virus wurde aus diesem Grund Vacciniavirus (lateinisch: *vacca*, die Kuh) benannt und der Begriff Vakzinierung als Synonym für Impfung gebraucht (Jenner, 1796).

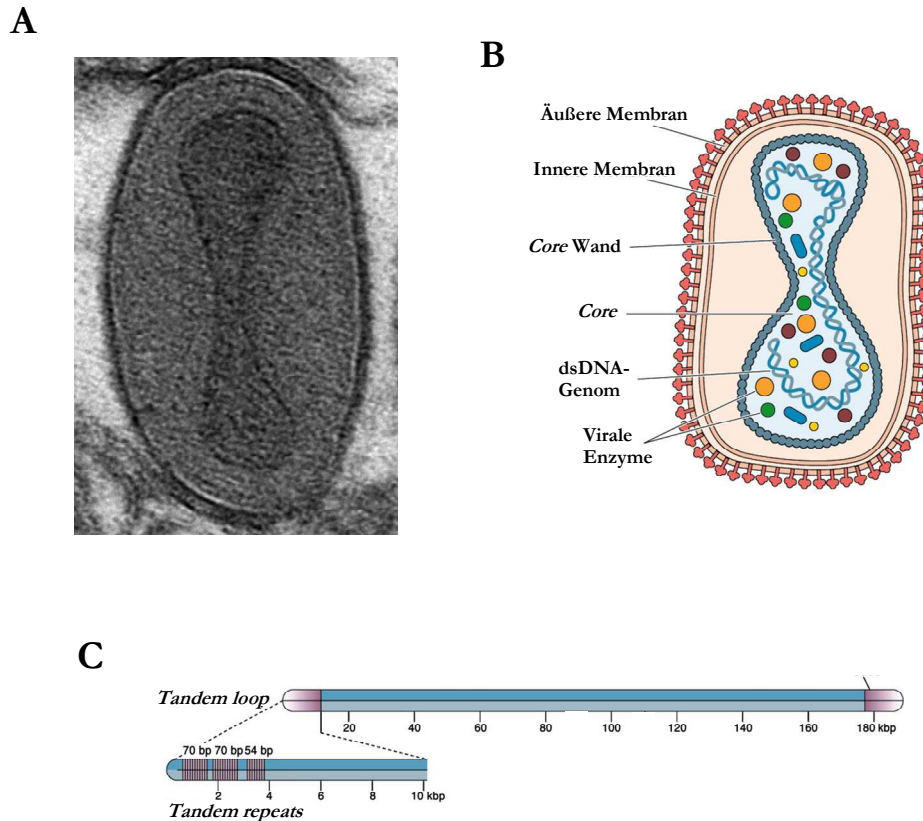
Die Weltgesundheitsorganisation (engl.: *world health organisation*, WHO) startete 1958 eine weltweite Impfkampagne zur Ausrottung der Pockenerkrankung, wobei verschiedene Vacciniavirus-Stämme als Lebendimpfstoffe eingesetzt wurden. Bereits 1980 erklärte die WHO die Welt von dieser Erkrankung befreit (Fenner, 1982).

Das Interesse an Vacciniavirus wurde jedoch mit der Weiterentwicklung des molekularbiologischen Methodenspektrums neu entfacht, insbesondere durch die Technik, rekombinante Vacciniaviren zu generieren. Ein wesentliches Interesse besteht in der Entwicklung von sicheren Impfstoffen, von Vektor-Impfstoffen und onkolytischen Viren. Weiterhin bleibt, verstärkt durch die Terroranschläge des 11.09.2001 auf das *world trade center*, die Befürchtung, dass einstige Laborstämme von Variolavirus, die offiziell nur noch in Beständen des *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, USA) und dem *State Research Center of Virology and Biotechnology* (VECTOR, Russland) existieren, oder manipulierte Orthopockenviren, als Biowaffe genutzt werden könnten. Hierdurch besteht weiterhin die Notwendigkeit zur Erforschung der Pathogenese von Pockenviren als auch die Entwicklung von sicheren und effizienten Pockenimpfstoffen (Breman *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Aufbau und Nomenklatur der Pockenviruspartikel

Pockenviren gehören zu den am komplexesten aufgebauten Viren. Die Virionen haben eine durchschnittliche Größe von 300x200x100 nm. Es existieren vier reife Virionenformen, die sich anhand der Anzahl der sie umhüllenden Membranen, der Membran-Proteinkomposition und der Lokalisierung in- oder außerhalb der Wirtszelle unterscheiden. Das intrazelluläre reife Virion (engl.: *intracellular mature virion*, IMV) hat eine Membranschicht (siehe Abb. 2.1 A), das intrazelluläre behüllte Virion (engl.: *intracellular enveloped virion*, IEV) ist von drei Membranen umgeben und das extrazelluläre behüllte Virion (engl.: *extracellular enveloped virion*, EEV) sowie das Zell-assoziierte extrazelluläre Virion (engl.: *cell-associated enveloped virion*, CEV) haben zwei Membranschichten. Letztere Partikelform unterscheidet sich vom EEV nur durch eine temporäre Assoziation mit der zellulären Plasmamembran (Smith *et al.*, 2002). Die innerhalb der Partikel verpackten Proteine und das virale Genom sind bei allen Virionenformen gleich und in Abb. 2.1 B schematisch dargestellt. Innerhalb der ein bis drei umhüllenden Membranen befindet sich die *core*-Struktur, welche das doppelsträngige DNA (dsDNA)-Genom sowie einige Proteine beherbergt. Das dsDNA-Genom ist linear aufgebaut, wobei beide Stränge an ihren Enden kovalent verknüpft sind, und hat eine Größe von ca. 200 Kilobasenpaaren (Kbp), die für ca. 200 Gene kodieren. Grundsätzlich ist der mittlere Teil des Genoms konserviert. Dagegen sind die beiden Enden des Genoms variabler, wobei dies vermutlich auf die terminalen *tandem repeats* zurückzuführen ist (siehe Abb. 2.1 C). Diese Sequenzwiederholungen werden wahrscheinlich bei der DNA-Replikation benötigt, um die

als Intermediat entstehenden Konkatomere in einzelne Genome aufzulösen (DeLange and McFadden, 1987). In diesen relativ variablen Bereichen des Genoms sind vermehrt Gene lokalisiert, die eine Funktion bei Virus-Wirts-Interaktionen haben.



**Abb. 2.1 Aufbau der Pockenviren.** **A.** Elektronenmikroskopische Aufnahme eines *intracellular mature virion* (IMV). Die einzelne Membranschicht sowie das elektronendichte, doppelkegelförmige *core* sind gut zu erkennen. Länge: 200 nm. **B.** Schematische Darstellung des Aufbaues eines *extracellular enveloped virion* (EEV). **C.** Schematische Darstellung des linearen dsDNA-Genoms. An den Enden befinden sich Sequenzwiederholungen (*tandem repeats*). A: Im Rahmen dieser Arbeit gemachte Aufnahme. B und C: Harrison *et al.*, 2004.

Die Bezeichnung der offenen Leserahmen (engl.: *open reading frames*, ORF) richtet sich nach der Größe des Fragments eines *Hind* III-Restriktionsverdaus des Genoms. Die hierbei entstehenden DNA-Fragmente werden der Größe nach alphabetisch benannt (Fragment A bis P bei VACV) und die ORFs werden mit Ausnahme des C-Fragmentes von links nach rechts durchnummeriert und zusätzlich mit „R“ oder „L“ für die Leserichtung „rechts“ oder „links“ markiert. Bei der Protein-Bezeichnung wird die Genorientierung weggelassen (Moss, 2007).



## 2.2.2 Replikationszyklus der Pockenviren

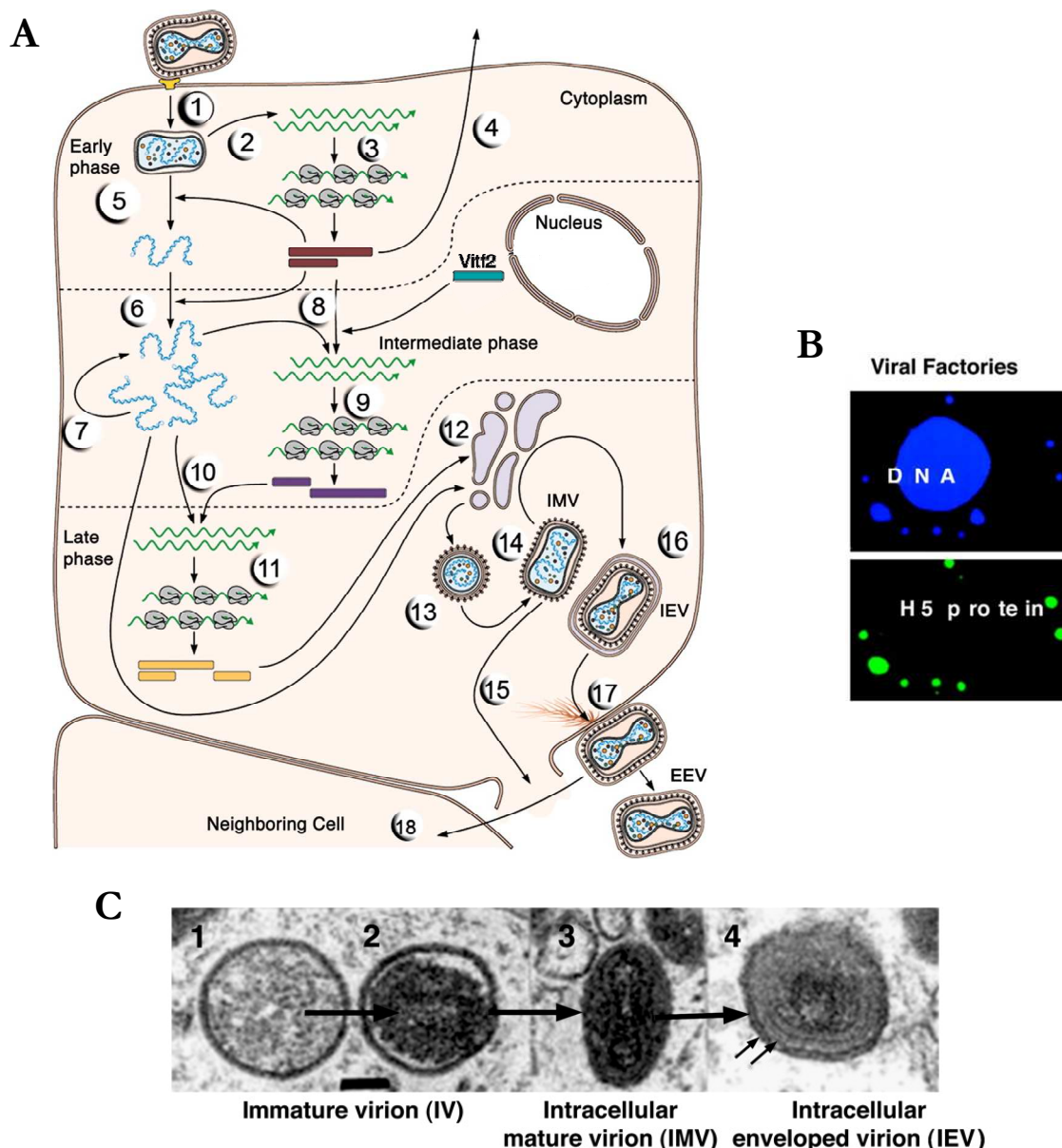
Der Replikationszyklus der Pockenviren findet trotz ihres DNA-Genoms im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Dies wird dadurch ermöglicht, dass Pockenviren relativ unabhängig von Wirtsfaktoren sind, was sich beispielsweise darin widerspiegelt, dass sie für eine eigene RNA- und DNA-Polymerase kodieren. Im Folgenden wird der Lebenszyklus dargestellt, wobei sich die Nummerierungen im Text auf die Stadien des Replikationszyklus in Abb. 2.2 A beziehen.

Der Replikationszyklus beginnt mit der Adhäsion des Viruspartikels (EEV oder IMV) an die Wirtszelle (1). Dieser Vorgang ist noch unzureichend verstanden, was nicht zuletzt durch die unterschiedlichen Virionenformen bedingt ist. Fest steht, dass es keinen spezifischen zellulären Rezeptor zu geben scheint, an welchen die Virionen binden, was das breite Spektrum der unterschiedlichen Zelltypen erklärt, welche durch Pockenviruspartikel infiziert werden können (Moss, 2006). Es gibt Berichte, dass Hüllproteine in der IMV-Membran an Glycosaminoglycane binden. So wurde eine Interaktion von D8, einem der Virionenmembranproteine, mit Chondroitinsulfat (Hsiao *et al.*, 1998) sowie von A27 und H3 mit Heparansulfat beobachtet, jedoch sind diese Interaktionen nicht essentiell für die Adhäsion der Virionen (Hsiao *et al.*, 1999; Lin *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 1998).

Die Penetration scheint durch den sogenannten *entry-fusion* Komplex (Senkevich *et al.*, 2005) stattzufinden, einen Multiproteinkomplex, der aus neun viralen Proteinen besteht (A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5, L5 und O3 (Senkevich *et al.*, 2004; Izmailyan *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2006; Senkevich and Moss, 2005; Senkevich *et al.*, 2005; Townsley *et al.*, 2005; Satheshkumar *et al.*, 2009)) und zusätzlich den nicht zu diesem Komplex gehörenden Proteinen F9, L1, I2, A17 und A27 (Brown *et al.*, 2006; Bisht *et al.*, 2008; Nichols *et al.*, 2008; Kochan *et al.*, 2008). Weitere Untersuchungen berichten von Makropinozytose als Aufnahme-Mechanismus der Virionen in die Wirtszelle (Mercer and Helenius, 2008).

Nach dem Eintritt kommt es zur Freisetzung der *core*-Struktur in das Zytoplasma der Zelle. Bereits innerhalb des *cores* startet die kaskadenartige Genexpression der Pockenviren mit der Transkription der Klasse der frühen Gene (2), deren mRNAs von den zellulären Ribosomen translatiert werden (3). Zu den frühen Genprodukten gehören unter anderem immunmodulatorische Faktoren, die z.T. sekretiert werden, wie beispielsweise der virale Interleukin-1 $\beta$ -Rezeptor (Staib *et al.*, 2005). Des weiteren Faktoren, welche die *core*-Struktur auflösen (engl.: *uncoating*; 5), Enzyme für die DNA-Replikation des viralen Genoms sowie Transkriptionsfaktoren für die intermediären Gene (6 und 7) (Moss, 2007; Broyles, 2003). Erst nach der DNA-Replikation findet die Expression der Klasse der intermediären Gene

statt, wobei frühe Genprodukte sowie der zelluläre Faktor Vacciniavirus intermediärer Transkriptionsfaktor-2 (engl.: *vaccinia virus intermediate transcription factor-2*, VITF-2) als intermediäre Transkriptionsfaktoren fungieren (Rosales *et al.*, 1994). VITF-2 wurde als das zelluläre Protein G3BP-1 und p137 identifiziert, welche ein Heterodimer bilden und zu den *viral factories* transloziert werden (8; Katsafanas and Moss, 2004; Katsafanas and Moss, 2007).



**Abb. 2.2 Pockenviraler Replikationszyklus.** **A.** Schematische Darstellung des Replikationszyklus. Erläuterungen siehe Text. **B.** Fluoreszenzaufnahme der *viral factories*, sichtbar durch DNA-Anfärbung mit Hoechst (blau) und über Antikörper das virale, späte Protein H5, welches co-lokalisiert. **C.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Virionen in unterschiedlichen Stadien der Morphogenese. Nr. 1 und 2 zeigen *immature virions* (IV), Nr.3 ein *intracellular mature virion* (IMV) und Nr.4 ein *intracellular enveloped virion* (IEV). Genauere Erklärungen sind dem Text zu entnehmen. Abbildungen verändert nach Harrison *et al.*, 2004.

Die intermediären mRNAs (9) kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche für die späte Genexpression benötigt werden (10). Späte Genprodukte stellen hauptsächlich Strukturproteine für den Zusammenbau der neuen Virionen dar. Einige späte Proteine werden sofort nach der Penetration der Zelle beispielsweise als frühe Transkriptionsfaktoren benötigt und daher in neu gebildete Virionen verpackt. Nach der Translation der späten mRNAs (11) beginnt der Zusammenbau der neuen Virionen in den *viral factories* (12). Abb. 2.2 B zeigt die *viral factories* als DNA-Ansammlungen abseits des Zellkerns, welche mit dem viralen späten H5-Protein co-lokalisieren.

Die Virionenmorphogenese beginnt mit der Entstehung von sichelförmigen Membranstrukturen (engl.: *creasents*), wobei die Herkunft der hierfür genutzten Membranen noch kontrovers diskutiert wird (Dales and Mosbach, 1968; Sodeik and Krijnse-Locker, 2002; Husain and Moss, 2003). Zunächst bilden sich unreife Virionen (engl.: *immature virions*; IV (13), Abb. 2.2 C, Nr.1), welche sich über einige Zwischenstadien (siehe Abb. 2.2 C, Nr.2) zu den ersten infektiösen Virionen, den IMV, entwickeln (14; Siehe auch Abb. 2.2 C, Nr.3 und Abb. 2.1 A). Diese Virionenform stellt den größten Prozentsatz der Virionen dar und wird erst spät nach der Infektion durch Zell-Lyse freigesetzt (15) (Meiser *et al.*, 2003). Ein Teil der IMV wird über das Mikrotubuli-Zytoskelett zum Trans-Golgi-Netzwerk transportiert. Von diesem Kompartiment oder alternativ von den frühen Endosomen erwerben die Partikel eine Doppelmembran, und werden von da an als IEV bezeichnet (16; siehe auch Abb. 2.2 C, Nr.4; Sanderson *et al.*, 2000).

Die IEVs werden weiter zur Plasmamembran transportiert und fusionieren mit dieser, wobei eine der viralen Membranen verloren geht. Die nun als CEV bezeichneten Virionen (17) können zum einen von der Zellmembran dissoziieren, wonach sie EEV genannt werden. Zum anderen können sie eine Aktinpolymerisation innerhalb der Zelle auslösen, sodass eine Ausstülpung (engl.: *actintail*, Aktinschwanz) entsteht, welche die CEV zu benachbarten Zellen transportiert, die dann infiziert werden können (18; Smith *et al.*, 2002; Smith and Law, 2004).

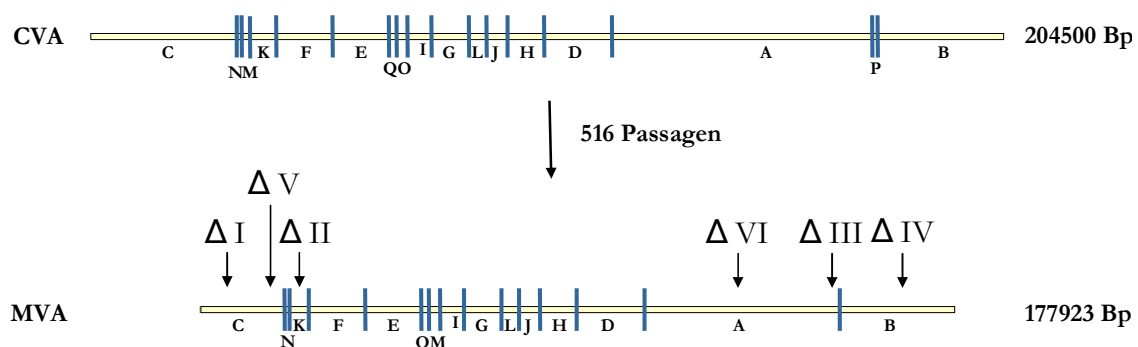
### **2.3 Das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA)**

Das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) ist ein hoch attenuierter VACV-Stamm. Da in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit MVA gearbeitet wurde, wird dieses Virus im Folgenden mit besonderem Fokus dargestellt.

### 2.3.1 Entstehung und Charakteristika von MVA

MVA stammt von dem VACV-Stamm Chorioallantois Vacciniavirus Ankara (CVA) ab, welcher in der Türkei als Impfstamm gegen die Pockenerkrankung eingesetzt wurde. Die Impfung mit Vacciniaviren im Allgemeinen war mit teils schweren Nebenwirkungen verbunden, die in seltenen Fällen sogar zum Tod führen konnten. Aus diesem Grund gab es verschiedene Bemühungen, Vacciniaviren zu attenuieren und dadurch sicherer zu machen (Fenner *et al.*, 1988). Dies wurde mit CVA versucht, indem das Virus fortlaufend in primären Hühnerembryofibroblasten (engl.: *chicken embryo fibroblasts*, CEF) passagiert wurde. Nach 371 Passagen wies das Virus eine verringerte Virulenz auf (Mayr *et al.*, 1975). Ab der 516-ten Passage wurde das Virus zur Unterscheidung von seinem Vorläufer in MVA umbenannt. Noch vor der Einstellung der Pockenimpfungen in Deutschland im Jahre 1980 wurden über 120.000 Menschen mit MVA geimpft. Dabei zeigte sich, dass das attenuierte MVA keine der Impfkomplicationen hervorrief, die bei dem Vorläufer aufgetreten waren (Mahnel and Mayr, 1994; Stickl, 1974).

Eine Kartierung und spätere Sequenzierung des MVA-Genoms ergab, dass während der Attenuierung sechs größere Deletionen entstanden sind, die jeweils mehrere Gene umfassen. Darüber hinaus kam es zu vielen kleineren Deletionen und Mutationen (Meyer *et al.*, 1991; Antoine *et al.*, 1998; Meisinger-Henschel *et al.*, 2007).



**Abb. 2.3 Entstehung von MVA.** MVA entstand durch fortlaufende Passagierung (516-mal) von CVA in CEF. Während dessen entstanden sechs große Deletionen (I-VI). Die Genomgröße reduzierte sich von ca. 204500 Bp auf 177923 Bp. Dies entspricht einem Verlust von 13% der genetischen Information. (Antoine *et al.*, 1998; Meisinger-Henschel *et al.*, 2007).

Wie in Abb. 2.3 zu sehen ist, sind die sechs großen Deletionen auf der linken und rechten Seite des Genoms aufgetreten. Dort sind, wie in Abs. 2.2.1 bereits erwähnt, viele Virulenz- und sogenannte *host-range*-Gene lokalisiert, die für die Virus-Wirts-Interaktion wichtig sind. Vermutlich kam es durch den Verlust dieser Gene zu dem stark attenuierten Phänotyp von MVA sowie zu dessen *in vitro* deutlich eingeschränkten Wirtstropismus. Neben CEF sind

Baby-Hamsternierenzellen (BHK-21), Rattendarmepithelzellen (IEC-6) und eine Nilflughund-Zelllinie die einzig bekannten Zellen, die das Wachstum von MVA zulassen und somit permissiv für MVA sind (Drexler *et al.*, 1998; Okeke *et al.*, 2006; Jordan *et al.*, 2009). In den meisten anderen untersuchten Zellen ist der Replikationszyklus von MVA während der Virionenmorphogenese unterbrochen, so dass unreife Virionen (engl.: *immature virion*, IV) akkumulieren (siehe Abb. 2.2 C, Nr.1), die sich nicht zu IMV weiterentwickeln (Sutter and Moss, 1992; Gallego-Gomez *et al.*, 2003). Welches oder welche der verlorengegangenen Gene für diesen äußerst eingeschränkten Wirtstropismus verantwortlich sind, ist immer noch unbekannt. Trotz des engen Wirtstropismus ist MVA in der Lage, die Gene aller Klassen zu exprimieren. Dies schließt inserierte Gene mit ein, was für die Nutzung von MVA als (Vektor-)Impfstoff relevant ist (Sutter and Moss, 1992). Verschiedene MVA-Vektorimpfstoffe durchlaufen bereits klinische Studien als Impfstoff gegen Krebs oder Infektionskrankheiten, wie z.B. HIV (Sutter and Staib, 2003; Drexler *et al.*, 2004).

## 2.4 VACV *host-range*-Gene

Der Wirtstropismus von VACV hängt nicht, wie bei den meisten anderen Viren, von dem Vorhandensein eines bestimmten Oberflächenrezeptors auf der Wirtszelle ab, sondern von der Modulation anti-viraler zellulärer Signaltransduktionswege. Die Bedingung für eine produktive VACV-Infektion ist, dass die nötigen viralen Faktoren vorhanden sind, um diese Signalwege zu inhibieren. Die für diese Faktoren kodierenden Gene werden als *host-range*-Gene bezeichnet, da sie den Wirtstropismus auf bestimmte Zellen erweitern (Werden *et al.*, 2008; McFadden, 2005). Ihre Funktion ist jedoch größtenteils unbekannt. In Tabelle 2.1 sind die bekannten VACV *host-range*-Gene aufgelistet. In Bezug auf das MVA-Genom sind die Gene C7L, K3L und E3L vorhanden, wohingegen K1L und C12L fragmentiert bzw. deletiert sind (Meisinger-Henschel *et al.*, 2007; Antoine *et al.*, 1998). Das Gen C9L (auch als *compox virus* 77 KDa; CP77 bekannt) ist in allen bekannten Vacciniaviren mutiert und nur in anderen Vertretern der Orthopockenviren wie z.B. den Kuhpockenviren (engl.: *compox virus*) intakt.

Die *host-range*-Restriktion von MVA, bei welchem das K1L-Gen inaktiv und das C12L-Gen deletiert ist (Altenburger *et al.*, 1989; Antoine *et al.*, 1998), kann mit dem Fehlen dieser beiden *host-range*-Gene nicht erklärt werden (Wyatt *et al.*, 1998).

Tabelle 2.1: Übersicht der bekannten VACV *host-range*-Gene

<i>Host-range</i> -Gen	Erweiterung des Wirtstropismus
K1L	RK-13-Zellen
C7L	Hamster Dede-Zellen
C12L/SPI-1	A549-Zellen
K3L	BHK-21-Zellen
E3L	HeLa-Zellen, CEF
C9L <sup>1</sup>	CHO-Zellen

<sup>1</sup>In allen bekannten VACV-Genomen mutiert und nicht funktional. Entspricht dem Kuhpocken-Gen CP77. Grün markierte Gene sind im MVA-Genom funktional erhalten. Tabelle verändert nach McFadden, 2005.

Ein rekombinantes MVA mit funktionalem K1L-Gen hat zwar einen erweiterten Tropismus auf RK-13-Zellen, jedoch nicht auf humane Zellen (Sutter *et al.*, 1994). Auch die Integration des C12L-Gens in das MVA-Genom erweitert den Tropismus nur auf humane A549-Zellen (Wyatt *et al.*, 1998). Das bedeutet, dass es weitere unbekannte *host-range*-Gene geben muss, die im MVA-Genom verloren gegangen sind. Am besten untersucht ist die Funktion von E3L und K3L, die zunächst im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

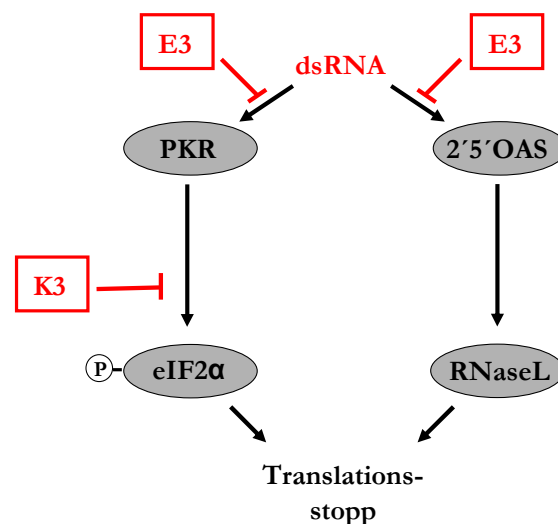
#### 2.4.1 Die Funktion der *host-range*-Gene E3L und K3L

Das E3L-Gen ist u.a. wichtig für das Wachstum von VACV in HeLa-Zellen, während in BHK-21-Zellen das K3L-Gen entscheidend ist (Beattie *et al.*, 1996; Langland and Jacobs, 2002). Darüber hinaus zeigte sich, dass eine MVA E3L-Deletionsmutante (MVA $\Delta$ E3L) nicht mehr in CEF repliziert (Hornemann *et al.*, 2003).

Das E3-Protein besteht aus einer C-terminalen dsRNA-Bindedomäne und einer N-terminalen Z-DNA-Bindedomäne (Chang and Jacobs, 1993b; Herbert *et al.*, 1997). Bedingt durch komplementäre Sequenz-Bereiche der intermediären Transkripte von VACV entsteht dsRNA im Zytoplasma der Wirtszelle, welche von der zellulären Proteinkinase R (PKR) oder der 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (2'-5'-OAS) erkannt wird (siehe Abb. 2.4; Boone *et al.*, 1979; Ludwig *et al.*, 2006). Die hierdurch aktivierte PKR phosphoryliert den Translationsinitiations-Faktor 2 $\alpha$  (engl.: *eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* , eIF2 $\alpha$ ), wodurch die Translation von sowohl zellulären als auch viralen mRNA angehalten wird und es in der Folge zur Unterbrechung des viralen Replikationszykluses kommt (de Haro *et al.*, 1996; Ludwig *et al.*, 2006). Auch die Aktivierung der 2'-5'-OAS blockiert die virale Replikation, indem 2'-5'-verbundene Oligoadenylate synthetisiert werden, die wiederum

zur Aktivierung der Endoribonuklease RNaseL führen. Diese Endonuklease zerschneidet zelluläre und virale RNA, wodurch es ebenfalls zu einem Translationsstopp kommt (siehe Abb. 2.4) (Diaz-Guerra *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1988). Über die dsRNA-Bindedomäne lagert sich das E3-Protein an diese dsRNA-Spezies an und verhindert dadurch, dass die PKR oder die 2'-5'-OAS aktiviert werden (siehe Abb. 2.4; Chang and Jacobs, 1993a; Chang *et al.*, 1992; Rivas *et al.*, 1998). Die Funktion der Z-DNA-Bindedomäne von E3 ist weniger gut verstanden, trägt jedoch wesentlich zur Virulenz von VACV *in vivo* bei (Brandt and Jacobs, 2001).

Das K3-Protein weist eine Homologie zum N-Terminus von eIF2 $\alpha$  auf (beattie *et al.*, 1991). Indem es für die aktivierte PKR als Pseudosubstrat fungiert, vermindert es die Phosphorylierung des eigentlichen Substrats eIF2 $\alpha$ . Auf diese Weise trägt auch K3 dazu bei den Translationsstopp zu verhindern (Carroll *et al.*, 1993).



**Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Einflusses von E3 und K3 auf den anti-viralen PKR-eIF2 $\alpha$ - und den 2'-5'-OAS-RNaseL-Signalweg.** Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Rot gekennzeichnet: virale Herkunft.

Wie bereits erwähnt, ist VACV auf das E3- bzw. K3-Protein angewiesen, um in HeLa- bzw. BHK-21-Zellen replizieren zu können. Dieser Unterschied lässt sich einerseits durch eine unterschiedliche Ausstattung der Zelle mit funktionaler PKR bzw. 2'-5'-OAS erklären. Andererseits trägt auch dazu bei, dass in BHK-21-Zellen während der viralen Transkription mehr dsRNA gebildet wird als in HeLa-Zellen. Dadurch reicht die Menge an E3-Protein in diesem Fall nicht aus, um die dsRNA zu maskieren, wodurch es zur Aktivierung der PKR kommt. Hier wird K3 benötigt, um diese aktivierte PKR zu inhibieren. Zudem wird die 2'-5'-OAS in BHK-21-Zellen nicht exprimiert, sodass alleine der PKR-Signalweg ausschlaggebend ist. Somit ist für das Wachstum in diesen Zellen K3

wichtig. In HeLa-Zellen hingegen wird in Relation weniger dsRNA gebildet, wodurch die Menge an E3-Protein ausreicht, um diese zu sequestrieren. Weiterhin wird die 2'-5'-OAS exprimiert, wodurch in diesen Zellen E3 zwingend erforderlich ist und K3 alleine den Translationsstopp und die damit verbundene Blockade des viralen Replikationszykluses, nicht verhindern kann (Langland and Jacobs, 2002).

#### **2.4.2 Die Funktion der *host-range*-Gene K1L und C7L**

Die Wirkungsweise von K1 und C7 ist weniger gut verstanden. Die *host-range*-Funktion des K1L-Gens wurde bei der Untersuchung einer VACV-Deletionsmutante, welcher 18 KBp der linken Seite des Genoms fehlen, entdeckt (Drillien *et al.*, 1981). Diese Mutante war in humanen Zellen nicht mehr replikationsfähig und durch Marker-Transfer-Studien konnte dieser Defekt auf das Fehlen des K1L-Gens zurückgeführt werden (Gillard *et al.*, 1985; Gillard *et al.*, 1986). Zusätzlich wurde beobachtet, dass neben K1L auch C7L, welches dieser VACV-Deletionsmutante ebenfalls fehlt, das Wachstum in humanen Zellen ermöglichen konnte. Im Unterschied zu K1L jedoch konnte C7L die Replikation in der Kaninchennierenzelllinie RK-13 nicht wiederherstellen (Perkus *et al.*, 1990). Somit haben K1 und C7 sowohl überlappende als auch unterschiedliche Funktionen. Die Ursache für die unterschiedliche Funktionalität in verschiedenen Zelllinien ist jedoch nicht geklärt. Weiterhin wurde entdeckt, dass zusätzlich das Kuhpockengenen CP77 das Fehlen von K1L und C7L komplementieren kann und darüber hinaus VACV auch zum Wachstum in Hamster CHO-Zellen befähigt (Perkus *et al.*, 1990; Spehner *et al.*, 1988). Genauere Untersuchungen des durch das Fehlen von C7L, K1L oder CP77 verursachten Replikationsdefekts ergaben, dass in allen Fällen der virale Lebenszyklus während der intermediären Genexpression unterbrochen ist (Drillien *et al.*, 1981; Ramsey-Ewing and Moss, 1995).

Auch auf der Ebene der Aminosäuresequenz bestehen zwischen dem K1- und CP77-Protein gewisse Gemeinsamkeiten. Das K1-Protein enthält sieben Ankyrin-*Repeats*, CP77 neun Ankyrin-*Repeats* und zusätzlich eine F-Box-Domäne (Li *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2009). Ankyrin-*Repeats* sind Sequenzmotive, die Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen (Sedgwick and Smerdon, 1999). In diesem Zusammenhang wurde für VACV-Proteine, die neben den Ankyrin-*Repeats* eine F-Box-Domäne haben, gezeigt, dass sie als E3-Ligase bei der Ubiquitinylierung von Proteinen wirken können und somit bei deren proteasomalen Degradierung eine Rolle spielen (Zhang *et al.*, 2009). Jedoch stellte sich im Fall von CP77



heraus, dass diese Funktion für die Erweiterung der *host-range* keine Rolle spielt (Chang *et al.*, 2009). Erstaunlicherweise kodiert die Sequenz von C7L für keine bekannte Domäne und weist trotz gleicher Funktion keine Homologien zu K1L oder CP77 auf.

Als zellulärer Interaktionspartner von K1 konnte bisher nur *ArfGAP with coiled-coil, ankyrin repeat and PH domains 2* (ACAP2) ausfindig gemacht werden (Bradley and Terajima, 2005). ACAP2 ist ein G-Protein, das *ADP-ribosylation factor 6* (Arf6) reguliert, welches das Aktinzytoskelett moduliert (Bradley and Terajima, 2005; Donaldson, 2003). Durch gezielte Mutation bestimmter Ankyrin-Repeats in K1 konnte bereits nachgewiesen werden, dass dies die Interaktion mit ACAP2 verhindert, der *host-range*-Effekt von K1 jedoch in keiner Weise beeinträchtigt wurde (Meng and Xiang, 2006). Dies bedeutet, dass diese Interaktion also nicht für die Replikation von VACV in humanen Zellen wichtig zu sein scheint.

Für das K1-Protein konnte weiterhin beobachtet werden, dass es die Aktivierung des *nuclear factor kappa B* (NFκB)-Signalwegs inhibiert (Shisler and Jin, 2004). Durch die MVA-Infektion kommt es zur Aktivierung der IκB-Kinase (IKK), welche den Inhibitor von κBα (IκBα) phosphoryliert (Abb. 2.5; Oie and Pickup, 2001). Hierdurch wird IκBα polyubiquitinyliert und dadurch für den Abbau durch das 26S-Proteasom markiert. Das Kernlokalisierungssignal von NFκB wird hierdurch exponiert, sodass das u.a. aus den Untereinheiten p65 und p50 bestehende NFκB in den Zellkern transloziert. Dort fungiert es als Transkriptionsfaktor für Gene, die wichtig sind zum Aufbau einer Immunantwort, wie beispielsweise proinflammatorische Zytokine (Hayden *et al.*, 2006).

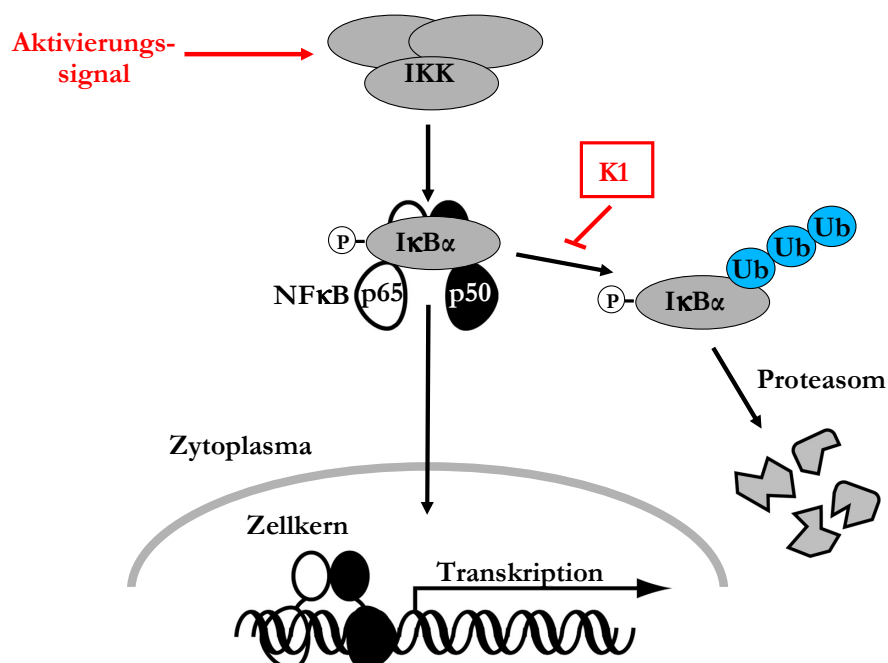


Abb. 2.5 Einfluss des K1-Proteins auf den NFκB-Signalweg. Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen. Rot gekennzeichnet: virale Herkunft.

Zwar konnte der genaue Wirkmechanismus von K1 noch nicht aufgeklärt werden. Es ist jedoch bekannt, dass es den I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau verhindert (Abb. 2.5; Shisler and Jin, 2004).

Über die Funktion von C7 ist weitaus weniger bekannt als im Fall von K1. Studien mit VACV NYVAC, einem attenuierten VACV Stamm, dem sowohl K1L als auch C7L fehlen zeigten, dass C7 eine Funktion als Apoptose-Inhibitor haben könnte (Najera *et al.*, 2006). Weiterhin zeigte sich bei der Untersuchung von VACV NYVAC und der oben beschriebenen VACV 18 KBp-Deletionsmutante, dass eIF2 $\alpha$  nach Infektion mit diesen Viren phosphoryliert wird und dass die Insertion von CP77 in die VACV 18 KBp-Deletionsmutante bzw. von C7L in VACV NYVAC diese Phosphorylierung verhindert (Hsiao *et al.*, 2004; Najera *et al.*, 2006). Obwohl somit einzelne Funktionen von K1L und C7L beschrieben sind, ist der Zusammenhang zur viralen Replikation und dem damit verbundenen Wirtstropismus weiterhin völlig unklar.

### 2.4.3 Das potentielle *host-range*-Gen F11L

Wyatt *et al.* konnten mit Marker-Transfer-Studien zeigen, dass ein oder zwei weitere, bisher unbekannte *host-range*-Gene auf der linken Seite des MVA-Genoms während der Attenuierung deletiert worden sein müssen (Wyatt *et al.*, 1998). Hinweise auf ein mögliches weiteres *host-range*-Gen ergaben sich, als Valderrama und Kollegen (Valderrama *et al.*, 2006) die Funktion des F11L-Gens anhand von VACV Western Reserve (WR) untersuchten. Sie konnten eine Interaktion zwischen dem F11-Protein und der zellulären GTPase *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) nachweisen, die zur Inhibition der Signalweiterleitung von RhoA führt. Weiterhin konnten sie diese Interaktion in Zusammenhang mit der von VACV-induzierten Zellmigration bringen. Ein durch *small interfering* RNA (siRNA) induzierter Verlust der Genexpression (*knock-down*) von F11L führte zu einem Defekt in der Virionenmorphogenese bei VACV WR-infizierten HeLa-Zellen, der durch eine Häufung von unreifen Partikeln gekennzeichnet war (Valderrama *et al.*, 2006). Dieser Defekt scheint vergleichbar mit der Blockade des MVA-Replikationszykluses in diesen Zellen zu sein, weil hierbei Akkumulationen von unreifen Virionen (engl.: *immature virions*, IV) beschrieben wurden, die sich nicht zu reifen Partikeln weiterentwickeln (Sutter and Moss, 1992). Da F11L in MVA nicht mehr funktional ist (Antoine *et al.*, 1998), könnte das Fehlen eine Ursache der Restriktion von MVA in humanen Zellen sein.

## 2.5 Zielsetzung der Dissertation

Pockenviren interagieren auf sehr komplexe Art und Weise mit ihren Wirtszellen. Der Eingriff der Viren in anti-virale Signalwege und deren Modulation ermöglicht es ihnen, in einer Vielzahl von Zellen und Gewebetypen produktiv zu replizieren. Dies erfordert eine große Anzahl an viralen Proteinen, die für die gezielte Interaktion mit bestimmten zellulären Proteinen und Molekülen wichtig sind. Bisher wurden einige solcher viraler Gene identifiziert und teilweise ihre Funktionsweise aufgeschlüsselt. Jedoch fehlen noch viele Bausteine, die den breiten Wirtsbereich von VACV erklären. Ebenso sind bisher auch immer noch nicht die eigentlichen Faktoren gefunden worden, die für die Restriktion von MVA verantwortlich sind.

Ein Ziel der vorliegenden Dissertation war es daher, mehr über die Funktion der *host-range*-Gene K1L und C7L zu erfahren, die mit der Wirtsinteraktion assoziiert ist. Hierzu wurden rekombinante MVA-Viren genutzt bzw. generiert, um den Einfluss von C7 und K1 auf entscheidende anti-virale Signalwege in unterschiedlichen Wirtszellen und ihre Rolle für die vollständige Replikation in diesen Zellen zu klären. Um weitere Hinweise über neue Funktionen innerhalb der Zelle identifizieren zu können, sollten gleichzeitig zelluläre Interaktionspartner von C7 und K1 identifiziert werden.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war es, das potentielle *host-range*-Gen F11L auf seine mögliche Rolle, den Wirtstropismus von MVA zu erweitern, zu untersuchen. Während des Attenuierungsprozesses von MVA sind eine Vielzahl viraler Gene, einschließlich des F11L-Gens, funktional verloren gegangen, welches zur Replikationsdefizienz von MVA in den meisten Zellen führte. Daher sollte analysiert werden, ob die Wiederherstellung der Funktionalität von F11L in MVA dessen Replikationsfähigkeit in humanen und anderen Zellen wiederherstellt. Weiterhin sollte dabei die Rolle des ebenfalls in MVA inaktiven K1L-Gens als möglicher additiver Faktor bestimmt werden.

Das Wissen um die Interaktionen und die Mechanismen der verschiedenen viralen Gene, welche zur Definition des Wirtsbereichs von VACV bzw. bei ihrem Fehlen zur Restriktion des viralen Replikationszyklus bei MVA führen, ist von besonderem Interesse für die Verbesserung von VACV-Impfstoffen bzw. die Optimierung von MVA als Vektor-Impfstoff.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3.1 Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller

2-Iodacetamid	Merck (Darmstadt)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Acetonitril	Sigma-Aldrich (Steinheim)
30% Acrylamid-Bisacrylamid-Mix	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Agarose (Universal-Agarose)	Peqlab (Erlangen)
Agarose (low melting point)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biolyte 3-10	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bromchlorphenolblau	Merck (Darmstadt)
CDP-Star	Roche (Mannheim)
CHAPS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Cytosinarabinside (AraC)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
DL-Dithiothreitol (DDT)	Fluka (Neu-Ulm)
Dianisidine	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO) (Hybri-Max ®)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EDTA	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka (Neu-Ulm)
Formaldehyd (37 %)	Merck (Darmstadt)
Glutaraldehyd (25%)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycerin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Harnstoff	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	Merck (Darmstadt)

MG-132	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Fluka (Neu-Ulm)
Phalloidin-Rhodamin	Chemicon International (USA)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Thapsigargin	Merck (Darmstadt)
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Trichostatin A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim)
TNF $\alpha$ , rekombinant, human	Gibco BRL (Eggenstein)
TNF $\alpha$ , rekombinant, murin	Invitrogen (Karlsruhe)
Tween®20	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Xylencyanol	Merck (Darmstadt)

### 3.1.2 Gebrauchslösungen

Zum Herstellen der Lösungen wurde Reinstwasser benutzt, wenn nicht anders vermerkt.

**Tabelle 3.2 Gebrauchslösungen und deren Zusammensetzung**

Äquilibrierungspuffer für 2D-Gelelektrophorese	6M Urea
	0,375 M Tris-HCl pH 8,8
	2% SDS
	20% Glycerol
	bei 40°C Rühren
Anoden-Puffer 1	0,3M Tris
	10% Methanol
Anoden-Puffer 2	25mM Tris

	10% Methanol pH 10,4 einstellen
Blockierlösung für Immunfluoreszenzfärbungen	5% BSA in PBS
Blockierlösung für Immunfärbung bei Titrationen	3% FCS in PBS
DNA-Probenpuffer (5x)	5 ml Glycerin 4,5 ml H <sub>2</sub> O 500 µL TAE (20 x) 0,01 g Bromchlorphenolblau 0,01 g Xylencyanol
Dianisidine-Substratlösung	0,2 ml gesättigte Dianisidine- Lösung (in 100% Ethanol, steril filtriert) 10 ml PBS 10 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30%) (kurz vor Verwendung)
Fixier- und Permeabilisierungslösung für die Immunfärbung bei Titrationen	1:1 Methanol/Aceton (-20°C)
Fixierlösung für Fluoreszenzfärbung	4% Formaldehyd in PBS
IEF-Puffer	7M Harnstoff 2M Thioharnstoff 4% CHAPS 20mM Tris 65mM DTT 0,2% Biolyte 3-10 auf 5 ml auffüllen; 1ml Aliquots bei -80°C einfrieren

---

---

Kathoden-Puffer	25 mM Tris 40 mM $\epsilon$ -amino-n-Caprinsäure 10 % Methanol pH 9,4 einstellen
Permeabilisierungslösung für Fluoreszenzfärbung	0,1% Triton X-100 in PBS
Proteinase K	1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ in $\text{CaCl}_2$ (1,5 mM)
PBS	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 7 \text{H}_2\text{O}$ 2,4 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 800 ml $\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4 (bei 20°C) mit HCl einstellen; mit $\text{H}_2\text{O}$ auf 1 L auffüllen
SDS-PAGE-Ladungspuffer (5 x)	1,4 ml Tris-HCl, pH 7 (1 M) 3 ml Glycerin (100%) 2 ml SDS (20%) 1,6 ml $\beta$ -Mercaptoethanol (100%) 10 mg Bromphenolblau 2 ml $\text{H}_2\text{O}$
SDS-PAGE-Laufpuffer (10 x)	19,2 M Glycin 5 M Tris (pH 8,9) 10 % (w/v) SDS
SDS-Probenpuffer (1 x)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2 % (w/v) SDS 10 % Glycerin 3,2 % $\beta$ -Mercaptoethanol 0,01 % (w/v) Bromphenolblau

---

---

Sypro-Ruby-Fixierlösung	50 % Methanol 7 % Essigsäure
Sypro-Ruby-Waschlösung	10 % Methanol 7 % Essigsäure
TAE-Puffer (20 x)	0,32 M Tris 22,84 ml Essigsäure (100%) 40 ml EDTA (0,5 M, pH 8,0)
TEN-Puffer (10 x)	100 mM Tris, pH 7,5 10 mM EDTA 1 M NaCl
WB-Waschpuffer	0,05 % Tween®20 in PBS
Zellysepuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % Triton-X 100 pH 7,2 einstellen

---

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller**

---

6-, 12- und 24-Loch-Zellkulturplatten	Corning (Kaiserslautern)
3MM-Papier	Whatman (Maidstone, USA)
Kryoröhrchen	Nunc (Wiesbaden)
Deckgläser	Menzel GmbH (Braunschweig)
Einwegküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einwegpipetten „Cellstar“ (1 – 25 ml)	Greiner (Nürtingen)
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf (Hamburg)
Falcon-Röhrchen	BD Biosciences (Bedford, USA)

---



Glasgefäße	Schott (Mainz)
IPG-Streifen pH3-10NL	BioRad (München)
Latexhandschuhe	Braun (Melsungen)
Mikroliterpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Nitrilhandschuhe	Ansell (USA)
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel „ZOOM“	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen (Karlsruhe)
Objektträger	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Pipettierhilfen	Brand (Wertheim)
Pipettenspitzen	ART (USA)
	Eppendorf (Hamburg)
Proteinkonzentriersäulen 7ml/9K MWCO	Thermo Scientific (USA)
PVDF-Membran	BioRad (München)
Sterilfilter	Merck (Darmstadt)
Zellkulturflaschen	Nunc (Wiesbaden)
	Greiner (Nürtingen)
Zellkulturschalen	Techno Plastic Products AG (Tasadingen, Schweiz)
Zellschaber	Corning (Kaiserslautern)
Zentrifugiersäulen <i>Snap cap</i>	Thermo Scientific (USA)

### 3.1.4 Geräte und Apparaturen

Tabelle 3.4 Geräte und deren Hersteller

Gerät	Hersteller
Autoklav	CertoClav (Österreich)
Cryo-Einfrierkontainer	Nalgene (England)
Brutschränke BBD 6220	Heraeus Sorvall (Hanau)
Feinwaage XB 160M	Precisa (Schweiz)
Gelelektrophoreseapparaturen	Peqlab (Erlangen)
Horizontalschüttler	Biometra (Göttingen)
Infrarot-Detektiergerät Odyssey	Li-Cor Biosciences (Bad Homburg)
IEF-Zelle Protean	BioRad (München)

---

Kameras <i>Slow-scan</i> CCD	TRS (USA)
Kühl-/Gefrierschränke	Liebherr (Biberach) Bosch (Gerlingen)
Lichtmikroskope	Axoivert 40 CFL LSM 510 META Zeiss (Oberkochen) Zeiss (Oberkochen)
Mikrowelle 8020	Privileg (Fürth)
PCR-Apparatur TPersonal	Biometra (Göttingen)
Photometer Ultrospec 1100pro	Amersham (Freiburg)
Rühr-/Heizplatten RCT <i>basic</i>	IKA (Staufen)
SDS-Gelelektrophoreseapparaturen	BioRad (München) Invitrogen (Karlsruhe)
Spannungsgeräte <i>Standard Power Pack</i> P25	Biometra (Göttingen)
Sterilbänke SterilGARDIII <i>Advance</i> <sup>o</sup>	The Baker Company (USA)
Thermomixer <i>Thermomixer compact</i>	Eppendorf (Hamburg)
Transmissionselektronenmikroskop, Typ 902	Zeiss (Oberkochen)
Ultraschallanlage Sonopuls	Bandelin (Berlin)
UV-Detektionsanlage UV Systeme	Intas (Göttingen)
Vortexapparatur Vortex-Genie 2	Scientific Industries (USA)
Quarzglasküvetten Type 4000 8454	Hellma (Mühlheim)
Waagen	Ohaus (USA)
Wasserbäder	Memmert (Schwabach)
Zellzählgerät Z1 Coulter® <i>Particle Counter</i>	Beckman Coulter (USA)
Zentrifugen	Biofuge fresco Fresco 17 Minispin plus Multifuge 1 S-R Omnifuge 2.0 RS RZ50-Plus Heraeus Sorvall (Hanau) Heraeus Sorvall (Hanau) Eppendorf (Hamburg) Heraeus Sorvall (Hanau) Heraeus Sorvall (Hanau) Heraeus Sorvall (Hanau)

---

### 3.1.5 Zellkulturmedien und -reagenzien

Tabelle 3.5 Zellkulturmedien und –reagenzien und deren Hersteller

CMRL-1969 ( <i>Chemically Defined Basal Medium</i> )	Medienküche des Paul Ehrlich Institutes nach Healy <i>et al.</i> , 1971
DMEM ( <i>Dulbecco 's Modified Eagles Medium</i> )	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)
DMEM ohne Cystein und Methionin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
EMEM ( <i>Eagles Minimum Essential Medium</i> )	Biochrom AG (Berlin)
EMEM (2x)	Gibco BRL (Eggenstein)
FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> ) <i>Superior</i>	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)
L-Glutamin	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)
Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom AG (Berlin)
Penicillin-Streptomycin	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)
Puromycin	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)
Trypsin-EDTA	Cambrex, BioWhittaker (Belgien)

### 3.1.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 3.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Medium	Zusätze
CMRL-1969	15% FBS 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin 1,5% 1M Natriumbicarbonat
DMEM	10% FBS 1% L-Glutamin 1% Penicillin-Streptomycin
Einfriermedium	90% FBS 10% DMSO
EMEM	10% FBS

	1% L-Glutamin
	1% Penicillin-Streptomycin
	1% NEA
RPMI 1640	10% FBS
	1% L-Glutamin
	1% Penicillin-Streptomycin

Für Infektionen (siehe Abs. 3.2.6.1) wurde jeweils nur 2% FBS dem Medium zugesetzt.

### 3.1.7 Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3.7 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Medium	Bemerkungen
293T	DMEM	Humane embryonale Nierenzellen (ATCC CRL-11268)
CEF	EMEM	Hühnerembryofibroblasten (Primäre Zellen; Herstellung nach Mayr <i>et al.</i> , 1975)
BHK-21	RPMI	Baby-Hamsternierenfibroblasten (ATCC CCL-10)
BS-C-1	DMEM	Grüne Meerkatzennierenzellen (ATCC CCL-26)
HaCaT	RPMI	Human Keratinozyten (Boukamp <i>et al.</i> , 1988)
HeLa	RPMI	Humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (ATCC CCL-2)
Huh7	DMEM	Humane Hepatomzellen (ATCC CCL-185),
GCN2 <sup>-/-</sup> , PERK <sup>-/-</sup> und Wildtyp-MEF	DMEM mit 55 µM β- Mercapto- ethanol	Murine embryonale Fibroblasten. Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Silverman, Cleveland clinic, OH, USA. (Harding <i>et al.</i> , 2000a; Harding <i>et al.</i> , 2000b)
PKR <sup>-/-</sup> , PKR <sup>-/-</sup> RNaseL <sup>-/-</sup> und Wildtyp-MEF	RPMI	Murine embryonale Fibroblasten. Zur Verfügung gestellt von Dr. D. Ron, New York university, NY, USA. (Khabar <i>et al.</i> , 2000)
MRC-5	CMRL1969	Humane embryonale Lungenfibroblasten (ATCC CCL-171)

NIH-3T3	DMEM	Murine embryonale Fibroblasten (ATCC CRL-1658)
NIH-3T3-E3L	DMEM mit 2µg/ml Puromycin	Murine embryonale Fibroblasten (ATCC CRL-1658) die stabil das E3L-Gen exprimieren. Zur Verfügung gestellt von von Dr. M. Buth und Dr. W. Brune, Robert Koch Institut, Berlin. (Budt <i>et al.</i> , 2009)
RK-13	EMEM	Kaninchennierenzellen (ATCC CCL-37)

### 3.1.8 Kommerziell erhältliche Systeme, *Kits* und Standards

**Tabelle 3.8 Kommerziell erhältliche Systeme und deren Hersteller**

2D clean-up Kit	GE Healthcare (USA)
Amplify Fluorographic Reagent	GE Healthcare (USA)
Anti-HA Immunprecipitation Kit (Klon HA-7)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-V5 Agarose-Affinitätsmatrix (Klon V5-10)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bradfordreagenz „Protein Assay“	Bio-Rad (München)
Coulter® Isoton® II Diluent	Beckman Coulter (USA)
DNA-Leitermix	New England Biolabs (Frankfurt)
dNTP-Mix	Fermentas (St. Leon-Rot)
Einbettmedium für Immunfluoreszenz-Färbungen mit und ohne DAPI	Dianova (Hamburg)
EZ-Vision®, DNA-Farbstoff	Amresco (USA)
Fugene HD	Roche (Mannheim)
High Pure PCR Product purification Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
Lipofectamin-2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Maus-IgG Affinitätsmatrix	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Molekulargewichtsmarker für Proteine: „Seebblue plus2“	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR-Master Mix	Roche (Mannheim)
Phalloidin-Rhodamin	Tebu-Bio (Offenbach)
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt)
Plasmid Maxi/Mini kit	Qiagen (Hilden)
Proteinaseinhibitoren „Complete“	Roche (Mannheim)

Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs (Frankfurt)
Rinderserumalbumin (BSA)	Applichem (Darmstadt)
Roti Load (4x) SDS-Probenpuffer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Sypro Ruby protein gel stain	Invitrogen (Karlsruhe)
TrueBlue Peroxidase Substrate	Medac (Wedel)
WB-Blockierpuffer „Odyssey“	Li-Cor Biosciences (Bad Homburg)
Zellysepuffer Cell lytic M	Sigma-Aldrich (Steinheim)

### 3.1.9 Plasmide

Tabelle 3.9 Plasmide und deren Beschreibung

Plasmid	Beschreibung
pACAP2-Flag	Expressionsplasmid für ACAP2 mit Flag- <i>tag</i> unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur Verfügung gestellt von Dr. Paul Randazzo (Jackson <i>et al.</i> , 2000)
pAtaxin10mycHIS	Expressionsplasmid für Ataxin10 unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit C-terminalem myc- und HIS- <i>tag</i> , amplifiziert von pYX-Asc-Atxn10. Empfängerplasmid pCMV-E3LmycHIS. Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pBrg1-HA	Expressionsplasmid für Brg-1 mit HA- <i>tag</i> unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur Verfügung gestellt von Dr. Daniel Engel (Murphy <i>et al.</i> , 1999)
pCMV-E3LmycHIS	pCDNA3.1(+) von Invitrogen (Karlsruhe) mit der Sequenz von E3L und einem C-terminalen myc- und HIS- <i>tag</i> . Zur Verfügung gestellt von Dr. Holger Ludwig (ehemals Paul-Ehrlich-Institut)
pCMV-K1L-HA	Expressionsplasmid für K1L unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit N-terminalem HA- <i>tag</i> . Zur Verfügung gestellt von Dr. Simone Backes (Technische Universität München)
pCMV-SPORT6-Rab3il1	Enthält cDNA-Klon IRAPp968H0732D; Erworben von Imagenes (Berlin).
pΔF11L	Plasmid zur Generierung von MVAΔF11L. Ursprungsplasmid pWRK1L-LacZ3. Zur Verfügung gestellt von Dr. Ulrike Mettler (ehemals Paul-Ehrlich-Institut). Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

---

pFlag CMV-2	Expressionsplasmid von Sigma-Aldrich (Steinheim)
pGSV23-C7L-V5	Del III-Transferplasmid für C7L-V5; Zur Generierung von MVA-C7L-V5; Empfängerplasmid pGSV23-F11L. Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pGSV23-F11L	Del III-Transferplasmid zur Herstellung eines rekombinanten MVA mit F11L aus VACV WR. Kloniert von Dr. Karin Sperling (ehemals Paul-Ehrlich-Institut; Zwilling <i>et al.</i> , 2010)
pLWE-K1L	Del III-Transferplasmid zur Herstellung eines rekombinanten MVA mit K1L aus VACV WR. Kloniert von Dr. Ulrike Mettler (ehemals Paul-Ehrlich-Institut; Zwilling <i>et al.</i> , 2010)
pLWE-K1L-HA	Del III-Transferplasmid für K1L-HA; Zur Generierung von MVA-K1L-HA; Empfängerplasmid pLW9-E. Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pNCite-RPC8	Expressionsplasmid für RPC8 mit HA-tag unter Kontrolle eines T7-Promotors. Zur Verfügung gestellt von Dr. Nouria Hernandez (Hu <i>et al.</i> , 2002)
pNCoR-Flag	Expressionsplasmid für NCoR mit Flag-tag unter Kontrolle eines CMV-Promotors. Zur Verfügung gestellt von Dr. Thorsten Heinzel (Tiefenbach <i>et al.</i> , 2006)
pRab3il1mycHis	Expressionsplasmid für Rab3il1 unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit C-terminalem myc- und His-tag, amplifiziert von pCMV-SPORT6-Rab3il1. Empfängerplasmid pCMV-E3LmycHIS. Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pRnf10-Flag	Expressionsplasmid für RING-finger Protein 10 (Rnf10) unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit C-terminalem Flag-tag. Zur Verfügung gestellt von Dr. Jeffrey Wigle (Lin <i>et al.</i> , 2005)
pRPC8-Flag	Expressionsplasmid für K1L unter der Kontrolle des CMV-Promotors mit N-terminalem Flag-tag, amplifiziert von pRPC8-HA. Empfängerplasmid pFlag CMV-2. Im Rahmen dieser Arbeit kloniert.
pWRK1L-LacZ3	Ursprungsplasmid von pΔF11L zur Verfügung gestellt von Dr. Ulrike Mettler (ehemals Paul-Ehrlich-Institut). Es enthält die K1L-Sequenz eingerahmt von repetitiven Sequenzen.
pYX-Asc-Atxn10	enthält cDNA-Klon IRAVp968A3127D. Erworben von Imagenes (Berlin).

---

### 3.1.10 Viren

Tabelle 3.10 Viren und deren Beschreibung

Virus	Beschreibung
MVAII <sub>new</sub>	MVA-Wildtypvirus basierend auf MVA F6 mit Deletion der K1L-Restsequenz (Staib <i>et al.</i> , 2003)
MVAΔC7L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletiertem C7L-Gen. Generiert von Dr. Caroline Staib (Backes <i>et al.</i> , 2010)
MVAΔC7L-K1L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletiertem C7L-Gen und Inserierung des K1L-Gens in die Deletion III. Generiert von Dr. Caroline Staib (Backes <i>et al.</i> , 2010)
MVAΔE3L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletiertem E3L-Gen. (Hornemann <i>et al.</i> , 2003)
MVAΔF11L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletierter F11L-Restsequenz. Im Rahmen dieser Arbeit generiert. (Zwilling <i>et al.</i> , 2010)
MVA-C7L <sub>rev</sub>	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletiertem C7L-Gen und Reinsерierung des C7L-Gens in die Deletion III. Generiert von Dr. Caroline Staib (Backes <i>et al.</i> , 2010)
MVA-C7L-V5	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletiertem C7L-Gen und Reinsерierung des C7L-Gens mit C-terminalem V5- <i>tag</i> in die Deletion III. Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
MVA-F11L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletierter F11L-Restsequenz und Inserierung des vollständigen F11L-Gens aus VACV WR in die Deletion III. Im Rahmen dieser Arbeit generiert. (Zwilling <i>et al.</i> , 2010)
MVA-F11L-K1L	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit deletierter F11L-Restsequenz und Inserierung des vollständigen F11L- und K1L-Gens aus VACV WR in die Deletion III. Im Rahmen dieser Arbeit generiert. (Zwilling <i>et al.</i> , 2010)
MVA-K1L-HA	Rekombinantes MVAII <sub>new</sub> mit Inserierung des K1L-Gens aus VACV WR mit N-terminalem HA- <i>tag</i> in die Deletion III. Im Rahmen dieser Arbeit generiert.
Vacciniavirus Western reserve (VACV WR)	Wildtyp-Vacciniavirus (ATCC VR 119)



### 3.1.11 Oligonukleotide (*Primer*)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) hergestellt.

Tabelle 3.11 Oligonukleotide und deren Beschreibung

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Beschreibung
HLPEI67	GTACCGGCATCTCTAGCAGT	DelIII <i>flank2_for</i>
HLPEI66	TGACGAGCTTCCGAGTTCC	DelIII <i>flank1_rev</i>
JZ7	TGAATTGTTTCTTTTAGAAGTG	F11L_rev
JZ8	AGGAGATACTATCGTCAGTA	F11L_for
JZ10	TATGTGTGATATTGATATCTTT	F11L_rev
JZ11	CGGTCCAATATCTGTCAAGG	F11L_for
JZ14	AAAAGCGGCCGCGTGAATAATTTCATTACC AAAG	F11L <i>flank1_for</i>
JZ15	AAAAGGGCCCTACTGTGAACTCCGCCGTA G	F11L <i>flank 1_rev</i>
JZ16	AAAAGAGCTCCAATGGAATGCAAAACCCCA TAG	F11L <i>flank 2_rev</i>
JZ17	AAAAACGCGTCTACTAACGACCATATTCCA G	F11L <i>flank 2_for</i>
JZ33	CTAGGCGGCCGCGTTCGTCCTGGTGGAAA TGGTG	RPC8_for
JZ34	CTAGGGTACCCTAGTTGCTGGTCCACCAGG AG	RPC8_rev
JZ35	CTAGCTCGAGATGTGGAGCGGCCAACCCC AACAA	Rab3il1_for
JZ36	CTAGTTCGAAGGCCTCCTGGGGGAAGAAG CCAAG	Rab3il1_rev
JZ37	CTAGCTCGAGATGGCGGCGCCCAGGATGC CAC	Atxn10_for
JZ38	CTAGTTCGAAAGGCGGGGGGATGTCATTA TTAGA	Atxn10_rev

JZ41	CAGACATGTACCCATACGATGTTCCAGATT ACGC	HA_for
JZ42	GTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATGTC TGAAACGAGACGCTAATTAG	K1Lpromotor_r ev_mit HA
JZ47	GTACGGCGCGCCAGACATGTGTGTTATAC TAAGATGGTTGG	C7L-V5_for
JZ48	CGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAG GGATAGGCTTACCATCCATGGACTCATAAT CTCTATACGGG	C7L-V5_rev
JZ49	GGTAAGCCTATCCCTAACCCTCTCCTCGGT CTCGATTCTACGTAATATGAGTATAGTGT AAATGACAC	C7L-V5_for
JZ50	CTAGGCGGCCGCCATGACAATTCCGAAG ATGGAAATGAG	C7L-V5_rev
JZ53	GAGACCATCTATCGGAAACGTC	C7L flank_for
JZ54	GGCTTCTTGTGTACTGTAACCTC	C7L flank_rev
K1Lint1	TGATGACAAGGGAAACACCGC	K1L_for
K1Lint2	GTCGACGTCATATAGTCGAGC	K1L_rev
UM3	AATTCTGCAGATCTCCTTAATATGGGTACG	K1L_rev
UM4	AATTGGATCCAATGTTAACAAAAATGTGGG	K1L_for

### 3.1.12 Antikörper

Tabelle 3.12 Primär-Antikörper und deren Beschreibung

Primäre Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller/Quelle
Anti-A46	1:1000	Kaninchen	Eurogentec (Belgien)
Anti- $\beta$ -Aktin	1:10000	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-B5 ( <i>final bleed</i> )	1:3000	Kaninchen	Eurogentec (Belgien)
Anti-C7 ( <i>final bleed</i> )	1:1000	Kaninchen	Eurogentec (Belgien)
Anti-c-Myc	1:1000	Maus	BD Biosciences (Belgien)
Anti-E3	1:1000	Kaninchen	Dr. B. L. Jacobs, Arizona State University

Anti-eIF2 $\alpha$	1:1000	Kaninchen	Cell signalling (USA)
Anti-eIF2 $\alpha$ -phospho (Ser51)	1:1000	Kaninchen	Cell signalling (USA)
Anti-F11 ( <i>final bleed</i> )	1:1000	Kaninchen	Eurogentec (Belgien)
Anti-Flag- <i>tag</i> M2	1:1000	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-GAPDH	1:3000	Maus	Abcam (USA)
Anti-HA- <i>tag</i>	1:1000	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-HA- <i>tag</i>	1:1000	Maus	Covance (USA)
Anti-His- <i>tag</i>	1:10000	Kaninchen	Acris (Hiddenhausen)
Anti-I $\kappa$ B $\alpha$	1:500	Kaninchen	Santa Cruz (USA)
Anti-K1	1:1000	Kaninchen	Eurogentec (Belgien)
Anti-Lamin A	1:200	Maus	Santa Cruz (USA)
Anti-p65	1:1000	Kaninchen	Santa Cruz (USA)
Anti-V5- <i>tag</i>	1:1000	Maus	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Anti-Vaccinia (Lister)	1:2500	Kaninchen	Acris (Hiddenhausen)

Tabelle 3.13 Sekundär-Antikörper und deren Beschreibung

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller/Quelle
Anti-Kaninchen; Peroxidase gekoppelt	1:2000	Ziege	Dianova (Hamburg)
Anti-Kaninchen; IRDye680 gekoppelt	1:15000	Ziege	Li-Cor Biosciences (Bad Homburg)
Anti-Maus; AF-488 gekoppelt	1:200	Affe	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Maus; IRDye800 gekoppelt	1:15000	Ziege	Li-Cor Biosciences (Bad Homburg)

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.2.1.1 Kultivierungsbedingungen**

Alle eukaryotischen Zelllinien, bzw. Primärzellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% relativer Luftfeuchtigkeit mit dem jeweiligen Zellkulturmedium (siehe 3.1.7) inkubiert.

#### **3.2.1.2 Passagierung adhärenter Zellen**

Die Teilung der Zellen in Verhältnissen von 1:2-1:30 erfolgte bei Erreichen des konfluenten Zustands. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch Zugabe von 3 ml (T175-Zellkulturflasche) Trypsin-EDTA und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur (RT) (bei RK13-Zellen bei 37°C) von der Unterlage abgelöst. Anschließend wurden 7 ml (T175-Zellkulturflasche) Zellkulturmedium zu den trypsinisierten Zellen zugegeben und gründlich resuspendiert. Es folgte das Überführen der Zellen in neue Zellkulturflaschen in dem gewünschten Teilungsverhältnis entsprechendem Volumen. Im Falle von CEF wurden nur primäre oder sekundäre Zellen für Experimente verwendet.

#### **3.2.1.3 Kultivierung adhärenter Zellen in 6-, 12-, oder 24-Loch-Zellkulturplatten**

Die Zellen wurden, wie in 3.2.1.2 beschrieben, mit Trypsin-EDTA abgelöst und in ein Endvolumen von 10 ml mit Zellkulturmedium resuspendiert. Je nach Konfluenz der Zellkulturflasche und Zelllinie wurde zwischen 1 und 3 ml Zellsuspension mit frischem Zellkulturmedium gemischt, sodass ein Endvolumen von 12 ml erreicht wurde. Daraufhin wurde die Zellsuspension gleichmäßig in die Löcher der Zellkulturplatten verteilt. Am folgenden Tag wurden die konfluenten Zellkulturplatten für die entsprechenden Experimente benutzt.

#### **3.2.1.4 Transfektion von Zellen**

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in BHK-21 oder 293T-Zellen wurden diese mit dem jeweiligen Zellkulturmedium ohne Antibiotika so in 6-Loch-Platten ausgesät, dass nach 24 Stunden eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht wurde. 4 µg des jeweiligen Plasmids wurden mit 250 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze und 10 µl Lipofectamin 2000 mit 250 µl Zellkulturmedium ohne Zusätze jeweils 5 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl des Lipofectamin 2000-Medium-Gemisches in das Plasmid-Medium-Gemisch überführt. Nach weiteren 20 Min. Inkubationszeit wurde 500 µl des Transfektionsansatzes auf die Zellen geträufelt.

#### **3.2.1.5 Auftauen von Zellen**

Das Auftauen von Zellen erfolgte durch kurze Inkubation des Kryoröhrchens im Wasserbad bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen zügig in eine T-175-Zellkulturflasche mit 30 ml Zellkulturmedium überführt. Sobald die Zellen an dem Boden der Zellkulturflasche adhärirt hatten (nach ca. 6 Stunden), wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um das DMSO aus dem Einfriermedium zu entfernen. Alternativ wurden die Zellen in 10 ml Medium gegeben, bei 1500 U/Min pelletiert, der Überstand verworfen und nach Resuspension in frischem Medium in eine Zellkulturflasche gegeben.

#### **3.2.1.6 Einfrieren von Zellen**

Die Zellen subkonfluenten T-175-Zellkulturflaschen wurden wie unter 3.2.1.2 beschrieben mit 3 ml Trypsin-EDTA abgelöst und in zusätzlich 7 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcongefäß überführt und bei 1500 U/Min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (Siehe 3.1.6) resuspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. In einem Cryo-Einfrierkontainer wurden die Kryoröhrchen bei -80°C eingefroren und nach einem Tag in einen Stickstofftank überführt.

## **3.2.2 Molekularbiologische Methoden - Arbeiten mit DNA**

### **3.2.2.1 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli***

#### **3.2.2.1.1 TOP 10-Stamm**

Zu 100 µl kompetenten Bakterien wurden 10-100 ng gereinigtes Plasmid (1-2 µl der Minipräparation oder 10 µl Ligationsansatz) hinzugegeben und 30 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock von 2 Min. bei 30°C mit anschließender 2 Min. Inkubation auf Eis. Dem Transformationsansatz wurden 500µl LB-Medium hinzugefügt und ca. 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf ampizilinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 30°C bebrütet.

#### **3.2.2.1.2 DH5α-Stamm**

Die Transformation von DH5α-Bakterien entsprach im Wesentlichen dem in Abs. 3.2.2.1.1 beschriebenen. Der Hitzeschock wurde jedoch bei 42°C durchgeführt und die Inkubationen bei 37°C.

### **3.2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* im analytischen Maßstab**

Die Präparation von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab erfolgte mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden). 2 ml *E. coli* LB-Kultur wurden für 5 Min. bei 10000 U/Min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl Puffer P1 resuspendiert. Es wurde 250 µl Puffer P2 hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 5 Min. bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 350 µl Puffer N3 hinzugegeben, gemischt und für 10 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine QIAprep Plasmid-Säule überführt und für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Es folgte, nach Verwerfen des Durchflusses, ein Waschen der Silica-Membran mit 750 µl Puffer PE (1 Min. Zentrifugation bei 13000 U/Min). Wieder wurde der Durchfluss verworfen, wonach die Membran durch 1 Min. Zentrifugation bei 13000 U/Min vom restlichen Waschpuffer befreit wurde. Durch Zugabe von 30-50 µl H<sub>2</sub>O, einer 1 Min. Inkubation und 1 Min. Zentrifugation bei 13000 U/Min wurde die DNA eluiert.

### 3.2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im präparativen Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab erfolgte mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden). 200ml *E. coli* Übernacht-LB-Kultur wurden 30 Min. bei 4500 U/Min und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und anschließend nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 für 5 Min. bei RT alkalisch lysiert. Durch Zugabe von 10 ml gekühlten Puffer P3 wurde das Zell-Lysat neutralisiert und 20 Min. auf Eis inkubiert. Das Gemisch wurde daraufhin durch den QIAfilter *Cartridge* geleitet und von Proteinen, Zelltrümmern, etc. gereinigt. Dann wurde der Durchfluss auf die mit Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Puffer QC gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert und durch Zentrifugation für 45 Min. bei 4500 U/Min und 4°C pelletiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und für 15 Min. bei 4500 U/Min Zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde luftgetrocknet und in 100-300µl H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.2.2.4 Photometrische DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA-Lösung wurde diese photometrisch bei 230 nm, 260 nm und 280 nm vermessen. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht dabei 50µg/ml dsDNA. Die Gleichzeitige Messung bei OD<sub>230</sub>, OD<sub>260</sub> und OD<sub>280</sub> gibt Aufschluss über Verunreinigungen wie Proteine, die bei 280 nm und Polysaccharide die bei 230 nm stärker absorbieren. Bei einer reinen DNA-Lösung gilt:

$$\text{OD}_{230} : \text{OD}_{260} : \text{OD}_{280} \\ 0,45 : 1 : 0,5$$

### 3.2.2.5 DNA-Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Zur Spaltung von Plasmid-DNA an spezifischen Sequenzmotiven wurden 3-10 Einheiten/µg DNA der entsprechenden Restriktionsendonuklease in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer verwendet. Die Inkubationszeit betrug in der Regel 1 Stunde bei der vom Hersteller empfohlenen Inkubationstemperatur (meist 37°C).

### 3.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch in 1-2%igen TAE-gepufferten Agarosegelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-160 Volt in TAE-Puffer. Die aufzutrennenden DNA-Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 5× DNA-Probenpuffer vermischt. Anschließend folgten die Färbung der DNA-Banden in einer Ethidiumbromid-Lösung (ca. 5 µg/ml Ethidiumbromid in TAE-Puffer) und die Entfärbung unter fließendem Wasser. Alternativ wurden die DNA-Proben mit 6x EZ-Vision-Probenpuffer (Amresco, USA) gemischt, der gleichzeitig auch als DNA-Färbepuffer fungiert.

### 3.2.2.7 Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Präparation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Das gewünschte DNA-Fragment wurde aus dem Agarosegel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit dem 3-fachen Gel-Volumen an Bindepuffer QG für 10 Min. bei 50°C unter Schütteln (300 U/Min) inkubiert. Dann wurde dem Gel-Volumen entsprechend Isopropanol hinzu gegeben und gemischt. Nach Überführung in eine QIAquick-Säule wurde für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert, der Durchfluss entfernt, 0,75 ml Wasch-Puffer PE hinzu gegeben und wieder für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder entfernt und ein weiteres Mal für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurden 30-50 µl H<sub>2</sub>O auf die Säulenmembran gegeben, 1 Min. bei RT inkubiert und für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert.

### 3.2.2.8 Ligation eines DNA-Fragments in ein linearisiertes Plasmid

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, USA) können komplementär überhängende oder stumpfe DNA-Enden kovalent verknüpft werden. Das Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 5'-Phosphatgruppe und einer freien 3'-OH-Gruppe von dsDNA.

Zur Ligation wurden Vektor-DNA und DNA-Insert in einem Verhältnis von ca. 1:2 bis 1:3 eingesetzt für überhängende DNA-Enden und 1:5 bis 1:10. Die Ligation erfolgte 1-2



Stunden bei RT oder ÜN auf Eis mit einem Volumen von 2 µl T4-DNA-Ligasepuffer (10x) und 1 µl T4-DNA-Ligase bei einem Gesamtvolumen von 20 µl.

### **3.2.2.9 5'-Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Zum Teil wurden die 5'-Enden von linearisierten Plasmiden mit alkalischer Phosphatase (engl.: *calf intestine alkaline phosphatase*, CIP; New England Biolabs, USA) dephosphoryliert, um eine Selbstligation zu verhindern. Nach dem Restriktionsverdau wurde 1 µl alkalische Phosphatase zugegeben und für 1/2 Stunde bei 37°C inkubiert.

### **3.2.2.10 Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen und enzymatischen Reaktionen**

Die Isolierung von DNA aus PCR-Ansätzen und enzymatischen Reaktionen erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden). Dem Restriktionsansatz/der PCR wurde das 5-fache Volumen des Bindepuffers PBI hinzugefügt und gemischt. Dann wurde das Gemisch in eine QIAquick Sammel-Säule überführt und 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 0,75 ml Wasch-Puffer hinzugegeben und wieder für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde entfernt und ein weiteres Mal für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurden 30-50 µl H<sub>2</sub>O auf die Säulenmembran gegeben, für 1 Min. bei RT inkubiert und dann für 1 Min. bei 13000 U/Min zentrifugiert.

### **3.2.2.11 Präparation von DNA aus Säuger-Zellen**

#### **3.2.2.11.1 Phenol-Chloroform Extraktion**

Die Präparation von DNA erfolgte aus 500 µl Überständen geernteter und gefriergetauter Virus-Amplifikationspassagen (siehe Abs.3.2.6.2.4). Die Überstände wurden von Proteinen befreit durch Zugabe von 50 µl 10 x TEN, 50 µl Proteinase K, 50 µl 10% SDS und einer Inkubation von 1 Stunde bei 56°C und 300 U/Min im Schüttler. Es folgte die Zugabe von 500 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1). Der Ansatz wurde gründlich gevortext und anschließend 5 Minuten bei 13000 U/Min und RT zentrifugiert. Die Überführung der

oberen, wässrigen Phase in ein neues Eppendorf-Gefäß, die Vermischung mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) sowie gründliches vortexen und ein weiterer Zentrifugationsschritt schlossen sich an. Die obere wässrige Phase wurde wiederum abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Natrium-Acetat (3 M, pH 6,3) sowie 1 ml Ethanol (100%, -20°C). Nach einer halben Stunde Inkubation bei -80°C schloss sich die Pelletierung der DNA mittels Zentrifugation für 30 Min. bei 13000 U/Min und 4°C an. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol (70%, -20°C) gewaschen und wieder zentrifugiert (1 Stunde bei 13000 U/Min und 4°C). Nach dem Trocknen des Pellets bei 37°C konnte die DNA in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und für 10 Min. bei 50°C und 300 U/Min im Schüttler gelöst werden. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der DNA bei -20°C.

#### **3.2.2.11.2 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden)**

Als Alternative zur Chloroform-Phenol Extraktion (siehe Abs. 3.2.2.11.1) wurde die DNA aus infizierte Zellen mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit extrahiert. Zellen in 12-Loch Platten wurden mit einem Zellscharber vom Boden abgelöst und samt Medium in Eppendorfgefäßen bei 2000 U/Min 5 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und 20 µl Proteinase K, sowie 200 µl AL-Puffer hinzugefügt. Nach Durchmischen mit einem Vortexmixer wurde für 10 Min. bei 56°C das Gemisch inkubiert. Es wurde 200 µl 96% Ethanol hinzugegeben, kurz gemischt, das Gemisch in DNeasy Mini spin Säulen überführt und 1 Min. bei 8000 U/Min bei RT zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 500 µl AW1-Puffer (1 Min. bei 8000 U/Min) und ein Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer (3 Min. bei 14000 U/Min), wobei nach jedem Zentrifugationsschritt die Auffangbehälter der Säulen ausgetauscht wurden. Zur Elution wurden 100-200 µl H<sub>2</sub>O in die Säule pipettiert, für eine Min. bei RT inkubiert und die gelöste DNA in ein Eppendorfgefäß zentrifugiert (1 Min. bei 8000 U/Min). Bis zur weiteren Verwendung erfolgte die Lagerung der DNA bei -20°C.

#### **3.2.2.11.3 Schnelle DNA-Extraktion aus Virus-Plaques**

Diese Methode wurde als einfache und schnelle Methode alternativ zu der in Abs. 3.2.2.11.1 und 3.2.2.11.2 beschriebenen Methoden genutzt, um die DNA von möglichst

vielen Virusklonen bei der Generierung rekombinanter Viren zu überprüfen. Plaques wurden in 30 µl Medium aufgenommen und hiervon 10 µl in ein PCR-Gefäß (meist 8er-*stripes*) überführt, in welches 10 µl 2x PCR-Puffer mit 0,9% NP-40 und 0,9% Tween®-20 und 1,2 µl Proteinase K (5 mg/ml) vorpipettiert wurden. Es folgten 1 Stunde Inkubation bei 37°C und die Hitzeinaktivierung der Proteinase K für 10 Min. bei 94°C. Nach ca. 10 Sek. Zentrifugation um die Zelldebris zu pelletieren wurden 5 µl Überstand für eine 50 µl PCR eingesetzt (siehe Abs. 3.2.2.12.3).

### 3.2.2.12 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

#### 3.2.2.12.1 PCR mittels PCR Master Kit (Roche, Mannheim)

Die Amplifikation von DNA zur Überprüfung rekombinanter MVA-Klone auf erfolgreiche Integration von Fremdgenen (siehe Abs.3.2.6.2) erfolgte mittels PCR. Hierfür wurde das PCR Master Kit (Roche Diagnostics, Penzberg) benutzt, welches als DNA-Polymerase die *Taq*-Polymerase enthält. Die Reaktion erfolgte in 25 µl-Ansätzen:

12,5 µl Roche-PCR-Mastermix

0,5 µl 5`-Primer

0,5 µl 3`-Primer

3,0 µl Matrizen-DNA

8,5 µl H<sub>2</sub>O

Die PCR gliederte sich in folgende Abschnitte:

- 30 Sek. Denaturierung bei 94°C zum Auftrennen der komplementären DNA-Stränge
- Hybridisieren der Primer (*annealing*) an die Matrizen-DNA meist bei 52°C (Entsprechend der Schmelztemperatur der *primer*) für 30 Sek.
- Elongation der *Taq*-Polymerase bei 72°C und somit Synthese des komplementären DNA-Stranges. Die Zeit wurde hierfür entsprechend der Länge des zu synthetisierenden DNA-Stranges gewählt, wobei eine Syntheserate von 1000 Bp/Min. zugrunde gelegt wurde.

Diese Abfolge wurde meist 30-mal wiederholt, worauf sich nochmals eine abschließende Elongationsphase von 5 Min. anschloss. Die so synthetisierten DNA-Fragmente wurden dann per Agarosegelelektrophorese (siehe Abs.3.2.2.6) aufgetrennt und analysiert.

### **3.2.2.12.2 PCR mittels Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs, USA)**

Zum Amplifizieren von DNA, die zur Klonierung in Vektoren genutzt werden sollte, wurde die *high fidelity* Phusion DNA-Polymerase (New England Biolabs, USA) benutzt.

Die Reaktion erfolgte in 50 µl-Ansätzen:

10 µl Phusion HF-Puffer  
1 µl 10mM dNTP-mix  
0,5 µl 5`-*primer* (10 pM)  
0,5 µl 3`-*primer* (10 pM)  
0,2 µl Matrizen-DNA (1 µg/µl)  
0,5 µl Phusion DNA-Polymerase  
37,3 µl H<sub>2</sub>O

Die Denaturierung der DNA wurde bei 98°C für 30 Sek. durchgeführt, wobei initial 2 Min. denaturiert wurde. Die Elongationszeit (72°C) betrug 15 Sek./1000 Bp. bei Plasmid-DNA als Matrize und 30-60 Sek./1000 Bp. bei komplexeren DNA-Matrizen, wie z.B. DNA-Extrakte aus Zellen.

### **3.2.2.12.3 „Plaque“-PCR**

Zur Überprüfung, ob bei der Generierung von rekombinanten Viren die Klone die gewünschte Insertion in Ihrem Genom haben, wurde bei DNA, die mittels der in Abs. 3.2.2.11.3 beschriebenen Methode extrahiert wurde, die PCR folgendermaßen durchgeführt:

10 µl 10x PCR-Puffer  
1 µl 10mM dNTP-mix  
0,5 µl 5`-*primer* (10 pM)  
0,5 µl 3`-*primer* (10 pM)  
5 µl Matrizen-DNA (Überstand)  
0,5 µl *Taq* DNA-Polymerase (Qiagen)  
38 µl H<sub>2</sub>O

Es wurde initial 3 Min. bei 94°C denaturiert und final 10 Min. bei 72°C elongiert. Im Übrigen wurde die PCR wie in Abs. 3.2.2.12.1 beschrieben durchgeführt.

### 3.2.2.13 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Hierzu wurde 1 µg DNA getrocknet und zusammen mit den zur Sequenzierung zu verwendenden Primern an MWG übersandt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Funktion „*assemble*“ des Programms Vector NTI (InforMax).

## 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.3.1 Proteinlysat Herstellung von adhärennten Zellen

Zellen in 6- oder 12-Loch-Platten wurden, wie in Abs. 3.2.6.1 beschrieben, infiziert und/oder transfiziert. Nach der gewünschten Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 100 µl bzw. 50 µl 1xSDS-Probenpuffer versetzt, aufgenommen und durch QIAshredder-Säulen (Qiagen, Hilden) bei 13300 U/Min und 4°C 2 Min. zentrifugiert und somit homogenisiert. Bis zur weiteren Benutzung wurden die Proteinlysate bei -80°C gelagert.

Alternativ wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst oder mit PBS gewaschen, dann mit PBS mit 10 mM EDTA für ca. 5 Min. inkubiert, bis sie sich abgelöst hatten und 5 Min. bei 1500 U/Min pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden das Pellet mit 150 µl pro Loch einer 6-Loch Platte (700 µl pro T175-Zellkulturflasche) mit dem entsprechenden Zellysepuffer versetzt. Daraufhin folgte die Inkubation für 10-45 Min. auf

Eis sowie die anschließende Zentrifugation (10-20 Min. 13300 U/Min bei 4°C). Der Überstand wurde dann in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert oder sofort weiter verwendet.

Alle Lysepuffer wurden vor Gebrauch mit Proteaseinhibitoren (1 Tablette/7 ml Puffer complete protease inhibitor (Roche, Mannheim)) und zusätzlich bei Protein-Protein Interaktionsstudien 1:100 mit Phosphatase-Inhibitor Cocktail set II (Calbiochem, Darmstadt) versetzt.

### **3.2.3.2 Extraktion von nukleären und zytoplasmatischen Proteinen**

Zellen in 6-Loch Platten wurden mit PBS gewaschen, mit PBS mit 10 mM EDTA für ca. 5 Min. inkubiert bis diese abgelöst waren und bei 1500 U/Min 5 Min. pelletiert. Die Extraktion der zytoplasmatischen und nukleären Proteine erfolgte im Weiteren mit dem NE-PER Kit (Pierce, USA). Alle folgenden Puffer bzw. Lösungen wurden wie bei Abs. 3.2.3.1 beschrieben mit Proteaseinhibitoren versetzt. Das Zellpellet wurde in 100 µl eiskalten CER I-Puffer resuspendiert, für 15 Sek. gevortext und 10 Min. auf Eis inkubiert. Es wurde 5,5 µl eiskaltes CER II-Puffer hinzupipettiert, 5 Sek. gevortext, 1 Min. auf Eis inkubiert und wieder 5 Sek. gevortext. Daraufhin wurden die Zellkerne bei 13300 U/Min und 4°C 6 Min. pelletiert und der Überstand (zytoplasmatisches Extrakt) in ein vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Die Zellkerne wurden mit 300 µl kalten PBS gewaschen (6 Min. 13300 U/Min und 4°C) und das Pellet in 50 µl eiskalten NER I-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 40 Min. Inkubation auf Eis, wobei je 10 Min. für 15 Sek. gevortext wurde. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13300 U/Min und 4°C für 10 Min. wurde der Überstand (nukleäres Extrakt) in Eppendorfgefäße überführt und bei -80°C gelagert.

### **3.2.3.3 Proteinquantifizierung nach Bradford**

Die Quantifizierung von Proteinen erfolgte über die Färbemethode nach Bradford, 1976. Zu 5 µl Probe wurden 200 µl Bradfordreagenz (BioRad, München) und 800 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben. Die Verfärbung wurde anhand einer Vergleichsprobe mit H<sub>2</sub>O bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde daraufhin mit Hilfe einer mit BSA erstellten Eichgerade bestimmt.

### 3.2.3.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proben wurden zur Vorbereitung mit 4x Rotiload SDS-Probenpuffer (Carl Roth, Karlsruhe) versetzt, 5 Min. bei 95°C inkubiert und dann auf das SDS-Gel aufgetragen. Durch die Denaturierung der Proteine, die durch die Hitzebehandlung und den im Probenpuffer enthaltenen  $\beta$ -Mercaptoethanol (löst Disulfidbrücken) zustande kommt, wird die Tertiär-Struktur der Proteine aufgelöst. Das ebenfalls im Probenpuffer vorhandene SDS lagert sich gleichmäßig an die Polypeptidkette an und sorgt somit für ein Ladungsverhältnis, das mit der Größe korreliert.

Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100-150 V durchgeführt und 1x SDS-Laufpuffer. Im Falle von Bis-Tris Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe) wurde 1x MOPS-Puffer während der Elektrophorese als Laufpuffer verwendet. Im Sammelgel werden die Proteine nach ihrer jeweiligen Größe konzentriert und im Trenngel dann der Größe entsprechend aufgetrennt. Die SDS-Gele am Bsp. eines 10%igen Gels wurden wie folgt gegossen:

Trenngel 20 ml:

Komponente	Volumen bei 10%igem Gel (ml)
H <sub>2</sub> O	7,9
30% acryl-bisacrylamid mix	6,7
1,5M Tris (pH 8,8)	5,0
10% SDS	0,2
10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,2
Tetramethyldiamin (TEMED)	0,008

Sammelgel 10 ml:

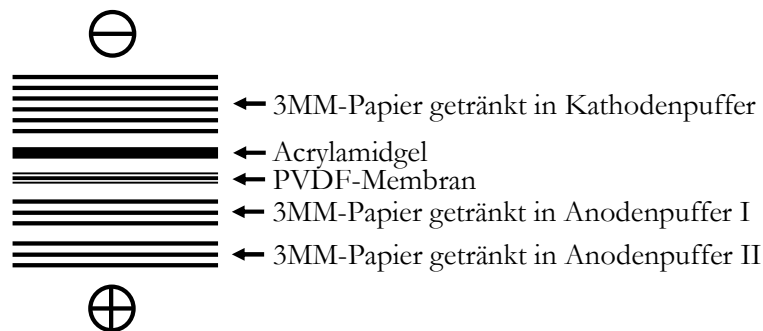
Komponente	Volumen
H <sub>2</sub> O	6,8
30% acryl-bisacrylamid mix	1,7
1,5M Tris (pH 6,8)	1,25
10% SDS	0,1
10% Ammoniumpersulfat (APS)	0,1
Tetramethyldiamin (TEMED)	0,01

Als Größenmarker wurde 5  $\mu$ l SeeBlue plus 2 (Invitrogen, Karlsruhe) mit aufgetragen.

### 3.2.3.5 Western Blot-Analyse

#### 3.2.3.5.1 Semi-dry blotting

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden per *semi-dry blotting* auf PVDF-Membranen (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg) bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  des Gels für 1,5 Stunden von dem SDS-Gel übertragen. Der *blot* wurde von der Kathode zur Anode wie folgt aufgebaut: 6 Lagen 3MM-Papier in Kathodenpuffer getränkt, SDS-Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 3 Lagen 3MM-Papier in Anodenpuffer 2 getränkt, 3 Lagen 3MM-Papier in Anodenpuffer 1 getränkt (siehe Abb. 3.1). Die PVDF-Membran wurde kurz vor der Verwendung in Methanol äquilibriert.



**Abb. 3.1: Aufbau eines *semi-dry* Western Blot von der Kathode zur Anode.** 6 Lagen 3MM-Papiere mit Kathodenpuffer getränkt, SDS-Gel, PVDF-Membran, 3 Lagen 3MM-Papiere mit Anodenpuffer 2 getränkt und 3 3MM-Papiere mit Anodenpuffer 1 getränkt.

Nach dem Proteintransfer wurden die proteinfreien Stellen der Membran mit Blockierpuffer (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg) für 1 Stunde bei RT blockiert. Dann erfolgte die Zugabe der beiden primären Antikörper in Blockierpuffer mit 0,2 % Tween 20 und 0,02% SDS in der entsprechenden Konzentration (siehe Tabelle 3.12) und die Inkubation über Nacht (ÜN) bei 4°C. Unter den primären Antikörpern befand sich oftmals zur Ladekontrolle der Antikörper gegen  $\beta$ -Aktin, wobei darauf zu achten war, dass der zweite primäre Antikörper aus einer anderen Spezies stammt.

Die Inkubation mit den sekundären Antikörpern (an IRDye680 und IRDye800 gekoppelt) erfolgte in Blockierpuffer, 1:1 gemischt mit PBS/0,05 % Tween 20, in der entsprechenden Konzentration (siehe Tabelle 3.13) für 1 Stunde bei RT. Zwischen den Inkubationen mit den verschiedenen Antikörpern und vor der Detektion wurde die Membran 3  $\times$  ca. 5 Min.

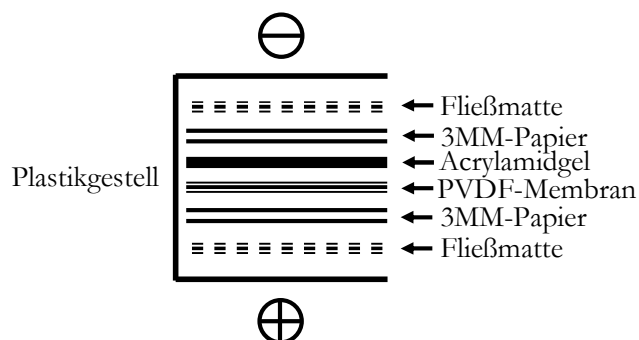


mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen, wobei unmittelbar vor der Detektion durch das Infrarot-Detektiergerät (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg) die Membran in PBS ohne Tween 20 gewaschen wurde.

### 3.2.3.5.2 *wet blotting*

Im Falle von sehr großen Proteinen wurden diese per *wet blotting* auf PVDF-Membranen transferiert, da hierbei eine längere Transferzeit nötig ist, wofür der Puffer bei dem *semi-dry*-Verfahren nicht ausreicht. Im Unterschied zum *semi-dry blotting* wurde beim *wet blotting* der Transfer im Tank der *wet-blot* Apparatur (BioRad, München) bei einer Spannung von 100 V durchgeführt in 800 ml 1x Transferpuffer gemischt mit 200 ml Methanol.

Der *wet blot* wurde von der Kathode zur Anode wie folgt aufgebaut: 1 Fließmatte, 2 Lagen 3MM-Papier, SDS-Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 2 Lagen 3MM-Papier, 1 Fließmatte (siehe Abb. 3.1), wobei der Aufbau im 1x Transferpuffer erfolgte und der *blot* nach dem Aufbau in ein Plastikgestell fixiert wird.



**Abb. 3.2 Aufbau eines *wet* Western Blot von der Kathode zur Anode.** 1 Fließmatte, 2 Lagen 3MM-Papier, SDS-Polyacrylamidgel, PVDF-Membran, 2 Lagen 3MM-Papier, 1 Fließmatte, umrahmt von einem Plastikgestell.

### 3.2.3.5.3 Detektion und Quantifizierung von Proteinbanden

Zur Detektion wurde das Infrarot-Detektiergerät Odyssey (Li-Cor Biosciences, Bad Homburg) genutzt. Die Quantifizierung von Bandenintensitäten erfolgte mit dem zum Detektiergerät dazugehörigen Computer-Programm Odyssey application software 2.1. Bei der Quantifizierung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wurde die Phospho-spezifische Bandenintensität mit der dazugehörigen Gesamt-eIF2 $\alpha$ -Bandenintensität normalisiert. Die I $\kappa$ B $\alpha$ -Bandenintensitäten wurden durch die Signalstärke der  $\beta$ -Aktinbande normalisiert.

### 3.2.3.6 Immunfluoreszenzfärbungen

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden  $1 \times 10^4$  HeLa-Zellen je Loch in eine 12-Loch-Zellkulturplatte ausgesät, in deren Löcher zuvor sterile Deckgläschen platziert wurden. Nachdem die Zellen adhärirt hatten, wurden diese mit einer *moi* (engl.: *multiplicity of infection*; infektiöse Einheiten pro Zelle) von 20 mit den jeweiligen Viren infiziert (siehe Abs. 3.2.6.1). Nach 1 Stunde Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Weitere 4 Stunden später wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 20 Min. bei RT fixiert. Daraufhin wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit 0,1% Triton-X-100 in PBS permeabilisiert für 15 Min. bei RT. Daraufhin folgte ein Waschschrift in PBS, wonach 5% BSA in PBS für 30-60 Min. bei RT zum Blockieren auf die Zellen gegeben wurde. Es folgten 3 Waschschrift mit PBS und die Inkubation der Deckgläschen in einer 1:100 Verdünnung mit 2% BSA in PBS des primären Antikörpers gegen HA bzw. V5 in einer feuchten Kammer bei 4°C ÜN. Im Fall einer Anfärbung des Aktinzytoskeletts wurden die Deckgläschen in 1:1000 Phalloidin-Rhodamin für 45 Min inkubiert. Nach weiteren 3 Waschschrift mit PBS wurden die Deckgläschen in einer 1:200 Verdünnung 2% BSA in PBS des Sekundär-Antikörpers (AF488-gekoppelt) für 45-60 Min. im Dunkeln inkubiert. Schließlich wurden die Deckgläschen noch 3-mal in PBS gewaschen und auf Objektträger mit einer Einbettlösung, die DAPI enthält (Dianova, Hamburg) gegeben und gewartet bis diese ausgehärtet war.

### 3.2.3.7 Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die gefärbten Proteine (siehe Abs. 3.2.3.6) wurden einem konfokalen Laserscan Mikroskop (CLSM) von Zeiss (LSM 510 META) analysiert und Aufnahmen mit der dazugehörigen Software durchgeführt. Im Falle, das das Aktinzytoskelett analysiert werden sollte, wurde die konfokale Blende des Mikroskops so eingestellt, dass überlappende 200 nm-Schnitte auf der Z-Achse der Zelle aufgenommen wurden, womit später eine Z-Projektion erstellt wurde. Die finale Verarbeitung der gemachten Bilder wurde mithilfe von Adobe Photoshop Ver 8.0 durchgeführt.

### 3.2.3.8 Co-Immünpräzipitierung

Die Co-Immünpräzipitierung (Co-IP) ist eine Methode um Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Im Allgemeinen wird ein Protein mit einem Antikörper gerichtet gegen dieses oder einen *tag*, der an diesem Protein anhängt, präzipitiert. In einem weiteren Schritt wird eine Affinitätsmatrix hinzugegeben, an welcher Protein A oder G kovalent gebunden ist, welches an den Fc-Teil des Antikörpers bindet. Somit kann man das gewünschte Protein und somit auch andere daran gebundene Proteine, spezifisch aus einem Proteinlysats separieren und ungebundene Proteine durch Waschschrirte entfernen. Wichtig ist hierbei, dass die Proteine, bei welchen eine Interaktion nachgewiesen werden soll, nicht durch den Lysepuffer denaturiert werden, damit die erhalten bleibt.

Für die Co-IP wurden 293T- oder BHK-21-Zellen in 6-Loch Platten mit Expressionsplasmiden transfiziert, die für Proteine kodieren, bei welchen eine Protein-Protein-Interaktion nachgewiesen werden sollte. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit MVA-K1L-HA oder MVA-C7L-V5 mit einer moi von 10 infiziert und nach 4-5 h p.i. wurden die Zellen lysiert. Im Fall von Co-IPs, bei welchen unbekannte, mit K1-HA oder C7-V5 interagierende Proteine identifiziert werden sollten, wurden 1-50 konfluente T175-Zellkulturflaschen NIH-3T3-Zellen ( $2 \times 10^7$  bis  $1 \times 10^9$  Zellen) mit MVA-K1L-HA oder MVA-C7L-V5 mit einer moi von 10 infiziert und nach 4-8 h p.i. die Zellen lysiert. Das Ablösen der Zellen und die Lyse erfolgte wie in Abs. 3.2.3.1 beschrieben. Bei der Co-IP von HA- oder V5-markierten Proteinen wurde eine Affinitätsmatrix gewählt, die einen HA- bzw. V5-Antikörper direkt gekoppelt hat (Sigma-Aldrich, Steinheim). Diese wurde direkt zu dem Proteinlysats hinzugegeben (20  $\mu$ l bei Lysaten von 6-Loch Platten, 50  $\mu$ l bei 1 T175-Zellkulturflasche und 1 ml bei 50 T175-Zellkulturflaschen). Gegebenenfalls wurde das Volumen auf 600  $\mu$ l mit 1x IP-Puffer (Sigma-Aldrich, Steinheim) aufgefüllt und ÜN bei 4°C in einer Säule (Sigma-Aldrich oder Snap cap von Pierce, USA), eingespannt in einem Über-Kopf-Taumler, inkubiert. Bei größeren Ansätzen wurde die Inkubation in 10 ml Pierce centrifuge columns (Pierce, USA) durchgeführt und das Volumen auf 22 ml pro Ansatz eingestellt.

Für alle anderen *tags* wurde eine Affinitätsmatrix mit Protein A- oder G-Kopplung gewählt (GE-Healthcare, München) und vorher eine Inkubation von 1-2 Stunden bei 4°C (Über-Kopf-Taumler) mit dem entsprechenden Antikörper (1:100 zugesetzt) durchgeführt. Die Affinitätsmatrix wurde hierbei 3-mal mit dem entsprechenden Lysepuffer gewaschen, je Ansatz 50  $\mu$ l einer 1:1 Mischung der Affinitätsmatrix mit Lysepuffer zugegeben und ÜN bei 4°C in einem Über-Kopf-Taumler inkubiert.

Die Affinitätsmatrix wurde daraufhin 5-mal mit 500 µl (10 ml bei den größeren Ansätzen) 1x IP-Puffer, 1-mal mit 0,1x IP-Puffer gewaschen und bei den großen Ansätzen ein zusätzlicher Waschschrift mit PBS-Puffer ohne NaCl durchgeführt.

Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte im Fall, dass die gebundenen Proteine per Western Blot-Analyse nachgewiesen werden sollten, mit 100 µl 1x SDS-Probenpuffer und 5 Min. Inkubation bei 95°C. Ansonsten wurden die Proteine mit 3-mal 500 µl 1% SDS je 15 Min. Inkubation bei 300 rpm und RT abgelöst. Alternativ wurde mit 3-mal 2 ml 1% SDS je 15 Min. Inkubation bei 300 rpm eluiert, mit anschließendem Einsatz eines 7 ml Proteinkonzentrierers (Pierce, USA; 9K MWCO), mit welchem anschließend das Volumen auf ca. 300 µl reduziert wurde. Schließlich wurden die eluierten Proteine per SDS-PAGE (siehe Abs. 3.2.3.4) oder 2D-Gelelektrophorese (siehe Abs. 3.2.3.11) getrennt und die Proteine in den Gelen angefärbt (siehe Abs. 3.2.3.10).

### **3.2.3.9 S<sup>35</sup>-metabolische Markierung**

Um die gesamte Polypeptid-Synthese von Zellen sichtbar zu machen wurden diese mit radioaktivem S<sup>35</sup>-Cystein-Methionin markiert. Zellen in 6-Loch Platten wurden infiziert oder uninfiziert belassen. Nach 40 Min. bei 4°C wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und daraufhin bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Eine halbe Stunde vor dem gewünschten Zeitpunkt der Ernte, wurde mit Cystein-Methionin-freiem Medium gewaschen und 50 µCi S<sup>35</sup>-Cystein-Methionin in Cystein-Methionin-freiem Medium pro Loch hinzugegeben. Daraufhin wurde mit PBS gewaschen und mit 100 µl 1x SDS-Probenpuffer die Zellen lysiert. Nach 10%-SDS-PAGE wurden die Proteine im Gel mit 7%iger Essigsäure fixiert und das Gel mit Amplify Fluorographic Reagent (GE Healthcare, USA) inkubiert. Vakuum-getrocknete Gele wurden mit Autoradiographie detektiert.

### **3.2.3.10 Proteinfärbemethoden**

#### **3.2.3.10.1 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Eine sehr sensitive Methode zum Anfärben von Proteinen stellt die Silberfärbung dar. Hierfür wurde das ProteoSilver Plus Silver stain kit (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Lösungen wurden entsprechend der Anleitung angesetzt und sind dieser zu entnehmen. Alle Inkubationen wurden auf einem Orbitalschwenker (60-70 U/Min.) durchgeführt und

in Glasbehältern, die zuvor gründlich mit Detergentien gereinigt wurden. Falls sich an die Färbung eine massenspektrometrische Untersuchung von bestimmten Protein-Banden anschloss, wurden im Fall, dass das Gel in die Hände genommen werden musste, stets saubere Handschuhe verwendet, um Keratin- und andere Proteinkontaminationen zu vermeiden.

Das Gel wurde nach der SDS-PAGE zunächst in 100 ml Fixierlösung für 40 Min. bis ÜN inkubiert. Es folgte eine 10 Min. Inkubation des Gels in 100 ml 30% Ethanol, worauf sich eine 10 Min. Inkubation in Reinstwasser anschloss. Nach 10 Min. Inkubation in 100 ml Sensitizer-Lösung, wurden zwei weitere Waschschrötte in je 200 ml Reinstwasser durchgeführt. Es folgte die Silberfärbung in 100 ml Silber-Lösung für 10 Min., ein Waschschrötte für 1 Min. in 200 ml Reinstwasser und daraufhin die Gel-Entwicklung bei 3 bis 7 Min. Inkubation in 100 ml Entwicklungslösung. Die Entwicklung wurde durch Zugabe von 5 ml Proteosilver Stop Lösung abgebrochen und für 5 Min. inkubiert. Schließlich erfolgte ein finaler Waschschrötte für 15 Min. in 200 ml Reinstwasser und das Einscannen des gefärbten Gels.

### **3.2.3.10.2 Sypro-Ruby-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Eine Proteinfärbemethode mit vergleichbarer Sensitivität zur Silberfärbung stellt die Sypro-Ruby-Färbung dar. Wie schon in Abs. 3.2.3.10.1 beschrieben, wurde auch bei dieser Färbung besonderes Augenmerk auf die Sauberkeit von Färbbehältern und Handschuhen gelegt und die Inkubationen wurden auf einem Orbitalschwenker durchgeführt. Nach einer SDS-PAGE (siehe Abs. 3.2.3.4) wurden die Proteine im Gel durch Inkubation in 100 ml Sypro-Ruby-Fixierlösung für 30 Min. fixiert. Dieser Fixierschrötte wurde mit neuer Lösung ein weiteres Mal wiederholt. Daraufhin wurde die Färbung durchgeführt mit 60 ml Sypro-Ruby-Gel-Färbelösung (Invitrogen, Karlsruhe) ÜN in einem verschlossenen Gefäß. Das Gel wurde am darauffolgenden Tag in einen neuen Behälter überführt, in welchem sich 100 ml Sypro-Ruby-Waschlösung befanden. Nach 5 Min. Inkubation schlossen sich zwei weitere Waschschrötte mit je 100-200 ml Reinstwasser an. Die Detektion der gefärbten Proteinbanden wurde mit dem FLA-9000 *imager* (FujiFilm, Düsseldorf) durchgeführt.

### 3.2.3.11 2D-Gelelektrophorese

#### 3.2.3.11.1 Aufreinigung der Proben per 2D clean-up Kit (GE-Healthcare, München)

Um Proteine zu ihrem isoelektrischen Punkt hin aufzutrennen, ist es nötig, die Proteinlysate weitestgehend von Salzen und Detergenzien zu befreien, da diese mit der isoelektrischen Fokussierung (IEF) interferieren. Hierfür wurden die Proteineluate nach der Co-IP (siehe Abs. 3.2.3.8) mit dem 2D clean-up kit (GE-Healthcare, München) aufgereinigt und die Proteine gefällt. 100 oder 300 µl Eluat wurden in ein 1,5 oder 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Im Folgenden wird das Protokoll für das Volumen von 100 µl Eluat beschrieben, wobei bei 300 µl die Volumina der Lösungen zu verdreifachen sind. Es wurde 300 µl Präzipitant zu dem Eluat hinzugegeben, ordentlich gemischt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe und das darauffolgende Mischen von 300 µl Co-Präzipitant, woran sich eine 5 Min. Zentrifugation bei 13300 U/Min bei 4°C anschloss. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, ein weiteres Mal kurz zentrifugiert und der restliche Überstand schließlich entfernt. Das Protein-Pellet wurde mit 40 µl Co-Präzipitant überdeckt und für 5 Min. auf Eis inkubiert. Darauf wurde nochmals 5 Min. bei 13300 U/Min, 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde nun mit 25 µl Reinstwasser überschichtet und für 5-10 Sek. gevortext. Es wurde 1 ml Waschpuffer (vorgekühlt auf -20°C) und 5 µl Waschadditiv hinzugegeben und gründlich gevortext. Danach erfolgte eine Inkubation bei -20°C für 30 Min., wobei alle 10 Min. für 20-30 Sek. gevortext wurde. Schließlich wurde für 5 Min. bei 13300 U/Min, 4°C pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet für max. 5 Min. Luftgetrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in 150 µl IEF-Puffer resuspendiert und die IEF durchgeführt (Abs. 3.2.3.11.2).

Bei großen Eluatvolumen von 1,5 ml wurde die Ultrazentrifuge (UZ) benutzt mit dem SW32.1Ti Rotor (Beckman coulter, USA) und den dazugehörigen Zentrifugenbehältnissen. Es wurde 4,5 ml Präzipitant hinzugegeben, 15 Min. auf Eis inkubiert, weitere 4,5 ml Co-Präzipitant hinzugegeben, gemischt und bei 12000 U/Min. für 15 Min. in der UZ zentrifugiert. Nach dekantieren des Überstandes wurden die UZ-Röhrchen in 50 ml Falconröhrchen gestellt und 1 Min. bei 1000 U/Min. in einer Untertischzentrifuge der restliche Überstand abzentrifugiert und verworfen. Das Pellet wurde mit 1 ml Co-Präzipitant überschichtet, 5 Min. auf Eis inkubiert und 10 Min. bei 12000 U/Min. in der UZ zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte Überschichtung des Pellets mit 150 µl Reinstwasser. Nach einem Vortexschritt erfolgte die Zugabe von 6 ml Waschpuffer

sowie 5 µl Waschadditiv. Nach 30 Min. Inkubation bei -20°C, wobei alle 10 Min. gevortext wurde, folgte eine 15 Min. Zentrifugation bei 12000 U/Min. in der UZ, sodass nach Abnahme des Überstandes und dem Trocknen des Pellets, dieses in 150 µl IEF-Puffer resuspendiert wurde und die IEF durchgeführt wurde.

### 3.2.3.11.2 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

125 µl der wie in Abs. 3.2.3.11.1 beschrieben aufgereinigten Proteinproben wurde zwischen die Elektroden des Fokussierungs-*trays* pipettiert, ohne die Bildung von Luftblasen dabei zu verursachen. Es wurde ein 7 cm ReadyStrip IPG Streifen (BioRad, München) pH 3-10NL wiederum so auf die verteilte Flüssigkeit gelegt, sodass keine Luftblasen zwischen Streifen und *tray*-Gehäuse verblieben und der Streifen dann mit 1 ml Mineralöl (BioRad, München) überschichtet. Die Fokussierung wurde in einer Protean IEF Zelle (BioRad, München) durchgeführt unter folgenden Bedingungen (Gorg *et al.*, 2004):

**Tabelle 3.14 Schritte der isoelektrischen Fokussierung**

Fokussierschritt	Endspannung	Spannungsanstieg	Zeit
1	150 V	linear	1 Stunde
2	500 V	linear	1 Stunde
3	1200 V	linear	1 Stunde
4	4000 V	linear	2 Stunde
5	4000 V	linear	15000 V-Stunden
6	1000 V	linear	1 Stunde
7	1000 V	linear	2 Stunde

Hierbei wurde als maximale Stromstärke 50 µA pro IPG-Streifen eingestellt. Nach der IEF wurden die IPG-Streifen in ein Rehydratisierungs-*tray* überführt und bei -80°C gelagert.

### 3.2.3.11.3 Rehydratisierung der IPG-Streifen

Die eingefrorenen IPG-Streifen wurden aufgetaut. Zur Rehydratisierung der IPG-Streifen wurden diese dann in je 1,5 ml Äquilibriumspuffer mit 2% w/v DTT für 15 Min. auf einem Orbitalschwenker inkubiert. Es folgte eine Inkubation für weitere 15 Min. in je 1,5

ml Äquilibriumspuffer mit 2,5% w/v Iodacetamid in einer neuen *tray*-Vertiefung. Die Auftrennung der Proteine in die 2te Dimension wurde mit 4-12% Bis-Tris ZOOM Gradientengelen (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Hierfür wurde im Vorfeld nach Entfernung des Gelkamms Gelreste mit einem Spatel entfernt, die Tasche für den IPG-Streifen 1-mal mit 1x MOPS-Puffer sowie 1-mal mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit 3MM-Papier die Flüssigkeit entfernt. Die rehydratisierten IPG-Streifen wurden einmal in 1x MOPS-Puffer getaucht, 400 µl aufgekochte 0,5% Agarose in 1x SDS-Laufpuffer mit Bromphenolblau in die Geltasche pipettiert und der IPG-Streifen mit einem Spatel in die Tasche geschoben, sodass keine Luftblasen zwischen dem Polyacrylamidgel und dem IPG-Streifen verblieben. Nach Aushärten der Agarose wurde die SDS-PAGE wie in Abs. 3.2.3.4 beschrieben durchgeführt bei 150 V für 80 Min.

### **3.2.4 Massenspektrometrische Analysen zur Identifizierung von Proteinen aus SDS-PAGE Gelen nach tryptischem Verdau**

#### **3.2.4.1 Trypsin-Verdau ausgeschnittener Proteine**

Zur massenspektrometrischen Analyse vorgesehene Proben wurde entweder mittels SDS-PAGE (siehe Abs. 3.2.3.4) oder 2D-Gelelektrophorese (siehe Abs. 3.2.3.11) getrennt und das Proteinmuster durch Färbung mit Silber- (siehe Abs.3.2.3.10.1) oder Sypro-Ruby-Färbung (siehe Abs.3.2.3.10.2) visualisiert. Banden oder Spots von Interesse wurden ausgeschnitten und entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Untersuchung bei 4°C gelagert. Der Trypsinverdau wurde nach geeigneter Entfärbung wie von Albrecht und Kollegen beschrieben durchgeführt (Albrecht *et al.*, 2008). Hiervon abweichend wurden die Peptide mit 25mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> +10% ACN eluiert und der Verdau durch Zugabe von 5% Ameisensäure gestoppt.

#### **3.2.4.2 Chromatographie und Massenspektrometrie**

Die tryptischen Peptide wurden chromatographisch auf einer nano-Acquity UPLC (Waters, Milford, USA) unter Verwendung einer Vorsäule (5 µm Symmetry 180 µm x 20 mm c18 pre-column, Waters) und einer analytischen Säule (1.7µm BEH 130 100µm x 100mm c18 separation column; Waters, Milford, USA) bei einer Flussrate von 500 nl und einem



Gradienten von 30 Minuten (3% ACN - 40% ACN) getrennt. Die UPLC war über ein nano ESI Interface online gekoppelt an ein Synapt Quadrupol Time of Flight Massenspektrometer (Waters, Milford, USA). Die Aufzeichnung der Massenspektren erfolgte im MS<sup>E</sup> Modus.

### **3.2.4.3 Datenauswertung**

Die massenspektrometrischen Daten wurden mit ProteinLynx Global Server Version 2.3 prozessiert und mit einer nicht Speziesbeschränkten Datenbank (UniProt) abgeglichen. Datenbanktreffer wurden bis zu einer Falsch-Positivrate von max. 4% akzeptiert. Der mittlere Fehler für Peptidmassen war max. 5 ppm der mittlere Massenfehler für Peptidfragmente max. 10 ppm.

### **3.2.5 Hefe-2-Hybrid-Analysen**

Die Sequenz von K1L und C7L wurde auf Hefe-Codons optimiert und in den „Köder“-Vektor pGBT9 kloniert (Geneart, Regensburg), sodass K1 und C7 als Fusionsproteine mit Gal4-BD und unter Kontrolle des Hefe ADH1-Promotors exprimiert werden. Die Hefe-2-Hybrid-Analysen wurden mit zwei unterschiedlichen „Beute“-cDNA-Bibliotheken durchgeführt (DKFZ, Heidelberg), deren Sequenzen an GAL4-AD fusioniert sind (Albers *et al.*, 2005). Eine Bibliothek enthielt humane cDNAs (Clontech, Kat.-Nr. 638834; Humane Niere; Vereinigt aus 8 männlichen/weiblichen kaukasischen Individuen; Alter zwischen 24-55) und eine murine Bibliothek, abstammend von 11 Tage alten Embryos (Clontech, Kat.-Nr. 638850; Swiss Webster/NIH Mäuse).

### **3.2.6 Virologische Methoden**

#### **3.2.6.1 Virusinfektion**

Zur Infektion von Zellen wurde das Medium gegen das jeweilige Infektionsmedium ausgetauscht (siehe 3.1.6) und mit der gewünschten *moi* infiziert. Die Virussuspension wurde nach dem Auftauen 3-mal für 1 Min. mit Ultraschall behandelt und dazwischen

gründlich gevortext, um die Viren zu vereinzeln. Die Inkubationszeit richtete sich nach dem jeweiligen Versuchsansatz.

### 3.2.6.2 Herstellung rekombinanter MVA-Viren

Zur Herstellung von rekombinantem MVA wurde MVAII<sub>new</sub> als Ausgangsvirus gewählt, bei dem die in MVA F6 enthaltene K1L-Restsequenz entfernt wurde (Staib *et al.*, 2003). Diese Restsequenz von K1L kann zu unerwünschten Rekombinationsereignissen mit dem in der Insertionskassette mit enthaltenem K1L-Gen führen. Die Insertionskassette wird von der Sequenz eingerahmt, die sich stromabwärts und -aufwärts von der Deletion III in MVAII<sub>new</sub> befinden (auch als *flanks* bezeichnet). Über diese homologen Sequenzen wird die homologe Rekombination ermöglicht, durch welche die Insertionskassette in das MVAII<sub>new</sub>-Genom integriert werden soll. In der Insertionskassette befindet sich neben dem zu integrierenden Gen auch das *host-range*-Gen K1L, welches den Wirtstropismus von MVA auf RK-13-Zellen erweitert (Sutter *et al.*, 1994), wodurch die Selektion von rekombinanten MVAII<sub>new</sub> in diesen Zellen ermöglicht wird. Somit wurden die rekombinanten Viren erst so lange auf RK-13-Zellen selektioniert bis der Wildtyp-MVAII<sub>new</sub> nicht mehr nachweisbar war. Daraufhin wurden die rekombinanten Viren weiter in CEF solange passagiert, bis das K1L-Gen wieder durch die umgebenden repetitiven Sequenzen verloren geht.

#### 3.2.6.2.1 Transfektion und Infektion

Ein Loch einer 6-Loch-Platte mit  $1 \times 10^5$  BHK-21-Zellen wurde mit MVAII<sub>new</sub> oder MVA $\Delta$ C7L (für die Generierung von MVA-C7L-V5) mit einer *moi* von 0,05 infiziert. Nach 90 Min. Inkubation im Brutschrank wurde den Zellen das Insertions- oder Deletions-Plasmid transfiziert (siehe Abs.3.2.1.4). Daraufhin schloss sich eine 48-stündige Inkubation im Brutschrank an. Die Zellen wurden 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut, um sie aufzuschließen und mit dem Überstand geerntet. Diese Suspension enthält die Viren.

### 3.2.6.2.2 Blindpassage

Daraufhin wurde eine Blindpassage in RK-13-Zellen durchgeführt. Dies bedeutet, dass zur Amplifikation 100 µl der geernteten Virussuspension in ein Loch einer konfluenten 12-Loch-Platte mit RK-13-Zellen gegeben wurde, ohne die Viren zu vereinzeln. Nach ca. 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen samt Überstand 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut. Die weitere Passagierung und Selektionierung ist in Abs.3.2.6.2.3 beschrieben.

### 3.2.6.2.3 Passagierung und Selektionierung der Virusklone

Zur Selektion der Virusklone wurden zwei Methoden angewandt. Beide hatten zum Ziel, Plaques im Zellrasen entstehen zu lassen, die aus jeweils einem Viruspartikel hervorgegangen sind und diese räumlich voneinander abzugrenzen, um eine Durchmischung der aus verschiedenen Klonen hervorgegangenen Viruspartikel zu verhindern. Bei der einen Methode („96-Loch-Methode“) wurde dieses Ziel erreicht, indem die jeweils die Virussuspension eines Klons der vorangegangenen Passage in ein Loch einer konfluenten 96-Loch-Platte gegeben wurde und fortlaufend von  $10^{-1}$  bis  $10^{-12}$  verdünnt wurde. Somit war die Wahrscheinlichkeit sehr groß, sobald nach 3-5 Tagen Plaques zu sehen waren, von jedem Klon ein Loch zu finden, in dem nur ein Plaque war. Von diesem Loch wurde jeweils der Überstand geerntet. Diesen fortlaufenden Zyklus von Vereinzeln der Klone und Wiederaufnahmen einzelner neuer Klone nennt man Passage.

Bei der anderen Methode wurden konfluente 6- oder 12-Loch-Platten infiziert, wobei jeder Klon nur 3- bis 6-mal fortlaufend 1:10 verdünnt wurde. 2-4 h p.i. (engl.: *hours post infection*; Stunden nach der Infektion) wurde dann das Medium abgenommen und 2-fach-MEM-Medium 1:1 gemischt mit 2%iger, steriler *low-melting-point* Agarose (Invitrogen, Karlsruhe), die vorher aufgekocht und wieder auf 37°C abgekühlt wurde, auf die Zellen gegeben (*agaroverlay*). Nach ca. 15-20 Min. Abkühlen bei RT war der *Agaroverlay* fest geworden, wonach die Zellkulturplatten im Brutschrank für ca. 3 Tage inkubiert wurden. Nach dieser Zeit waren im Zellrasen Plaques zu sehen, wobei durch den *Agaroverlay* eine Verbreitung der einzelnen Virusklone über den einzelnen Plaque hinaus verhindert wurde. Unter Zuhilfenahme eines Mikroskops wurden die Plaques mit einem Stift an der Zellkulturplatte eingekreist, danach mit einer Kolbenhubpipette an dieser Stelle 100 µl aufgesogen und in 300 µl Infektionsmedium resuspendiert.

Zwischen den Passagen wurden bei beiden Methoden die Virussuspensionen 3-mal eingefroren und wieder aufgetaut, 3-mal für 1 Min. mit Ultraschall behandelt und dazwischen gründlich gevortext.

#### **3.2.6.2.4 Überprüfung der Virusklone**

Die Überprüfung der Virusklone auf Wildtyp- bzw. später auf K1L-Verlust erfolgte mittels PCR (siehe Abs. 3.2.2.12.1) durchschnittlich alle zwei Passagen. Vor der Überprüfung wurde eine Amplifikationspassage durchgeführt, indem die Klone jeweils auf ein Loch einer 12-Loch-Platte CEF gegeben wurden und ca. 72 Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Alternativ wurden die Klone direkt nach der Aufnahme überprüft, wie in Abs.3.2.2.11.3 und Abs.3.2.2.12.3 beschrieben.

#### **3.2.6.2.5 Amplifikation und Sucrosegradienten-Aufreinigung des fertigen, rekombinanten Virusklons**

Nach erfolgreicher Selektionierung wurde ein Virusklon fortlaufend in CEF amplifiziert (oder in RK-13-Zellen im Falle von MVA-F11L-K1L), bis 60 konfluente T175-Zellkulturflaschen CEF durchinfiziert waren. Daraufhin wurden die Zellen einmal eingefroren und wieder aufgetaut, wobei mit der angetauten Eisschicht die restlichen noch adhärierenden Zellen abgekratzt wurden. Um die Viruspartikel aufzureinigen, wurden diese zunächst zusammen mit den Zellen und Zelltrümmern in einer Ultrazentrifuge (UZ) bei 16000 U/Min für 90 Min. bei 4°C pelletiert. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und die Pellets in jeweils ca. 5 ml 10 mM Tris aufgenommen und gemischt. Es folgte ein 3-maliges Einfrieren und wieder Auftauen, um die restlichen Zellen aufzuschließen. Die Suspension wurde dann 8-mal 30 Sek. mit einer sterilisierten Ultraschallnadel beschallt (25 % Intensität) und schließlich auf vier UZ-Röhrchen mit je 16 ml 37%ige Sucroselösung verteilt. Es folgte die nochmalige Pelletierung bei 13500 U/Min für 80 Min. bei 4°C, wobei durch die Sucroselösung die Viruspartikel weitgehend von den Zelltrümmern aufgetrennt wurden. Nach Abnahme des Überstands wurden die Pellets in einer möglichst geringen Menge (ca. 1-2 ml) 10 mM Tris resuspendiert, um eine möglichst hohe Viruskonzentration zu erhalten. Die Viruskonzentration in pfu/ml (engl.: *plaqueforming units*/ml; Plaquebildende

Einheiten/ml) wurde dann per Virustitration und anschließender Immunfärbung (siehe Abs. 3.2.6.3) bestimmt. Die Virussuspension wurde schließlich bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 3.2.6.3 Virustitration und Immunfärbung der infizierten Zellen

Zur Bestimmung der Viruskonzentration in pfu/ml eines aufgereinigten Virus (siehe Abs. 3.2.6.2.5) oder eines Zeitpunktes einer Wachstumskurve (siehe Abs. 3.2.6.4), wurden CEF in 6-Loch-Zellkulturplatten infiziert mit 10-fach Verdünnungsreihen der Virussuspension, wobei je 10-facher Verdünnung zwei Löcher infiziert wurden zur Doppelbestimmung. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, worauf eine weitere Inkubation im Brutschrank für 48 Stunden folgte.

Um die zwischenzeitlich entstandenen Plaques anzufärben, wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen fixiert und permeabilisiert, indem je Loch 1 ml eines eiskalten 1:1 Gemisch Aceton/Methanol für 5 Min. auf die Zellen gegeben wurde bei RT. Nach Abnahme des Aceton/Methanol-Gemisches wurden die Zellen kurz luftgetrocknet und dann je Loch 1 ml 3 % FCS in PBS zum Blockieren für 30 Min bis ÜN bei  $4^{\circ}\text{C}$  auf die Zellen gegeben. Es folgte die Zugabe einer 1:2500 Verdünnung eines  $\alpha$ -VACV-Antikörpers (Acris, Hiddenhausen) und die anschließende Inkubation für 2-3 Stunden bei RT auf einem Schüttler. Nach einem Waschschrift mit PBS folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (1:2000 verdünnt), welcher eine Peroxidasekopplung aufwies und die Inkubation für 45 Min. bei RT auf einem Schüttler.

Zwischenzeitlich wurde das Substrat für die Peroxidase hergestellt, indem eine Spatelspitze o-Dianisidin (Invitrogen, Karlsruhe) in 100%igen Ethanol gelöst wurde, sodass eine gesättigte Lösung entstand. Nach 5 Min. Zentrifugation der Lösung bei 1500 U/Min und RT wurde der Überstand durch einen  $0,45\ \mu\text{m}$  Filter filtriert. Es wurden dann zu je 10 ml PBS, 200  $\mu\text{l}$  der hergestellten o-Dianisidin-Lösung gegeben und jeweils 20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (Carl Roth, Karlsruhe). Von dieser Substratlösung wurde nach einem weiteren Waschschrift der Zellen in PBS jeweils 0,5 ml je Loch auf die Zellen gegeben. Nach ca. 20 Min. Inkubation auf dem Schüttler bei RT wurden die Plaques sichtbar durch die Oxidation von o-Dianisidin. Die Plaques wurden ausgezählt, wobei die Verdünnung gewählt wurde, bei der ca. 20-100 Plaques zu sehen waren. Anschließend wurde der Mittelwert zwischen den beiden ausgezählten Löchern der gleichen Verdünnung gebildet.

### **3.2.6.4 Virale Mehrstufen-Wachstumsanalysen**

Um das Wachstum der verschiedenen Viren auf Zelllinien zu testen, wurden 6-Loch-Platten mit den jeweiligen Zellen angelegt und mit dem jeweiligen Virus mit einer niedrigen *moi* von 0,05 infiziert. Nach 2 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde 3-mal das Medium gewechselt um alle Viruspartikel, die nicht eine Zelle penetriert hatten, wegzuwaschen. Daraufhin wurde je 1 Loch der Zellen mit Überstand nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden geerntet. Durch die niedrige *moi* wurden zunächst nur wenige Zellen infiziert. Dadurch wurde im Laufe der Zeit, im Falle eines zur Replikation befähigten Virus, die zunächst nicht infizierten Zellen erst durch neu gebildete Viruspartikel infiziert, wodurch auch die Effizienz der Virusverbreitung mit in das Ergebnis einfließt. Deshalb spricht man von einer „Mehrstufen“-Wachstumskurve.

### **3.2.6.5 Wundheilungs-*assay***

Konfluente BS-C-1-Zellen in 6-Loch-Platten wurden 2 Stunden mit Medium ohne FCS inkubiert und daraufhin mit VACV mit einer *moi* von 10 infiziert. Nach Adhäsion der Viren für 1 Stunde wurden mehrere „Wunden“ mit einer Pipettenspitze in den Zellrasen geritzt und die Zellen drei Mal mit Infektionsmedium gewaschen. An markierten Stellen wurden die Wunden 0 und 24 h p.i. Fotografiert (DX40 Kamera, Kappa, Gleichen) mit einem Phasenkontrastmikroskop (Axiovert 40 CLT, Carl Zeiss, Göttingen) bei 100-facher Vergrößerung. Es wurden die Zellen ausgezählt, die in die Wunden eingewandert waren.

### **3.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchung der Virionenmorphologie**

Um die Morphologie der von MVA-F11L gebildeten Viruspartikel in HeLa-Zellen untersuchen zu können, wurden die Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, sodass diese konfluent waren. Anschließend wurden die Zellen mit dem jeweiligen Virus mit einer *moi* von 5 infiziert und nach einer Stunde Inkubation im Brutschrank ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen fixiert durch Zugabe von Glutaraldehyd zum Medium, sodass eine Endkonzentration von 2,5 % Glutaraldehyd erreicht wurde. Nach 45 Min. Inkubation bei 37°C wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen, abgeschabt und für 5 Min. pelletiert bei 1500 U/Min

Die sich anschließende Prozedur der Agaroseeinbettung, Nachfixierung und Eponetinbettung wurde durchgeführt, wie bei (Griffiths and G., 1993) beschrieben. Nach Anfertigung der Ultradünnschnitte wurden diese auf Objektträgernetzchen (*grids*) aufgebracht.

Die Negativkontrastierung wurde mit 2% Uranylacetat in Ethanol und einer Bleicitratlösung durchgeführt. Zuerst wurden die *grids* in H<sub>2</sub>O gewaschen und dann für 7 Min. in der Uranylacetatlösung bei RT im Dunkeln inkubiert. Daraufhin folgten 3 Waschschrirte in H<sub>2</sub>O und die Inkubation in der Bleiacetatlösung für 2 Min. bei RT. Nach nochmaligem gründlichem Waschen konnten die *grids* in das Elektronenmikroskop eingeschleust und betrachtet werden. Die Bilder wurden mit der Slow-scan CCD-Camera for TEM (TRS) gemacht und mit der Software Image SP (TRS) bzw. Adope Photoshop Ver.8 bearbeitet.

## 4 Ergebnisse

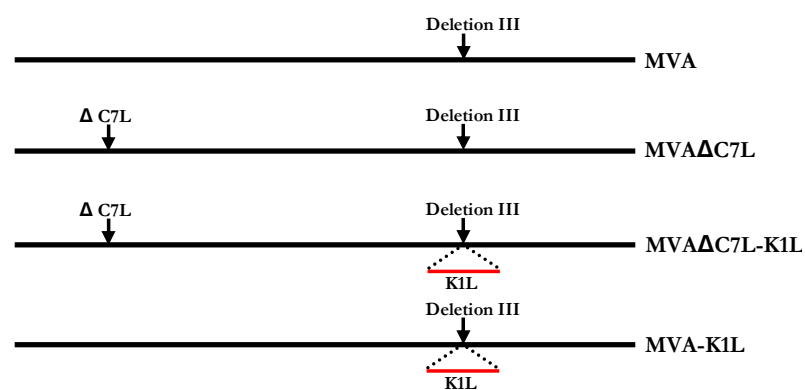
### 4.1 Analyse der Genexpression der verwendeten rekombinanten MVA-Viren

Um die Funktion von K1L und C7L zu untersuchen, lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits rekombinante MVA vor, welche die Gene K1L bzw. C7L enthielten oder nicht enthielten. Im Wildtyp-Virus MVA ist die Sequenz von C7L intakt, wohingegen die K1L-Sequenz fragmentiert ist. Das C7L-Gen wurde aus MVA deletiert und das resultierende Virus  $MVA\Delta C7L$  genannt. In dieses Virus sowie in MVA wurde die Sequenz von K1L aus dem VACV-Stamm Western Reserve (WR) in die natürliche Deletion III inseriert, sodass  $MVA\Delta C7L$ -K1L und MVA-K1L generiert wurden.

**Tabelle 4.1 Präsenz von K1L und C7L in den rekombinanten MVA**

Virus	K1L	C7L
MVA	-	+
$MVA\Delta C7L$	-	-
$MVA\Delta C7L$ -K1L	+	-
MVA-K1L	+	+

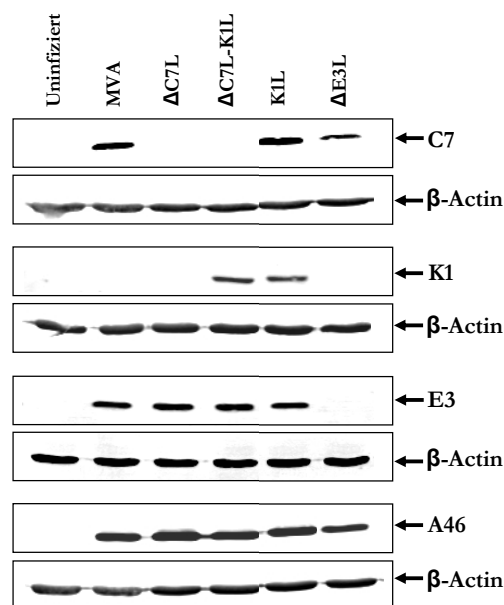
Die genaue Beschreibung der Viren ist veröffentlicht (Backes *et al.*, 2010). Zusätzlich gibt Tabelle 4.1 und Abb. 4.1 einen Überblick über die Präsenz von K1L oder C7L in den unterschiedlichen rekombinanten MVA.



**Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Genoms der rekombinanten MVA.** Bei den entsprechenden Viren wurde das C7L-Gen deletiert bzw. das K1L-Gen in die natürliche Deletion III inseriert. Genaue Erläuterungen sind dem Text zu entnehmen.



Um die Expression von K1 und C7 durch die unterschiedlichen rekombinanten MVA zu überprüfen, wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Abb. 4.2 zeigt das Vorhandensein oder Fehlen des K1- und C7-Proteins nach Infektion von BHK-21-Zellen für 4 Stunden mit den unterschiedlichen Viren mit einer *moi* (engl.: *multiplicity of infection*; infektiöse Viruspartikel pro Zelle) von 5. Weiterhin wurde als Vertreter früher viraler Proteine auch E3 detektiert sowie das früh und spät exprimierte A46. Die Deletionsmutante MVA $\Delta$ E3L wurde zusätzlich analysiert, da sie in folgenden Studien als Kontrolle verwendet wurde (Hornemann *et al.*, 2003). Abb. 4.2 zeigt, dass C7 bei MVA $\Delta$ C7L- und MVA $\Delta$ C7L-K1L-Infektion nicht exprimiert wurde. Dagegen war eine K1-Expression in MVA $\Delta$ C7L-K1L- und MVA-K1L-infizierten Zellen zu beobachten. Das E3-Protein war mit Ausnahme von MVA $\Delta$ E3L-infizierten Zellen nachweisbar. Das A46-Protein diente als Infektionskontrolle, da es von allen Viren kodiert wird, und war bei allen Infektionen zu detektieren.



**Abb. 4.2 Western Blot-Analyse der Expression der viralen Proteine C7, K1 und E3.** BHK-21-Zellen wurden mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L), MVA-K1L (K1L) oder MVA $\Delta$ E3L ( $\Delta$ E3L) mit einer *moi* von 5 infiziert und 4 Stunden nach Infektion (h p.i.) wurden Zellysate hergestellt. Die Proteine wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Antikörper spezifisch gegen K1, C7, E3, A46 und  $\beta$ -Aktin dienten zur Detektion.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert, die Detektion des frühen viralen Proteins A46 diente als Infektionskontrolle.

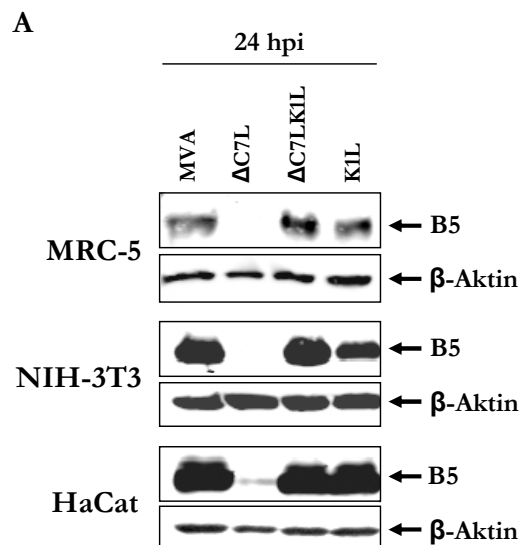
Es ist bereits veröffentlicht, dass der Replikationszyklus einer VACV-Mutante, welcher das K1L- und C7L-Gen fehlt, nach der intermediären Transkription in humanen HeLa-Zellen unterbrochen ist (Hsiao *et al.*, 2004). Eine Charakterisierung des Lebenszyklus der rekombinanten MVA ergab, dass die intermediäre und späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L in vielen humanen und murinen Zellen ebenfalls inhibiert wird, wohingegen

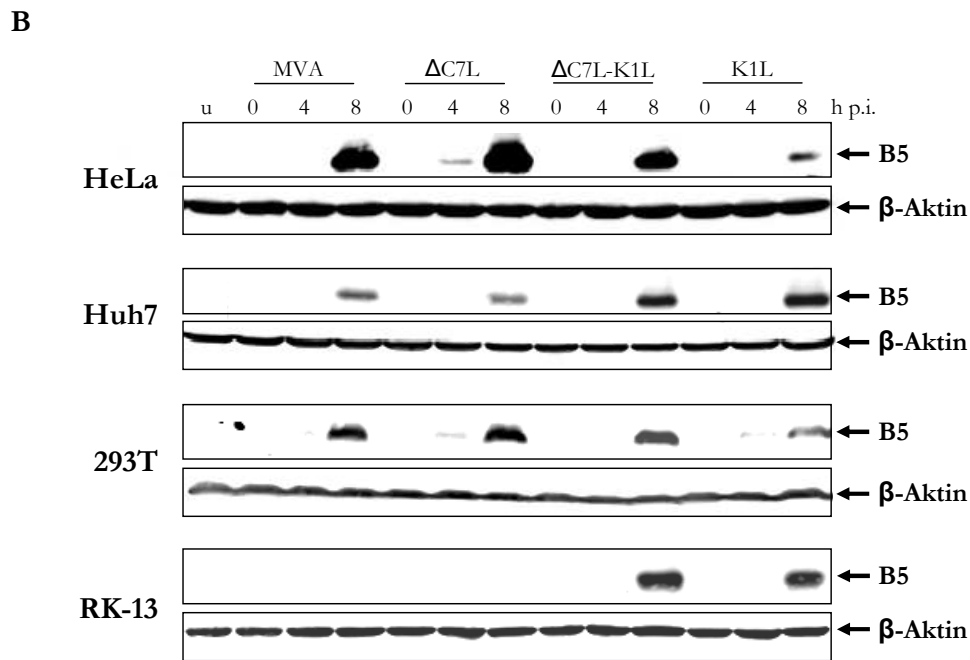
MVA-Wildtyp oder MVA $\Delta$ C7L-K1L in der Lage sind, alle Genklassen zu exprimieren (Backes *et al.*, 2010). Tabelle 4.2 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Zellen hinsichtlich der Expression des späten viralen Proteins B5 während der Infektion mit den angegebenen Viren.

**Tabelle 4.2 Übersicht über die untersuchten Zelllinien hinsichtlich der viralen späten Expression des viralen Faktors B5.**

Zellen		Viren			
Spezies	Bezeichnung	MVA	MVA $\Delta$ C7L	MVA $\Delta$ C7L-K1L	MVA-K1L
human	HeLa	+	+	+	+
	MRC-5	+	-	+	+
	HaCat	+	-	+	+
	293T	+	+	+	+
	Huh7	+	+	+	+
murin	NIH-3T3	+	-	+	+
	murine embryonische Fibroblasten	+	-	+	+
kaninchen	RK-13	-	-	+	+

Die Daten wurden per Western Blot-Analyse generiert (siehe Abb. 4.3 und Abb. 4.9 für MEF). Hierfür wurden die unterschiedlichen Zelllinien mit den rekombinanten Viren bei einer *moi* von 5 infiziert. 0, 4, 8 oder 24 Stunden nach Infektion (engl.: *hours post infection*, h p.i.) wurden Zellysate hergestellt und das späte virale Protein B5 wurde detektiert.





**Abb. 4.3 Western Blot-Analyse der späten B5 Expression.** MRC-5-, NIH-3T3-, HaCat- (A), HeLa-, Huh7-, 293T- und RK-13-Zellen (B) wurden mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L) oder MVA-K1L (K1L) mit einer moi von 5 infiziert. Proteinlysate, hergestellt 0, 4, 8 (B) oder 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) (A), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper untersucht, der spezifisch gegen B5 bzw.  $\beta$ -Aktin (als Ladekontrolle) gerichtet ist. Uninfizierte Zellen (u) dienen als Kontrolle (B).

In MRC-5-, NIH-3T3-, MEF, HaCat- und RK-13-Zellen wird im Gegensatz zu den anderen Viren nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion kein B5 exprimiert. Eine Ausnahme hiervon bildeten RK-13-Zellen, in welchen nach MVA-Infektion auch kein B5 synthetisiert wurde. Dagegen war B5 in MVA $\Delta$ C7L-infizierten HeLa-, Huh7- und 293T-Zellen nachweisbar.

Dies bedeutet, dass C7 notwendig ist, um die späte Genexpression nach MVA-Infektion in einigen Zelllinien zu ermöglichen. Weiterhin zeigt dies, dass K1 diese Funktion von C7 komplementieren kann, da in allen MVA $\Delta$ C7L-K1L-infizierten Zellen B5 zu detektieren war. RK-13-Zellen stellen gegenüber den anderen Zelllinien eine Besonderheit dar, da hier nur K1 die späte Genexpression ermöglichte.

## 4.2 Untersuchungen zur MVA-induzierten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung

Eine mögliche Erklärung für die Inhibierung der späten Genexpression in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen könnte die Phosphorylierung des Translationsinitiations-Faktor 2 $\alpha$  (engl.: *eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$* , eIF2 $\alpha$ ) darstellen. Dieser Prozess ist eine wichtige Antwort der Zelle auf unterschiedliche Stressstimuli, wie beispielsweise virale

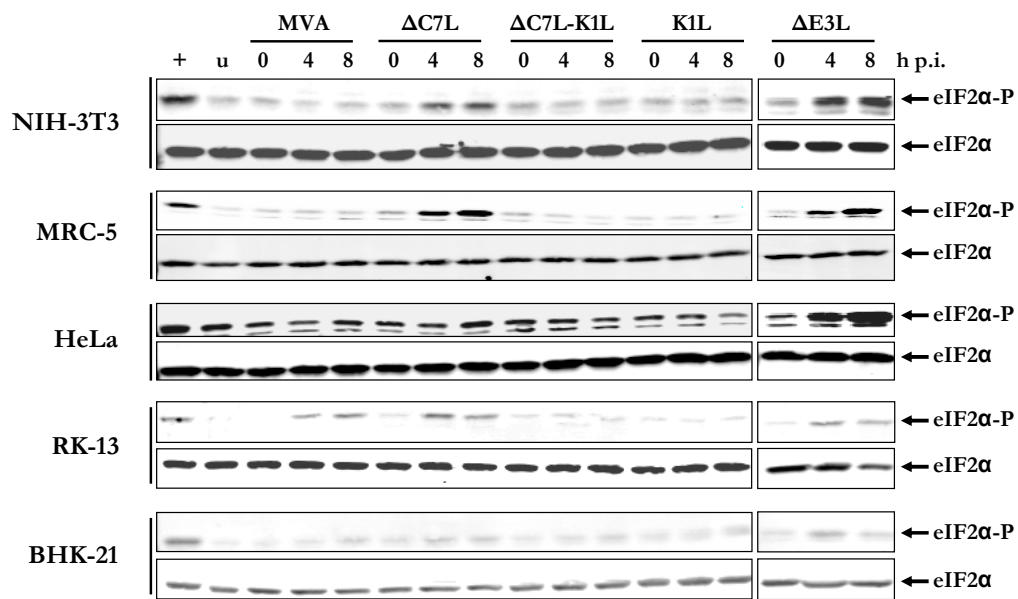
Infektionen (Clemens, 2001). In der Folge der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wird die zelluläre Translation abgeschaltet, was die Translation viraler mRNAs mit einschließt. In früheren Studien wurde eine Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  nach der Infektion mit sowohl einer Deletionsmutante von VACV WR, als auch VACV NYVAC (ein attenuierter VACV-Stamm), bei welchen K1L und C7L deletiert sind, im Gegensatz zu den entsprechenden Wildtyp-Viren beobachtet (Hsiao *et al.*, 2004; Najera *et al.*, 2006). Aus diesem Grund wurde die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung mit den K1L/C7L-deletierten MVA-Viren ebenfalls untersucht.

#### 4.2.1 K1 und C7 inhibieren die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung

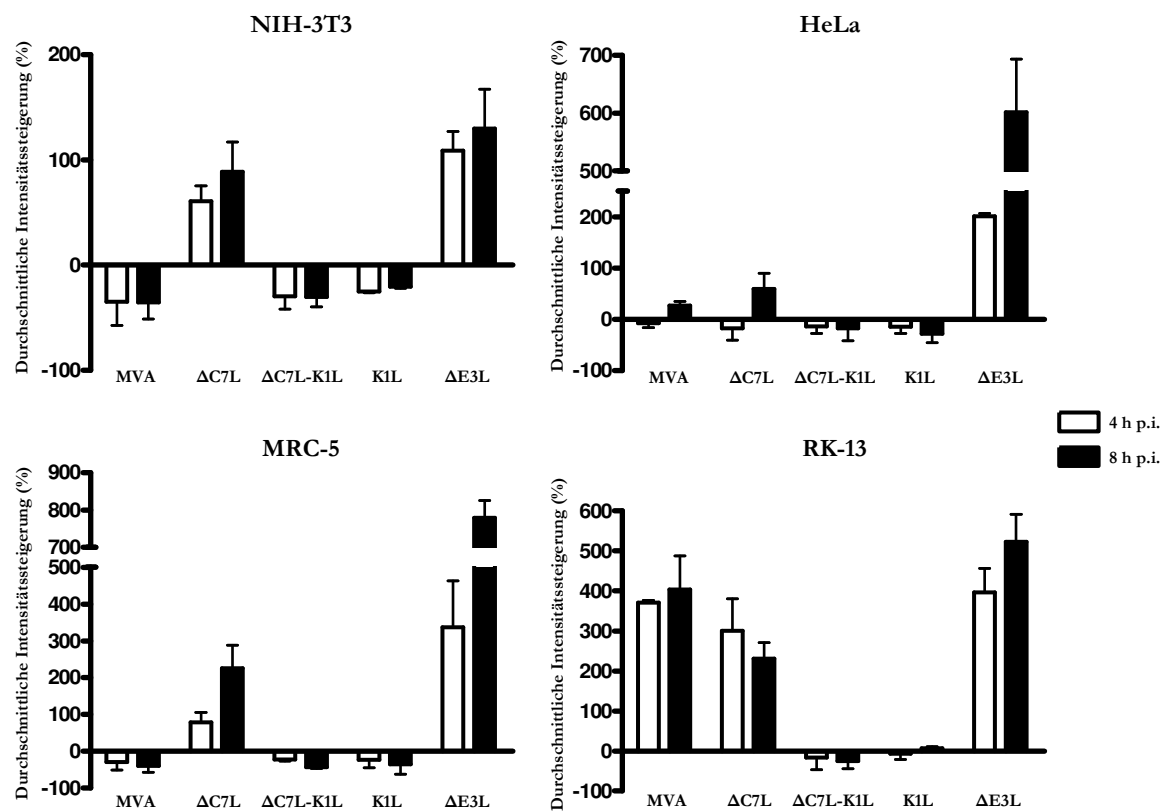
Humane HeLa- und MRC-5- sowie murine NIH-3T3-, Kaninchen RK-13- und Hamster BHK-21-Zellen wurden mit MVA, MVA $\Delta$ C7L, MVA $\Delta$ C7L-K1L oder MVA-K1L mit einer moi von 5 infiziert. 0, 4 und 8 h p.i. wurden Proteinlysate hergestellt und die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wurde mittels Western Blot analysiert. Hierbei wurde MVA $\Delta$ E3L als Kontrolle in die Untersuchung mit einbezogen, da eine eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung nach Infektion mit diesem Virus bereits beschrieben wurde (Ludwig *et al.*, 2006). Weiterhin dienten Zellen, die 1 Stunde mit 1  $\mu$ M Thapsigargin behandelt wurden als Positivkontrolle, da dieses Agens eine eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch die *dsRNA-activated protein kinase-like ER kinase* (PERK) bewirkt (Treiman *et al.*, 1998). Wie in Abb. 4.4 A zu sehen ist, kommt es 4 und 8 h p.i. mit MVA $\Delta$ C7L zu einer Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ , wohingegen bei MVA, MVA $\Delta$ C7L-K1L oder MVA-K1L keine Phosphorylierung zu beobachten war. Eine Ausnahme bilden RK-13 Zellen, bei welchen eIF2 $\alpha$  auch 4 und 8 h p.i. nach MVA-Infektion phosphoryliert wurde. In HeLa-Zellen war bei nicht infizierten Zellen eine generelle eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung vorhanden, die durch die MVA $\Delta$ C7L-Infektion kaum verstärkt wurde. Im Fall der für MVA und MVA $\Delta$ C7L permissiven BHK-21-Zellen (Backes *et al.*, 2010) war dagegen nahezu keine Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  zu beobachten.

Die Durchschnittswerte von den quantifizierten Intensitäten der phosphorylierten eIF2 $\alpha$ -Banden (siehe Abs. 3.2.3.5.3) sind in Relation zum Wert bei 0 h p.i. in Abb. 4.4 B dargestellt. Es ist zu sehen, dass die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung 8 h p.i. in MVA $\Delta$ C7L-infizierten NIH-3T3-Zellen um ca. 100% erhöht war, bei MRC-5-Zellen um 200-250%, bei HeLa-Zellen um ca. 50% und bei RK-13-Zellen um ca. 250%.

A



B



**Abb. 4.4 C7 und K1 inhibieren die eIF2α-Phosphorylierung.** A. Western Blot-Analyse der eIF2α-Phosphorylierung in NIH-3T3-, MRC-5-, HeLa-, RK-13- und BHK-21-Zellen infiziert mit einer moi von 5 mit MVA, MVAΔC7L (ΔC7L), MVAΔC7L-K1L (ΔC7L-K1L), MVA-K1L (K1L) oder MVAΔE3L (ΔE3L). Proteinlysate, hergestellt 0, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für eIF2α und phosphoryliertes eIF2α (eIF2α-P) untersucht. Uninfizierte (u) und mit 1 μM Thapsigargin behandelte Zellen (+) dienen als Kontrolle. B. Durchschnittlicher Anstieg der phosphorylierten eIF2α-Bandenintensität 4 und 8 h p.i. relativ zum jeweiligen Wert bei 0 h p.i. und normalisiert mit der GesamteIF2α-Bandenintensität. Die Durchschnittswerte ± Standardabweichungen von zwei unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt.

Der vergleichbare Anstieg der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung nach MVA-Infektion von RK-13-Zellen deutete an, dass K1L, aber nicht C7L in diesen Zellen eine inhibitorische Rolle spielt. Ansonsten war durch MVA-, MVA $\Delta$ C7L-K1L- oder MVA-K1L-Infektion keine Steigerung der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung zu bemerken bzw. eher eine geringfügige Abnahme. Weiterhin wurde deutlich, dass vor allem in HeLa- und MRC-5-Zellen die durch MVA $\Delta$ E3L-Infektion induzierte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung weitaus stärker ist, als in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen.

Zusammengenommen deuten die Resultate darauf hin, dass eine Korrelation zwischen dem Fehlen der späten Genexpression und der Induktion der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch MVA $\Delta$ C7L-Infektion bestehen könnte (vergleiche Abb. 4.3 mit Abb. 4.4). Bei HeLa-Zellen, in welchen die späte B5-Expression nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion nicht beeinflusst war (siehe Abb. 4.3), war die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung auch nur relativ schwach ausgeprägt.

#### 4.2.2 Die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wird durch die Proteinkinase R (PKR) verursacht

Je nach Stresssignal kann eIF2 $\alpha$  durch eine andere Kinase phosphoryliert werden (siehe Abb. 4.5). Mit Ausnahme des Häm-regulierten Inhibitors (HRI) wurde die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch die Proteinkinase R (PKR), PERK und *general control non-derepressing 2* (GCN2) im Zusammenhang mit viralen Infektionen beobachtet (Berlanga *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007; Jordan *et al.*, 2002).

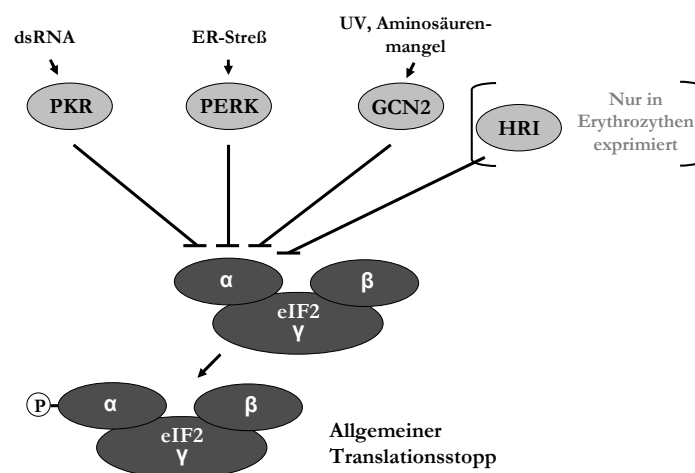
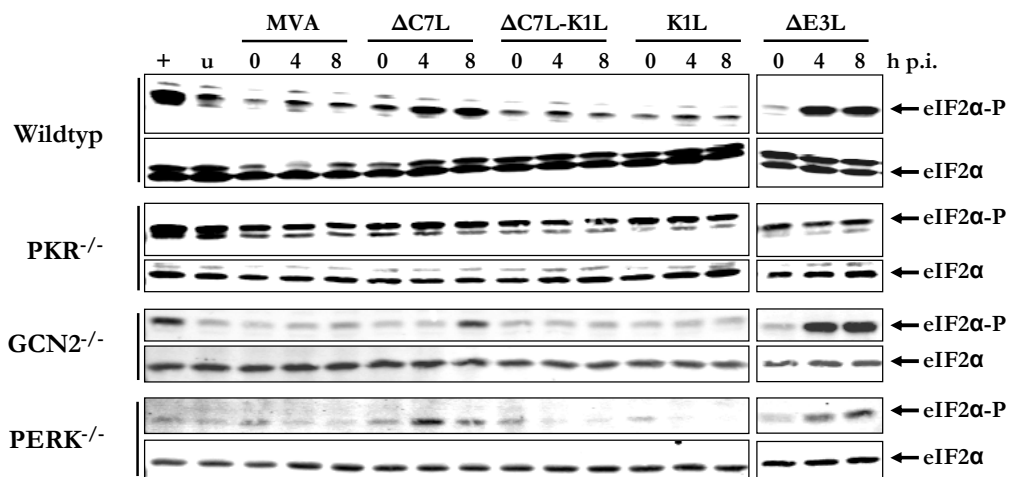


Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Kinasen, die eIF2 $\alpha$  phosphorylieren können, und der Stressstimuli, die zu ihrer Aktivierung führen.

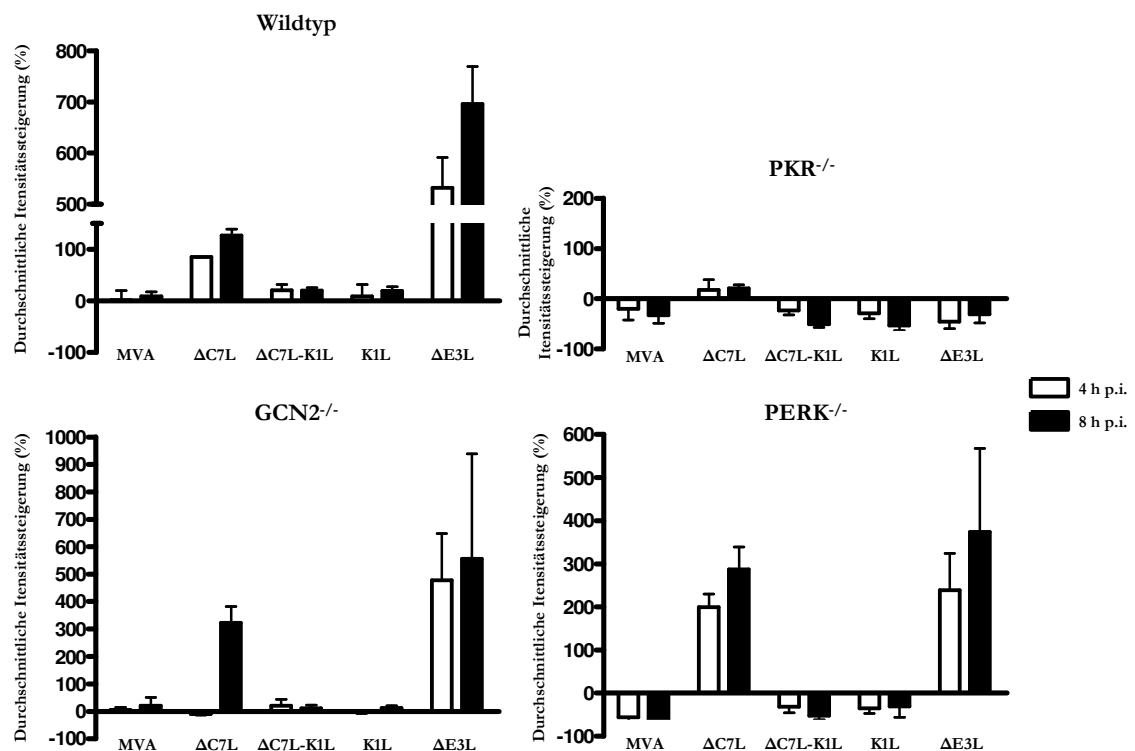
Um zu untersuchen, welche Kinase im Fall der MVA $\Delta$ C7L-Infektion die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung verursacht, wurden murine embryonische Fibroblasten (MEF) untersucht, die aus *knock-out* Mäusen stammen, welchen jeweils das Gen der PKR, PERK oder GCN2 fehlt. Analog zu dem in Abb. 4.4 dargestellten Experiment wurden die Wildtyp-MEF und die MEF mit der jeweiligen fehlenden Kinase mit den unterschiedlichen Viren infiziert. Nach 0, 4 und 8 h p.i. wurden Zellysate hergestellt und die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung wurde mittels Western Blot analysiert (siehe Abb. 4.6 A und B).

In den wildtypischen, den GCN2<sup>-/-</sup>- und PERK<sup>-/-</sup>-MEF war eine eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung 4 bzw. 8 h p.i. nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion zu verzeichnen, wohingegen bei PKR<sup>-/-</sup>-MEF dieser Anstieg der Phosphorylierung ausblieb. Auch bei MVA $\Delta$ E3L-infizierten PKR<sup>-/-</sup>-MEF wurde eIF2 $\alpha$  nicht phosphoryliert, wie es bereits beschrieben wurde (Ludwig *et al.*, 2006). Vergleichbar mit den Untersuchungen mit den NIH-3T3-, MRC-5- und HeLa-Zellen, führte die Infektion mit den übrigen Viren zu keiner eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in den MEF (siehe Abb. 4.4 und Abb. 4.6). Schlussfolgernd zeigen diese Ergebnisse, dass die PKR im Fall der MVA $\Delta$ C7L-Infektion die Kinase zu sein scheint, welche eIF2 $\alpha$  phosphoryliert.

A



B

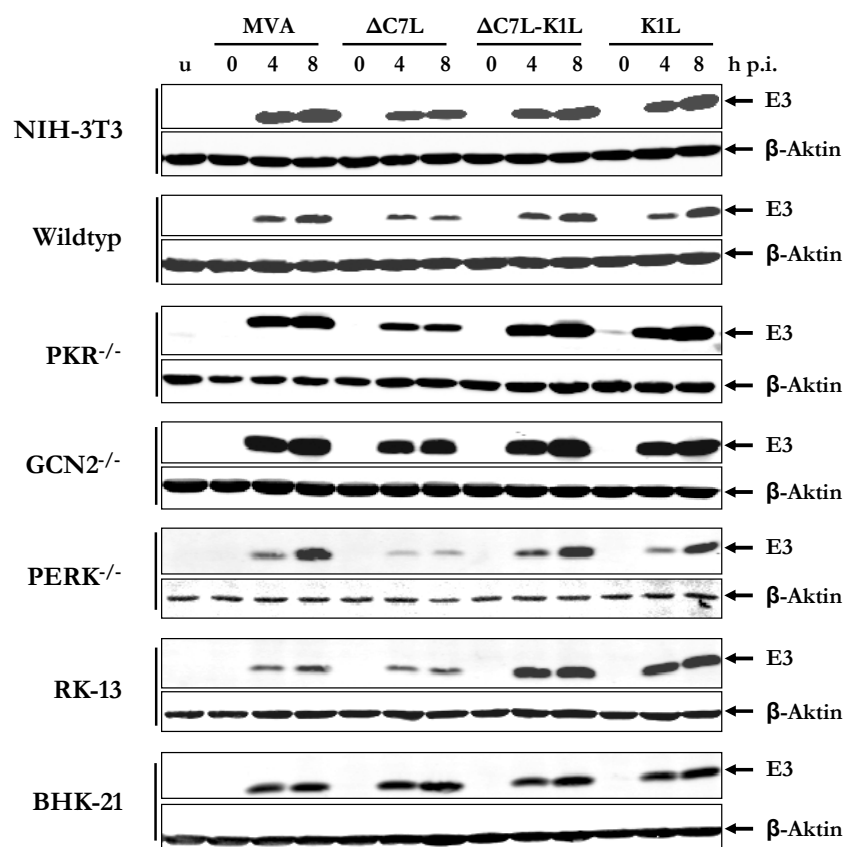


**Abb. 4.6 eIF2 $\alpha$  wird nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion durch die PKR phosphoryliert.** **A.** Western Blot-Analyse der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in Wildtyp-, PKR<sup>-/-</sup>, GCN2<sup>-/-</sup> und PERK<sup>-/-</sup>-MEF infiziert mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L), MVA-K1L (K1L) oder MVA $\Delta$ E3L ( $\Delta$ E3L) mit einer moi von 5. Proteinlysate, hergestellt 0, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für eIF2 $\alpha$  und phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P) untersucht. Uninfizierte (u) und mit 1 $\mu$ M Thapsigargin behandelte Zellen (+) dienten als Kontrolle. **B.** Durchschnittlicher Anstieg der phosphorylierten eIF2 $\alpha$ -Bandenintensität 4 und 8 h p.i. relativ zu 0 h p.i. und normalisiert mit der Gesamt-eIF2 $\alpha$ -Bandenintensität. Die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt.



### 4.2.3 Eine reduzierte E3-Expression in MVA $\Delta$ C7L infizierten Zellen ist nicht verantwortlich für die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch die PKR

Meng und Kollegen konnten 2008 einen Zusammenhang zwischen dem Fehlen von C7L in VACV und einer reduzierten E3L-Expression herstellen (Meng *et al.*, 2008). Das E3-Protein inhibiert die PKR-vermittelte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung (siehe Abs. 2.4.1). Falls bei der MVA $\Delta$ C7L-Infektion auch eine verminderte E3L-Expression stattfinden würde, könnten folglich C7 und K1 indirekt über E3 die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung inhibieren. Um dies zu analysieren, wurde die E3L-Expression der verschiedenen Viren in den unterschiedlichen Zellen per Western Blot-Analyse untersucht. Interessanterweise konnte in allen untersuchten Zelllinien nach Infektion mit MVA $\Delta$ C7L eine reduzierte E3L-Expression festgestellt werden (siehe Abb. 4.7).

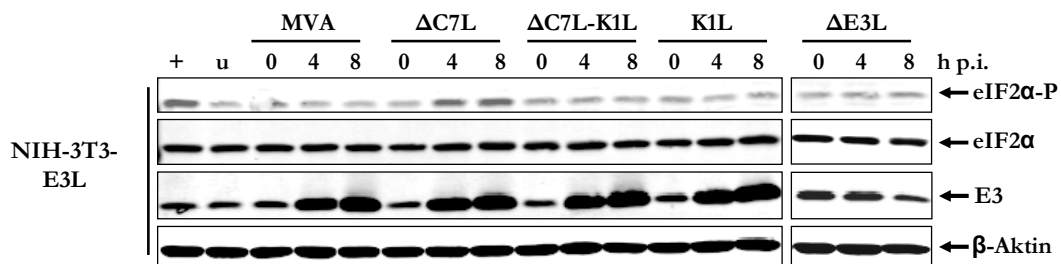


**Abb. 4.7 Die E3L-Expression ist während der MVA $\Delta$ C7L-Infektion reduziert.** Western Blot-Analyse der E3-Expression in NIH-3T3-, MRC-5-, HeLa-, RK-13-, BHK-21-Zellen sowie Wildtyp-, PKR<sup>-/-</sup>-, GCN2<sup>-/-</sup> und PERK<sup>-/-</sup>-MEF infiziert mit einer moi von 5 mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L) oder MVA-K1L (K1L). Proteinlysate, hergestellt 0, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für E3 und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle untersucht.

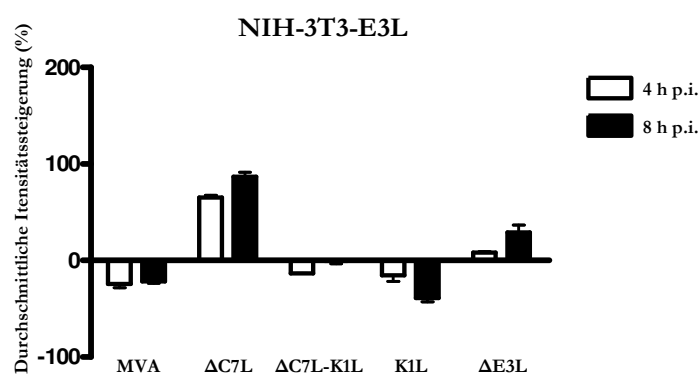
Eine Ausnahme hiervon bilden wiederum RK-13-Zellen, bei welchen allein das Vorhandensein von K1L hierfür wichtig ist. Weiterhin waren in den permissiven BHK-21-Zellen keine Unterschiede des E3L-Expressionslevels nach Infektion mit den unterschiedlichen Viren erkennbar (siehe Abb. 4.7).

Da also die reduzierte E3L-Expression mit den im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Beobachtungen der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung korreliert, wurde die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in NIH-3T3-Zellen untersucht, welche E3L stabil exprimieren (NIH-3T3-E3L; Budt *et al.*, 2009). Damit sollte ein indirekter Effekt von C7 und K1 in Bezug auf die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ausgeschlossen werden. In Abb. 4.8 A ist zu sehen, dass in den NIH-3T3-E3L-Zellen die reduzierte E3-Expression nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion in Relation zu den anderen Viren ausgeglichen war. Jedoch war die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung, welche im Fall von MVA $\Delta$ E3L-infizierten Zellen nicht mehr stattfand, bei MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen immer noch präsent (siehe Abb. 4.8 A und B).

A



B



**Abb. 4.8 Die reduzierte E3L-Expression während der MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist nicht verantwortlich für die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung. A.** Western Blot-Analyse der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in NIH-3T3-Zellen, die stabil E3L exprimieren. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 5 mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L), MVA-K1L (K1L) oder MVA $\Delta$ E3L als Kontrolle infiziert. Proteinlysate, hergestellt 0, 4 und 8 h p.i., wurden mit Antikörpern spezifisch für eIF2 $\alpha$ , phosphoryliertes eIF2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P), E3 und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle untersucht. Uninfizierte (u) und mit 1  $\mu$ M Thapsigargin behandelte Zellen (+) dienen als Kontrolle. **B.** Durchschnittlicher Anstieg der phosphorylierten eIF2 $\alpha$ -Bandenintensität 4 und 8 h p.i. relativ zu den Werten bei 0 h p.i. und normalisiert mit der Gesamt-eIF2 $\alpha$ -Bandenintensität. Die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt.

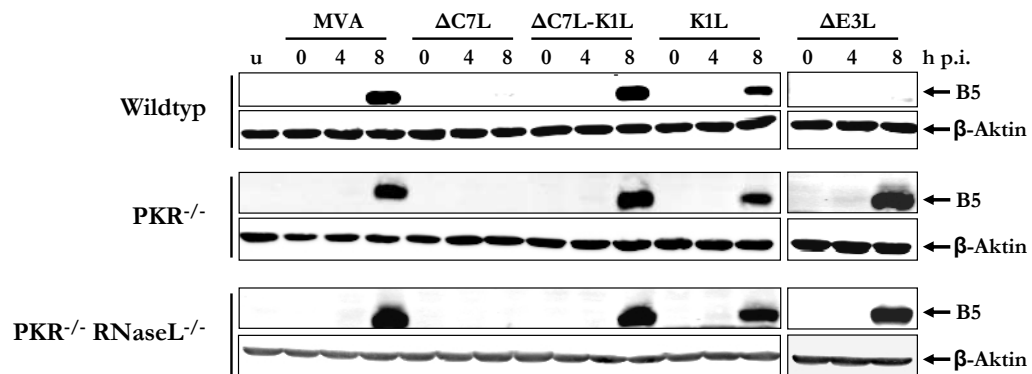
Diese Ergebnisse bedeuten, dass C7 und vermutlich auch K1 die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung nicht indirekt inhibieren, indem sie die Expression von E3 erhöhen. Dem entsprechend muss ein eigenständiger Mechanismus hierfür verantwortlich sein.

#### 4.2.4 Das Fehlen der PKR reicht nicht aus, um die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L wiederherzustellen

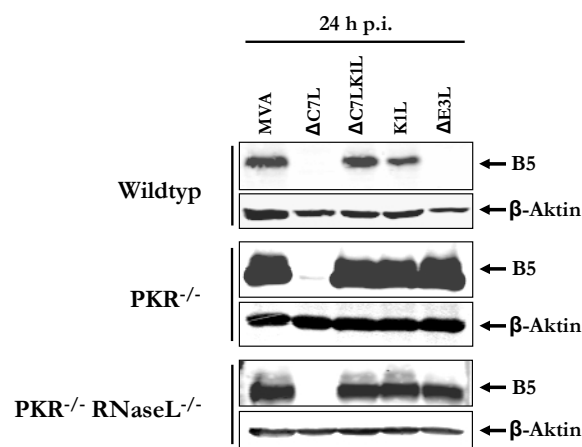
Die vorangegangenen Ergebnisse deuteten stark darauf hin, dass die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung für das unter Abs. 4.1 beschriebene Fehlen der späten Genexpression nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion verantwortlich sein könnte. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden Wildtyp- und PKR<sup>-/-</sup>-MEF mit den unterschiedlichen Viren infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten p.i. erfolgte die Herstellung von Zelllysaten und anschließend wurde mittels Western Blot-Analyse zunächst repräsentativ die Expression des späten viralen Proteins B5 untersucht (siehe Abb. 4.9 A und B). Wider Erwarten war sowohl 8 als auch 24 h p.i. kein B5 in Zell-Lysaten von MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen nachweisbar, wohingegen die B5 Expression von MVA $\Delta$ E3L in PKR<sup>-/-</sup>-MEF wie bereits beschrieben wiederhergestellt wurde (Ludwig *et al.*, 2006). Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen B5-spezifischen Effekt handelt, wurde zudem eine übergreifende Expressionsanalyse mittels radioaktiver Markierung neu synthetisierter Proteine (siehe Abs. 3.2.3.9) durchgeführt. Wildtyp- und PKR<sup>-/-</sup>-MEF wurden mit MVA, MVA $\Delta$ C7L oder MVA $\Delta$ C7L-K1L infiziert, nach verschiedenen Zeitpunkten Lysate radioaktiv markierter Proteine hergestellt und per SDS-PAGE separiert. Proteinbanden, die 5 bzw. 10 h p.i. bei MVA und MVA $\Delta$ C7L-K1L sichtbar waren und somit späte virale Proteine repräsentierten, waren bei MVA $\Delta$ C7L nicht synthetisiert worden (siehe Abb. 4.9 C). Das bestätigt das Fehlen der späten B5-Expression in PKR<sup>-/-</sup>-MEF nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion (Abb. 4.9 A und B).

Als ein weiterer anti-viral wirkender Faktor, der wie auch die PKR durch dsRNA aktiviert wird, könnte die RNaseL die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L inhibieren. Um dieser Möglichkeit nachzugehen erfolgte die Infektion von MEF, die aus Mäusen stammen, welchen sowohl die PKR als auch die RNaseL fehlt (PKR<sup>-/-</sup>-RNaseL<sup>-/-</sup>-MEF). Doch auch in diesen Zellen war nach 8 oder 24 h p.i. mit MVA $\Delta$ C7L kein B5 detektierbar (siehe Abb. 4.9 A und B).

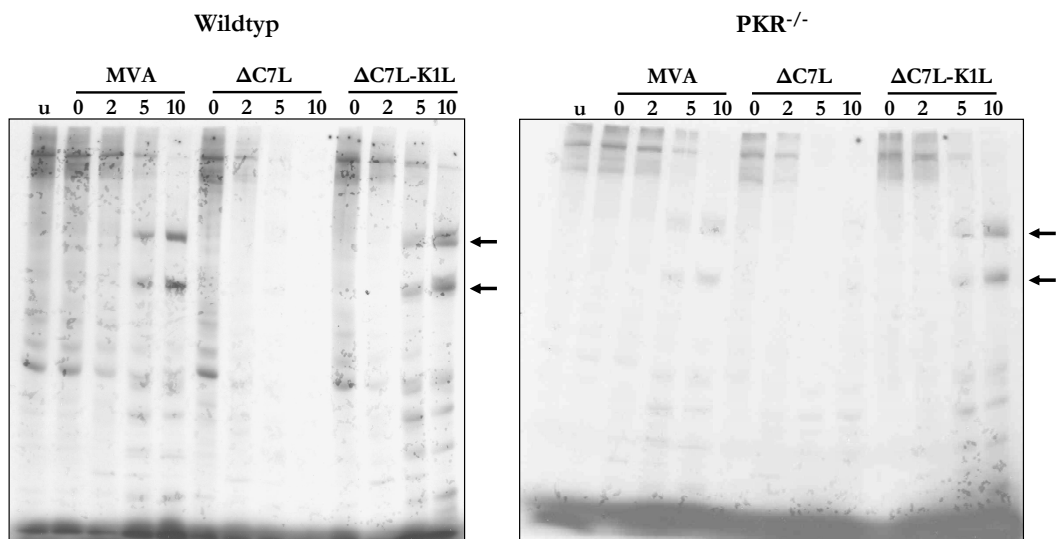
A



B



C



**Abb. 4.9** Die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L wird in PKR<sup>-/-</sup>-MEF oder PKR<sup>-/-</sup>-RNaseL<sup>-/-</sup>-MEF nicht wiederhergestellt. **A. und B.** Western Blot-Analyse der B5-Expression in Wildtyp-, PKR<sup>-/-</sup>-, PKR<sup>-/-</sup>-RNaseL<sup>-/-</sup>-MEF infiziert mit einer moi von 5 mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L), MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L) oder MVA-K1L (K1L). Proteinlysate, hergestellt 0, 4, 8 (A) und 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) (B), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit einem Antikörper untersucht, der spezifisch gegen B5 und  $\beta$ -Aktin (als Ladekontrolle) gerichtet ist. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle (u). **C.** Autoradiographie einer <sup>35</sup>S-Methionin-Markierung von Wildtyp- und PKR<sup>-/-</sup>-MEF infiziert mit MVA, MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L) und MVA $\Delta$ C7L-K1L ( $\Delta$ C7L-K1L). Zell-Lysate wurden 0, 2, 5 und 10 h p.i. hergestellt. Prominente Proteinbanden, die erst 5 oder 10 h p.i. auftauchen

und somit intermediäre oder späte virale Proteine darstellen sind mit Pfeilen markiert. Uninfizierte Zellen dienten als Kontrolle (u).

Zusammengenommen konnte die durch MVA $\Delta$ C7L hervorgerufene eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung zwar in PKR<sup>-/-</sup>-MEF unterbunden werden, jedoch ist dies alleine unzureichend, um die späte Genexpression in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen wiederherzustellen.

### 4.3 Untersuchungen zur MVA-induzierten Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs

Eine MVA-Infektion führt im Gegensatz zu Infektionen mit nicht attenuierten VACV-Stämmen, wie VACV WR, zu einer Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalwegs (Oie and Pickup, 2001). Shisler und Jin konnten bereits zeigen, dass eine Wiederherstellung von K1L in MVA diese Aktivierung in infizierten 293T- und RK-13-Zellen teilweise verhindern kann, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist (Shisler and Jin, 2004). Im Folgenden wurde untersucht, ob C7 ebenfalls einen Einfluss auf die durch MVA-Infektion induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung hat.

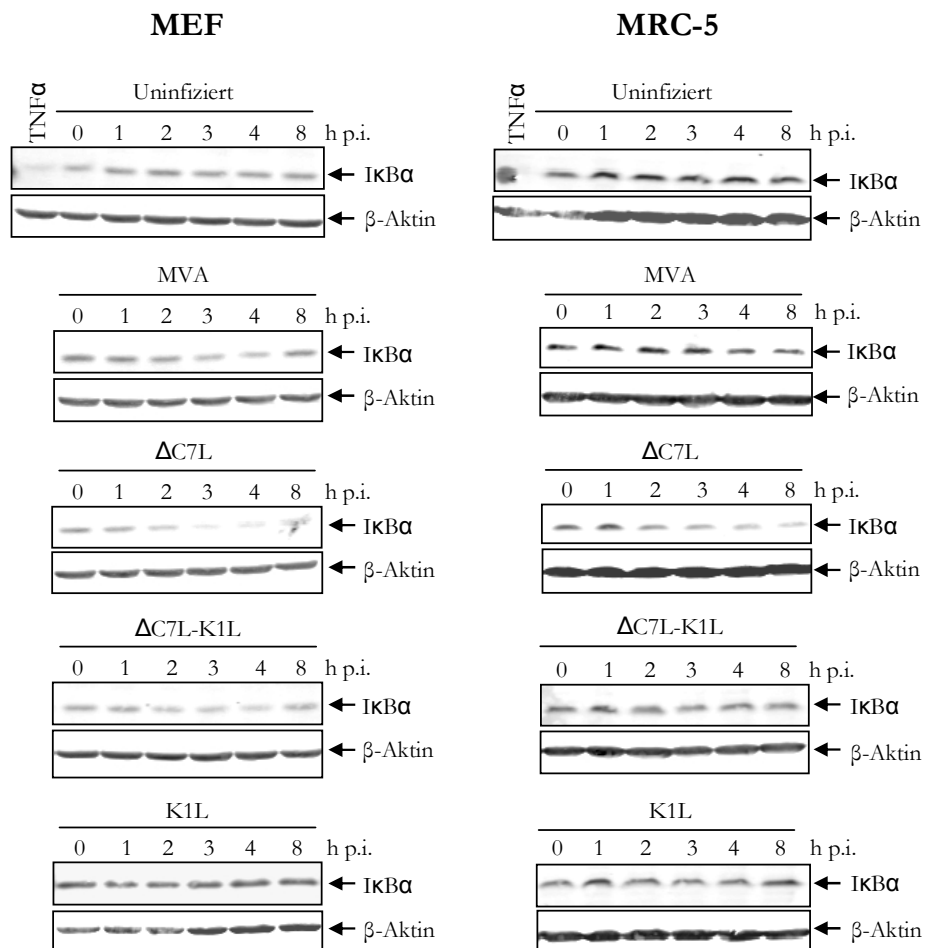
#### 4.3.1 C7 reduziert den Abbau von I $\kappa$ B $\alpha$

Ein wichtiger Schritt bei der Aktivierung von NF $\kappa$ B ist die Degradierung des Inhibitors I $\kappa$ B $\alpha$ . Da K1 diesen Abbau verhindert, wurde der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nach Infektion mit MVA $\Delta$ C7L im Vergleich zu Wildtyp-MVA, MVA $\Delta$ C7L-K1L und MVA-K1L in MEF und MRC-5-Zellen untersucht. Für den folgenden Infektionsversuch dienten uninfizierte und TNF $\alpha$ -stimulierte Zellen als Kontrolle. Es wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. Zelllysate hergestellt und per Western Blot-Analyse wurde die Menge an I $\kappa$ B $\alpha$  bestimmt. Abb. 4.10 A zeigt, dass der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau in MVA $\Delta$ C7L-infizierten MRC-5-Zellen und MEF stärker war als bei MVA-infizierten Zellen. MVA $\Delta$ C7L-K1L-infizierte Zellen wiesen einen ähnlichen I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau auf wie MVA-infizierte Zellen und MVA-K1L-infizierte Zellen waren annähernd vergleichbar mit uninfizierten Zellen.

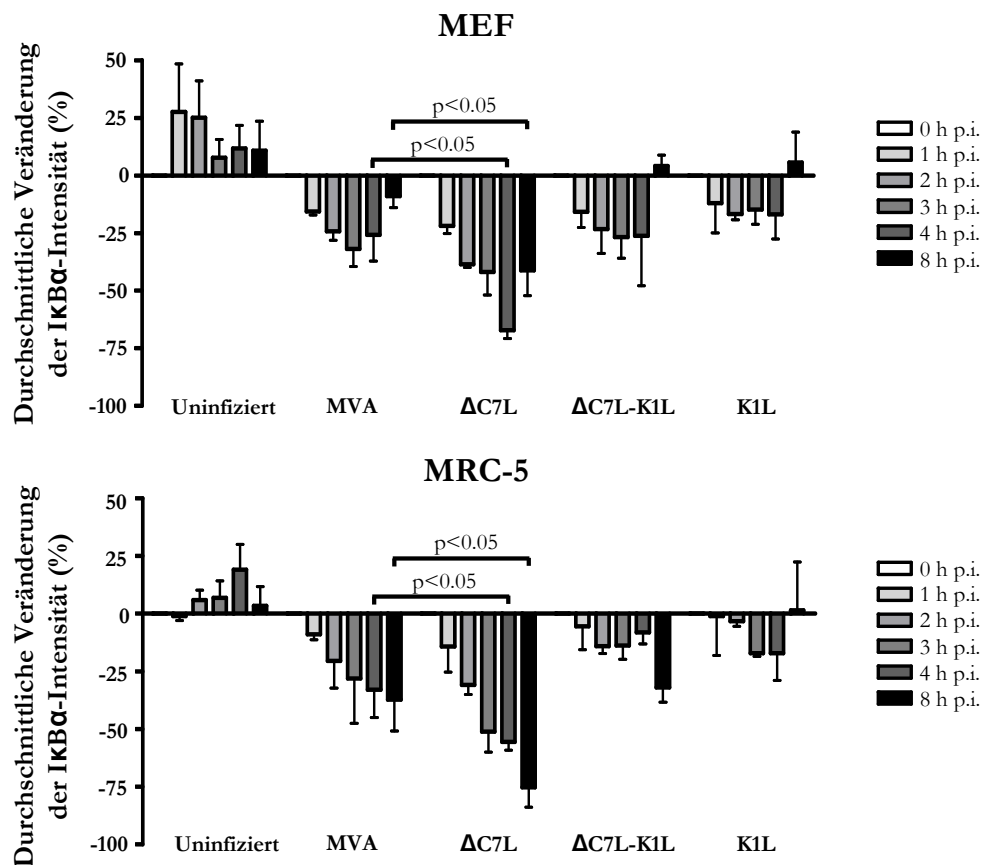
Zur Quantifizierung wurden die I $\kappa$ B $\alpha$ -Bandenintensitäten der Western Blot-Analysen bestimmt und auf die Intensität von  $\beta$ -Aktin normalisiert. Abb. 4.10 B zeigt die durchschnittliche Veränderung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge relativ zum jeweiligen Wert zu Beginn

des Versuchs (0 h p.i.). Bei MVA-infizierten MEF verminderte sich die I $\kappa$ B $\alpha$ -Menge 3-4 h p.i. um maximal 30% und stieg dann 8 h p.i. wieder an, wohingegen bei MVA $\Delta$ C7L-infizierten MEF 4 h p.i. mit 70% eine deutlich stärkere Degradierung von I $\kappa$ B $\alpha$  stattfand, die nur leicht wieder anstieg. In MRC-5-Zellen war ein ähnlich starker I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion zu beobachten, wobei dieser sich 8 h p.i. noch weiter verstärkte. Der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau in MVA $\Delta$ C7L-K1L-infizierten Zellen war ähnlich zu dem Abbau in MVA-infizierten Zellen. Bei MVA-K1L-infizierten Zellen war im Vergleich zu uninfizierten Zellen ein leichter I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau vorhanden. Diese Ergebnisse zeigen, dass C7 dazu beiträgt, den I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau während der MVA-Infektion zu verhindern.

A



B

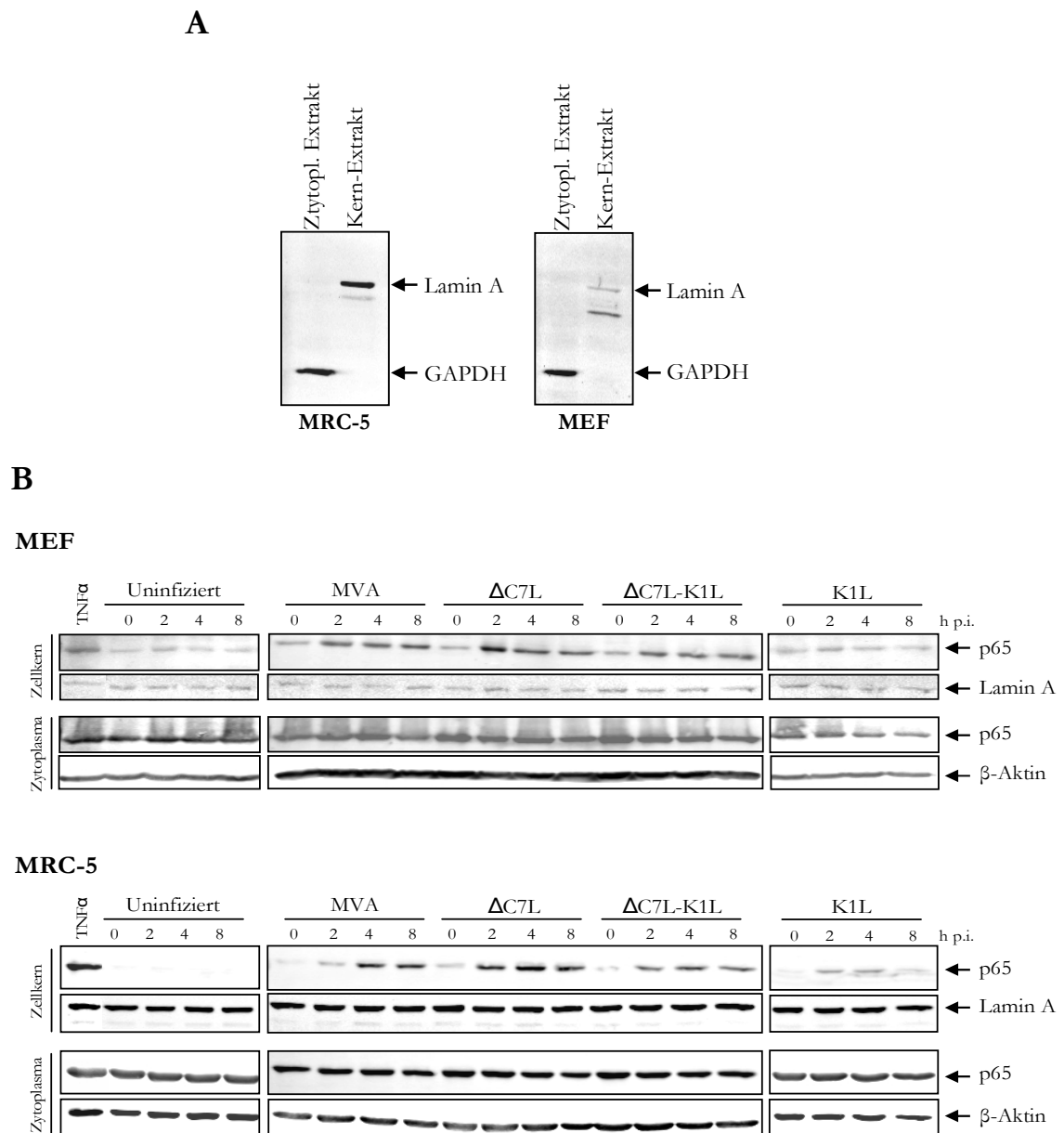


**Abb. 4.10 MVA $\Delta C7L$  induziert einen stärkeren I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau als MVA.** **A.** Western Blot-Analyse des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus in MRC-5-Zellen und MEF, infiziert mit einer moi von 10 mit MVA, MVA $\Delta C7L$  ( $\Delta C7L$ ), MVA $\Delta C7L$ -K1L ( $\Delta C7L$ -K1L) oder MVA-K1L (K1L). Proteinlysate, hergestellt 0, 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für I $\kappa$ B $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle untersucht. Uninfizierte (u) und mit 20ng/ml TNF $\alpha$  behandelte Zellen (TNF $\alpha$ ) dienen als Kontrolle. **B.** Durchschnittliche Veränderung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Bandenintensität 1, 2, 3, 4 und 8 h p.i. relativ zu 0 h p.i. und normalisiert mit der  $\beta$ -Aktin-Bandenintensität. Die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen von drei unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt. Die p-Werte sind kleiner 0,05 und wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet (Wilcoxon, 1946).

#### 4.3.2 C7 reduziert die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Nukleus

Um der Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch C7 weiter auf den Grund zu gehen, wurde die Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Zellkern als ein weiterer Indikator für die NF $\kappa$ B-Aktivierung untersucht (siehe auch Abb. 2.5). Hierfür erfolgte die Infektion von MEF und MRC-5-Zellen durch MVA, MVA $\Delta C7L$ , MVA $\Delta C7L$ -K1L oder MVA-K1L und 0, 2, 4 sowie 8 h p.i. wurden zytoplasmatische- und nukleäre Protein-Extrakte hergestellt (siehe Abs. 3.2.3.2). Zunächst wurde die Reinheit der beiden Fraktionen mit dem Vorhandensein des zytoplasmatischen Proteins GAPDH und des nukleären Proteins Lamin A kontrolliert (siehe Abb. 4.11 A). In der nukleären Fraktion war nur

Lamin A und in der zytoplasmatischen nur GAPDH zu detektieren. Für den folgenden Infektionsversuch dienten uninfierte und  $\text{TNF}\alpha$ -stimulierte Zellen als Kontrolle. Per Western Blot-Analyse wurde die Zunahme von p65 im Zellkern überprüft, wobei die Detektion von Lamin A bei den nukleären- und  $\beta$ -Aktin bei den zytoplasmatischen Extrakten als Ladekontrollen fungierten.



**Abb. 4.11 Analyse der Translokation von  $\text{NF}\kappa\text{B}$  p65 in den Nukleus.** **A.** Western Blot-Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte von MRC-5-Zellen und MEF. Die Reinheit beider Fraktionen wurde anhand des zytoplasmatischen Proteins GAPDH und des nukleären Proteins Lamin A überprüft. **B.** Western Blot-Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte von MRC-5-Zellen und MEF, infiziert mit einer  $\text{moi}$  von 10 mit MVA,  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$  ( $\Delta\text{C7L}$ ),  $\text{MVA}\Delta\text{C7L-K1L}$  ( $\Delta\text{C7L-K1L}$ ) oder  $\text{MVA-K1L}$  (K1L). Protein-Extrakte, hergestellt 0, 2, 4 und 8 h p.i., wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für p65 untersucht. Die Detektion von  $\beta$ -Aktin oder Lamin A diente als Ladekontrolle. Uninfierte (u) und mit  $20\text{ng/ml}$   $\text{TNF}\alpha$  behandelte Zellen ( $\text{TNF}\alpha$ ) dienten als Kontrolle.



Im Vergleich zu MVA- und MVA $\Delta$ C7L-K1L-infizierten Zellen war die p65-Kern-Translokation bei MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen etwas stärker und setzte zudem bei MRC-5-Zellen früher ein. Bei MVA-K1L-infizierten Zellen waren nur schwache p65-Banden in der nukleären Fraktion im Vergleich zu uninfizierten Zellen zu detektieren (siehe Abb. 4.11 B). Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus (siehe Abs. 4.3.1).

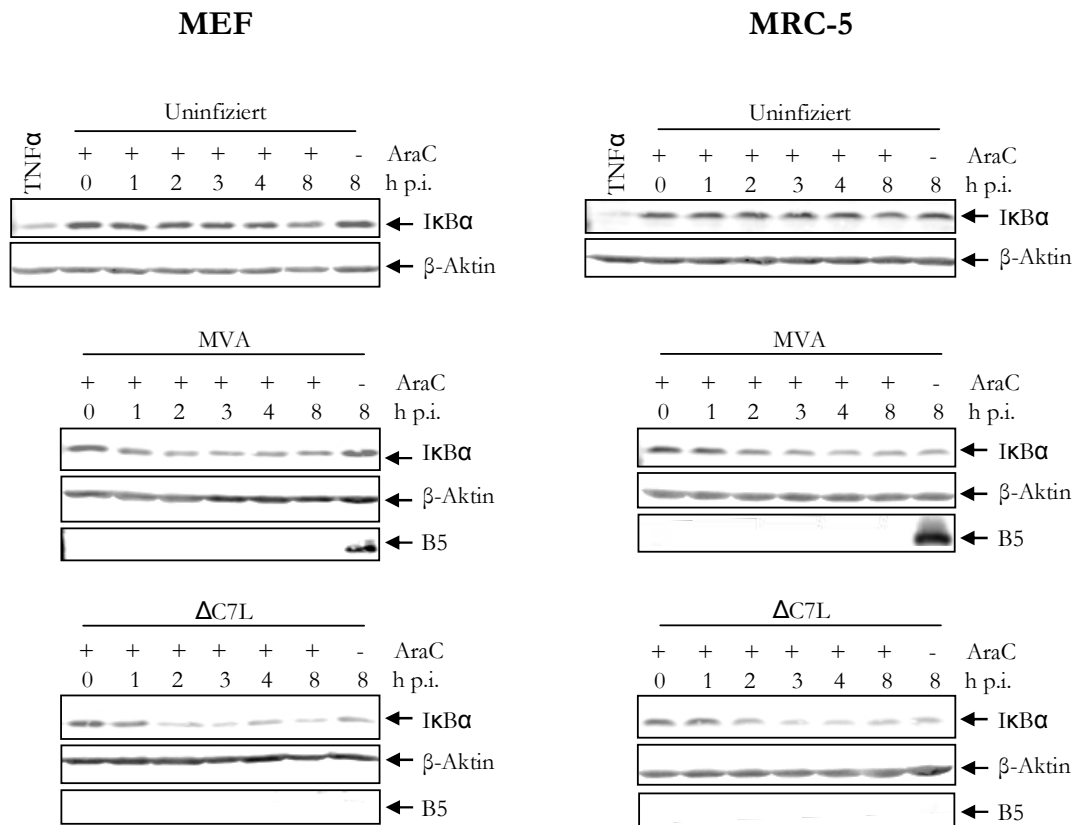
### **4.3.3 Die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist unabhängig von der späten Genexpression**

Wie in Abs. 4.1 beschrieben, zeichnet sich im Gegensatz zu einer MVA-Infektion eine MVA $\Delta$ C7L-Infektion von MRC-5 und MEF dadurch aus, dass späte virale Gene nicht exprimiert werden. Um auszuschließen, dass die beobachtete, stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung (Abs. 4.3.1 und 4.3.2) eine Folge der fehlenden späten Genexpression in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen ist, wurde der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau in MVA- und MVA $\Delta$ C7L-infizierten MRC-5-Zellen und MEF untersucht, die mit Cytosin Arabinosid (AraC) behandelt wurden. Dieses Agens unterbindet die DNA-Replikation von VACV und dadurch auch die intermediäre und späte Genexpression, beeinflusst jedoch nicht die Expression früher Gene. Da die NF $\kappa$ B-Aktivierung bei MVA in der frühen Phase der Infektion induziert wird (Martin and Shisler, 2009), ist durch diese Behandlung, in Übereinstimmung mit der Literatur (Lynch *et al.*, 2009), kein negativer Einfluss auf die NF $\kappa$ B-Induktion zu erwarten. Dadurch sollten MVA und MVA $\Delta$ C7L vergleichbare Genexpressionsmuster aufweisen.

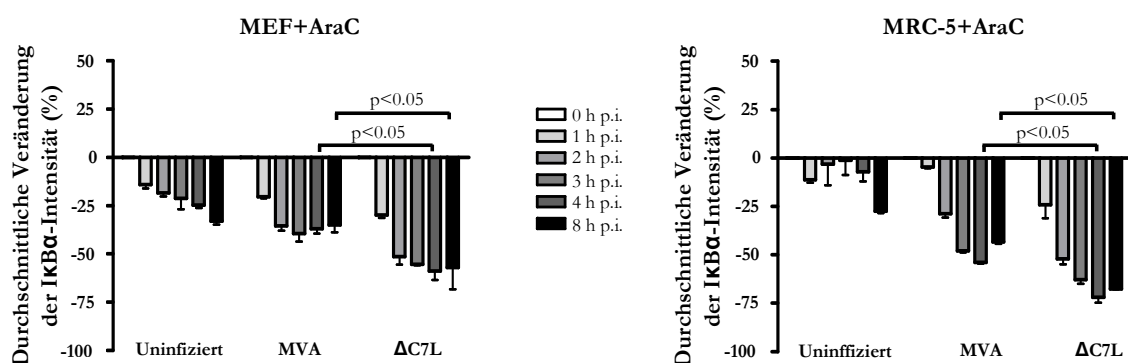
Nach 0, 1, 2, 3, 4 und 8 h p.i. wurden Zell-Lysate hergestellt, wobei uninfizierte- und mit TNF $\alpha$ -stimulierte Zellen wiederum als Kontrollen dienten, und per Western Blot-Analyse erfolgte die Untersuchung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus. Als zusätzliche Kontrolle der gewünschten AraC-Wirkung wurde 8 h p.i. ein Lysat von infizierten, aber nicht mit AraC-behandelten Zellen hergestellt und das späte B5-Protein wurde detektiert (siehe Abb. 4.12 A). Dieses fehlte wie erwartet bei den mit AraC-behandelten Proben. Trotz des nicht zu vernachlässigenden Einflusses von AraC auf den I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau bei uninfizierten Zellen, der sich besonders bei MEF äußerte, war der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen immer noch wesentlich ausgeprägter als in MVA-infizierten Zellen. Die Quantifizierung der durchschnittlichen Veränderung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Bandenintensitäten zeigte einen signifikant höheren Abbau in MVA $\Delta$ C7L-infizierten

Zellen 4 und 8 h p.i. als in MVA-infizierten Zellen (siehe Abb. 4.12 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der im Gegensatz zu MVA verkürzte Replikationszyklus von MVA $\Delta$ C7L nicht für die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist.

**A**



**B**

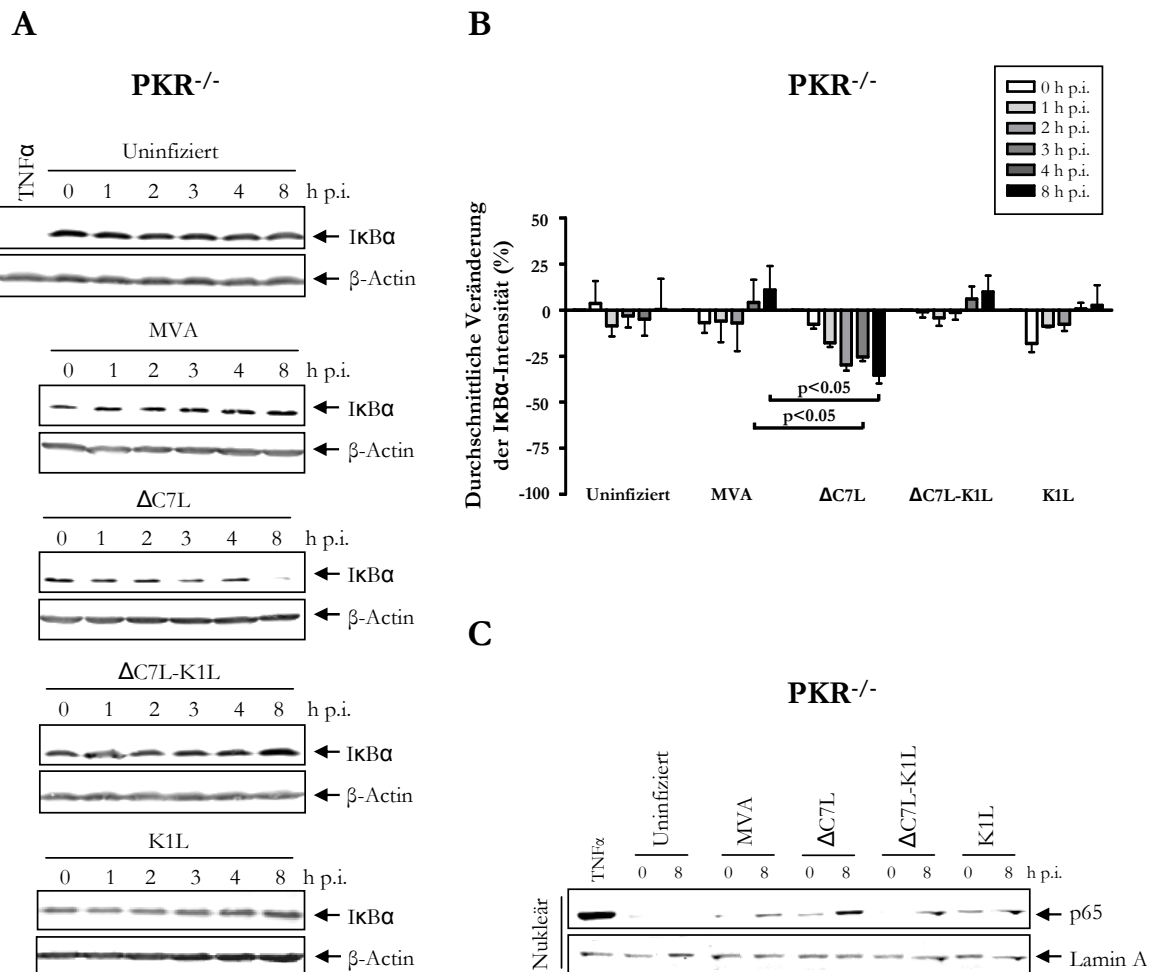


**Abb. 4.12 Die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung durch MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist unabhängig von dem Fehlen der späten Genexpression. A.** Western Blot-Analyse des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus in MRC-5-Zellen und MEF, infiziert mit MVA oder MVA $\Delta$ C7L ( $\Delta$ C7L) und behandelt mit 40 $\mu$ g/ml AraC. Proteinlysate, hergestellt 0, 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für I $\kappa$ B $\alpha$  und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle untersucht. Uninfizierte (u) und mit 20ng/ml TNF $\alpha$  behandelte Zellen (TNF $\alpha$ ) dienen als Kontrolle. Die Wirksamkeit von AraC wurde durch Detektion von B5 überprüft. **B.** Durchschnittliche Veränderung der I $\kappa$ B $\alpha$ -Bandenintensität 1, 2, 3, 4 und 8 h p.i. relativ zu den Werten bei 0 h p.i. und normalisiert mit der  $\beta$ -Aktin-Bandenintensität. Die Durchschnittswerte  $\pm$  Standardabweichungen von zwei unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt. Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet (Wilcoxon, 1946).

#### 4.3.4 In $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF ist die $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -Infektion teilweise aufgehoben

Kürzlich wurde der Zusammenhang zwischen der  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung durch MVA und dem Vorhandensein der PKR hergestellt (Lynch *et al.*, 2009). Lynch und Kollegen zeigten, dass die MVA-Infektion in  $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF keine  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung mehr verursacht. Um zu ermitteln, ob dies auch bei einer  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -Infektion der Fall ist, erfolgte die Infektion von  $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF mit MVA,  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ ,  $\text{MVA}\Delta\text{C7L-K1L}$  oder  $\text{MVA-K1L}$ , und der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau wurde nach 0, 1, 2, 3, 4 und 8 h p.i. analysiert (siehe Abb. 4.13 A). Es zeigte sich, dass bei MVA-,  $\text{MVA}\Delta\text{C7L-K1L}$  und  $\text{MVA-K1L}$ -infizierten Zellen nahezu kein  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Abbau mehr stattfand. Dagegen war bei  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -infizierten  $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF immer noch ein Abbau zu beobachten, wenn auch in einem reduzierten Maße (vergleiche Abb. 4.10 A und B mit Abb. 4.13 A und B). Eine Quantifizierung der durchschnittlichen Veränderung der  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Bandenintensitäten zeigte eine Abnahme von  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  um ca. 30% bei  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -infizierten  $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF, wohingegen bei den anderen Viren fast keine Veränderung festzustellen war. Weiterhin wurden zytoplasmatische und nukleäre Extrakte 0 und 8 h p.i. mit den unterschiedlichen Viren hergestellt und die p65-Translokation wurde analysiert. Auch hier offenbarte sich bei  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -infizierten Zellen ein etwas stärkerer Anstieg der p65-Bande 8 h p.i. im Vergleich zu den anderen Infektionen, die nur in geringem Maße eine Translokation von p65 in den Zellkern auslösten (siehe Abb. 4.13 C).

Diese Ergebnisse bedeuten, dass die  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung nach MVA-Infektion PKR-abhängig ist, wie schon von Lynch und Kollegen (Lynch *et al.*, 2009) beschrieben. Darüber hinaus scheint jedoch noch ein weiterer Signalweg, der durch C7 oder K1 inhibiert wird, zur  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung zu führen, da in  $\text{MVA}\Delta\text{C7L}$ -infizierten  $\text{PKR}^{-/-}$ -MEF immer noch eine Aktivierung vorhanden war.



**Abb. 4.13** In **PKR<sup>-/-</sup>-MEF** wird die **MVAΔC7L-induzierte NFκB-Aktivierung** nur zum Teil aufgehoben. **A.** Western Blot-Analyse des IκBα-Abbaus in **PKR<sup>-/-</sup>-MEF**, infiziert mit einer moi von 10 mit MVA, MVAΔC7L (ΔC7L), MVAΔC7L-K1L (ΔC7L-K1L) oder MVA-K1L (K1L). Proteinlysate, hergestellt 0, 1, 2, 3, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.), wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern spezifisch für IκBα und β-Aktin als Ladekontrolle untersucht. Uninfizierte (u) und mit 20ng/ml TNFα behandelte Zellen (TNFα) dienen als Kontrolle. **B.** Durchschnittliche Veränderung der IκBα-Bandenintensität 1, 2, 3, 4 und 8 h p.i. relativ zu den Werten bei 0 h p.i. und normalisiert mit der β-Aktin-Bandenintensität. Die Durchschnittswerte ± Standardabweichungen von vier unterschiedlichen Experimenten sind dargestellt. Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet (Wilcoxon, 1946). **C.** Western Blot-Analyse nukleärer Extrakte von **PKR<sup>-/-</sup>-MEF** infiziert mit MVA, MVAΔC7L (ΔC7L), MVAΔC7L-K1L (ΔC7L-K1L) oder MVA-K1L (K1L). Protein-Extrakte, hergestellt 0 und 8 h p.i., wurden mit Antikörpern spezifisch für p65 und Lamin A als Ladekontrollen untersucht. Uninfizierte (u) und mit 20ng/ml TNFα behandelte Zellen (TNFα) dienen als Kontrolle.

#### 4.4 Identifizierung möglicher Interaktionspartner von K1 und C7

Das Vorhandensein von sieben Ankyrin-Repeat-Domänen beim K1-Protein, deren Funktion darin besteht Protein-Protein-Interaktionen zu ermöglichen (Sedgwick and Smerdon, 1999; Li *et al.*, 2010), deutet stark auf einen oder mehrere mögliche Protein-Interaktionspartner hin. Um die Funktionen von K1 und C7 weiter zu klären, wurde im Folgenden versucht interagierende Proteine zu identifizieren.

#### 4.4.1 Interaktionspartner von K1 und C7 im Hefe-2-Hybrid-System

Die gängige Hefe-2-Hybrid-Methode bietet die Möglichkeit, eine große Anzahl potentieller Interaktionspartner zu überprüfen, und wurde deshalb in einem ersten Ansatz genutzt. Diese Methode macht sich zunutze, dass der Hefe Gal4-Transkriptionsaktivator aus einer DNA-Bindedomäne (Gal4-BD) besteht, worüber die Bindung an den Promotor erfolgt (Keegan *et al.*, 1986) und einer Aktivierungsdomäne (Gal4-AD), welche wichtig ist für die Rekrutierung der RNA-Polymerase (Brent and Ptashne, 1985). Nur wenn beide Domänen sich in räumlicher Nähe zueinander befinden, wird die Transkription des kontrollierten Gens aktiviert. Die Sequenz von K1L und C7L wurden in den „Köder“-Vektor pGBT9 kloniert, sodass K1 und C7 als Fusionsproteine mit der Gal4-BD und unter Kontrolle des Hefe ADH1-Promotors exprimiert werden. Die Hefe-2-Hybrid-Analysen erfolgten mit einer humanen und einer murinen „Beute“-cDNA-Bibliothek, wie in Abs. 3.2.5 beschrieben (DKFZ, Heidelberg). Diese wurden als Fusionsproteine mit der Gal4-AD exprimiert, sodass im Fall einer Interaktion diese Domäne mit der Gal4-BD des „Köder“-Proteins (hier K1 oder C7) zusammenkommt und in Folge dessen ein Reportergen exprimiert wird. In Tabelle 4.3 sind die wahrscheinlichsten Interaktionspartner von K1 und C7 dargestellt, die in den Hefe-2-Hybrid *screenings* gefunden wurden.

Tabelle 4.3 Übersicht der wahrscheinlichsten Hefe-2-Hybrid Interaktionspartner von K1 und C7

Köder-Protein	Beute-Gensymbol	Anzahl der Isolierungen	Beschreibung	cDNA Bibliothek
K1	RPC8	8	RNA-Polymerase III Polypeptid H	human
K1	Atxn10	7	Ataxin 10	murin
K1	Elavl3	5	ELAV ( <i>embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila</i> )-like 3 (Hu Antigen C)	murin
K1	Rnf10	3	Ring Finger Protein 10	murin
K1	Rab3il1	3	RAB3A interagierendes protein ( <i>rabin3</i> )-like 1	murin
C7	Brg-1	6	SWI/SNF related, matrix associated, Aktin dependent regulator of chromatin, Unterfamilie a, Mitglied 4	murin
C7	Brg-1	1	SWI/SNF related, matrix associated, Aktin dependent regulator of chromatin, Unterfamilie a, Mitglied 4	human
C7	NCoR1	2	Nukleärer Receptor Co-Repressor 1	murin
C7	NCoR1	2	Nukleärer Receptor Co-Repressor 1	human

Für K1 wurden fünf potentielle Interaktionspartner identifiziert, wobei diese nur mit jeweils einer der beiden cDNA-Bibliotheken entdeckt wurden. Der vermeintlich mit K1 wechselwirkende *embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 3* (Elavl3) wurde als tatsächlicher Interaktionspartner ausgeschlossen, da dieses Protein spezifisch nur in Neuronen exprimiert wird und somit nicht für die *host-range*-Funktion von K1 in beispielsweise HeLa-Zellen wichtig sein kann (Fornaro *et al.*, 2007). Im Fall von C7 wurden zwei vermeintliche Interaktionspartner identifiziert, die mit beiden cDNA-Bibliotheken entdeckt wurden, was eine tatsächliche Interaktion wahrscheinlicher macht.

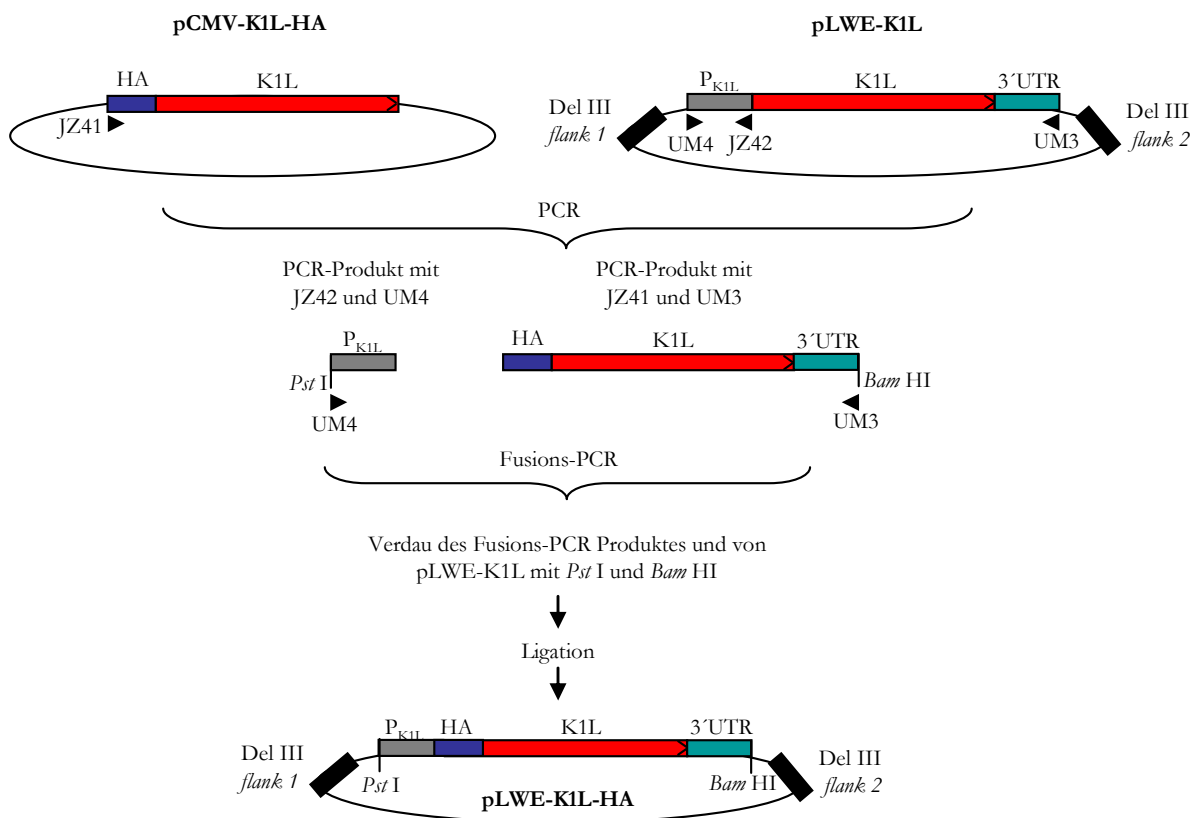
#### 4.4.2 Generierung und Charakterisierung von MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5

Aufgrund der hohen falsch-positiv-Rate von über 50% der Hefe-2-Hybrid-Methode (Deane *et al.*, 2002), müssen hierdurch identifizierte Interaktionen mit einer anderen Nachweismethode bestätigt werden. Um die in Abs. 4.4.1 vorgestellten möglichen Interaktionen von K1 und C7 per Co-Immunpräzipitierung verifizieren zu können, wurden rekombinante MVA generiert, die für die Sequenz von K1L mit einem N-terminalen HA-*tag* (MVA-K1L-HA) oder für die Sequenz von C7L mit C-terminalem V5-*tag* (MVA-C7L-V5) kodieren. Mit Hilfe dieser *tags* sollte eine Antikörper-vermittelte Präzipitierung von K1 und C7 sowie etwaiger Interaktionspartner ermöglicht werden. Weiterhin können MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5 dazu dienen, mögliche Interaktionen im Kontext einer natürlichen MVA-Infektion zu untersuchen. Im Folgenden ist die Klonierung der Insertionsplasmide sowie die Generierung und anschließende Charakterisierung der beiden Viren dargestellt.

##### 4.4.2.1 Klonierung der Insertionsplasmide für K1L-HA und C7L-V5

Die Klonierung des K1L-HA-Insertionsplasmids (pLWE-K1L-HA) zur Generierung von MVA-K1L-HA erfolgte, indem mittels PCR-Amplifikation die Sequenz von K1L-HA von dem Expressionsplasmid pCMV-K1L-HA (siehe Abs. 3.1.9) und der K1L-Sequenz des Insertionsplasmids pLWE-K1L, dass zur Generierung von MVA-K1L diente (Zwilling *et al.*, 2010), mit den *primern* JZ41 und UM3 fusioniert wurden (siehe Abb. 4.14). Die Elongationszeit wurde hierfür für 30 Zyklen so kurz gewählt (5 Sek.),

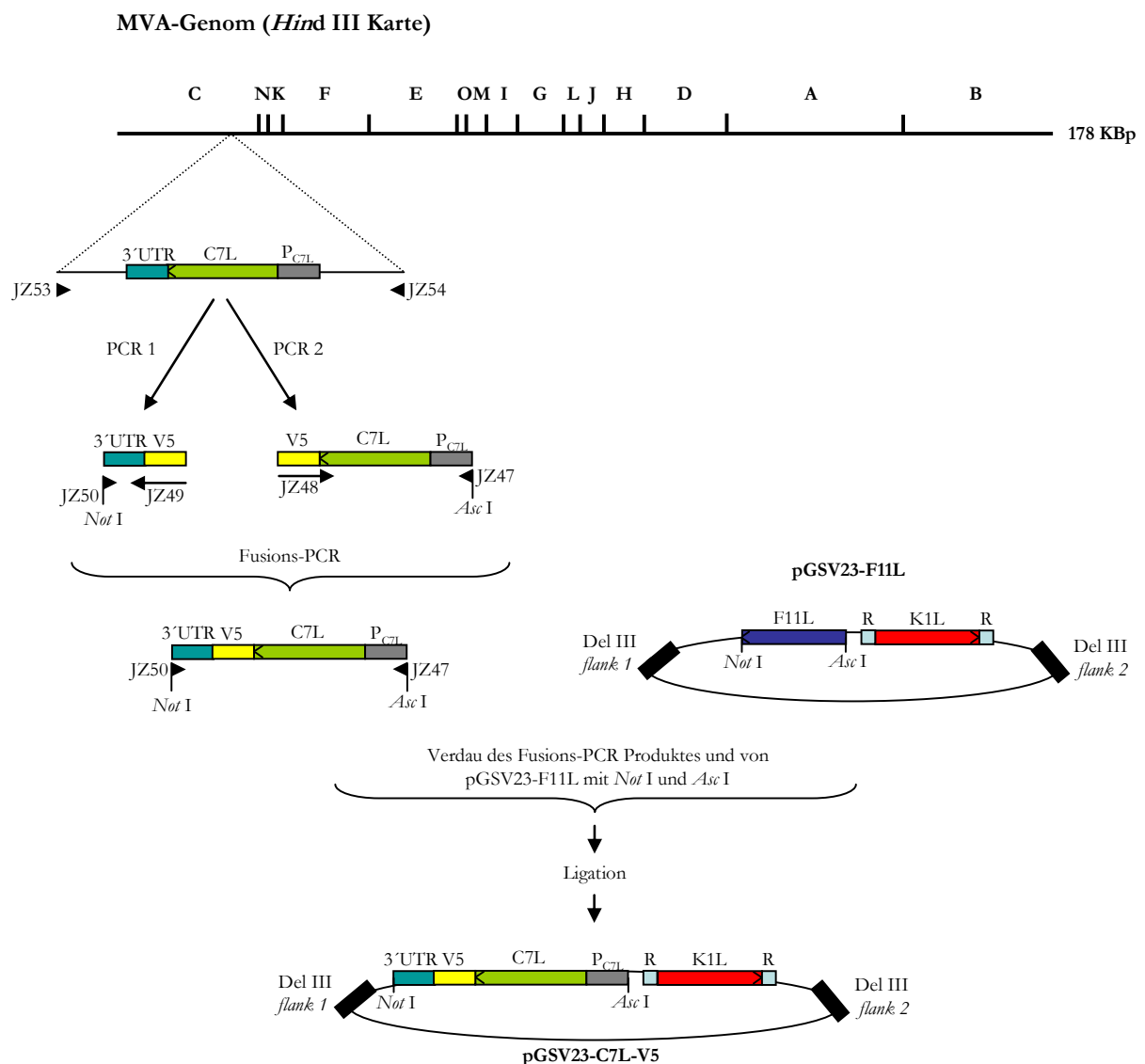
dass von den beiden unterschiedlichen DNA-Matrizen überlappende Bereiche innerhalb der K1L-Sequenz entstanden, die dann durch eine 20 Min. Elongationszeit am Ende der PCR aufgefüllt wurden. Das resultierende PCR-Produkt hatte die Sequenz von K1L mit der HA-Sequenz am 5'-Ende und dem 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR). Durch eine zweite PCR mit den *primern* UM4 und JZ42 wurde aus pLWE-K1L ein Sequenzbereich von 231 Bp stromaufwärts von K1L amplifiziert, welcher die authentische Promotorregion von K1L enthält. Die Sequenzen der *primer* JZ41 und JZ42 wurden so gewählt, dass überlappende Bereiche bei den beiden oben beschriebenen PCR-Produkten entstanden, sodass durch eine weitere Fusions-PCR mit den *Primern* UM3 und UM4 die PCR-Produkte verbunden wurden (siehe Abb. 4.14). Das resultierende Produkt und pLWE-K1L wurden anschließend mit *Pst*I und *Bam*HI verdaut und die Sequenzen wurden ligiert, so dass pLWE-K1L-HA daraus entstand.



**Abb. 4.14 Schematische Darstellung der Klonierung des Insertionsplasmids für K1L-HA.** Die Generierung von pLWE-K1L-HA ist dem Text zu entnehmen. *primer* sind als Pfeile dargestellt. Das resultierende Transferplasmid pLWE-K1L-HA enthält die Sequenz von K1L mit HA-*tag* und dem 3'-untranslatierten Bereich (3'UTR). Diese Sequenz wird eingerahmt von Sequenzbereichen, die stromabwärts und -aufwärts der Deletion III im MVA-Genom liegen und für die Insertion der dazwischen liegenden Sequenz durch homologe Rekombination dienen (Del III flank 1 und 2).

Zur Klonierung des C7L-V5-Insertionsplasmids wurde zunächst ein größerer DNA-Bereich per PCR mit den *primern* JZ53 und JZ54 amplifiziert, welcher die Sequenz des

C7L-Gens und des dazugehörigen Promotors enthielt (siehe Abb. 4.15). Hierbei diente DNA von MVA-infizierten Zellen als Matrize. Das hieraus resultierende PCR-Produkt wurde wiederum als Matrize für eine PCR mit den *Primern* JZ47 und JZ48 sowie eine PCR mit den *primern* JZ49 und JZ50 genutzt. Die Sequenz von JZ48 und JZ49 wurde so gewählt, dass ein überlappender DNA-Bereich entsteht, der die Sequenz des V5-tags hat. Mit einer finalen PCR mit den *primern* JZ47 und JZ50 wurden die beiden PCR-Produkte fusioniert.



**Abb. 4.15 Schematische Darstellung der Klonierung des Insertionsplasmids für C7L-V5.** Die Klonierungsschritte des C7L-V5-Insertionsplasmids pGSV23-C7L-V5 sind im Text beschrieben. Das resultierende Plasmid enthält Deletion III *flanks*, welche Sequenzbereiche darstellen, die stromabwärts und -aufwärts der Deletion III im MVA-Genom liegen, zur Insertion der dazwischen liegenden Sequenz durch homologe Rekombination. Weiterhin kodiert das Plasmid für K1L als Selektionsmarker für das Wachstum von rekombinanten Viren, die die Insertionskassette inseriert haben, in RK-13 Zellen. Die Sequenz von K1L wird eingerahmt von repetitiven Sequenzen (R), welche eine Deletion von K1L nach erfolgreicher Selektionierung durch Aufheben des Selektionsdrucks erlauben.



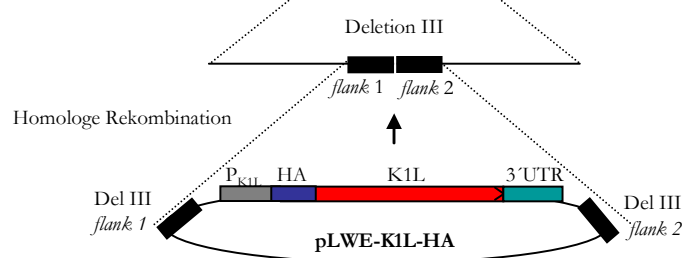
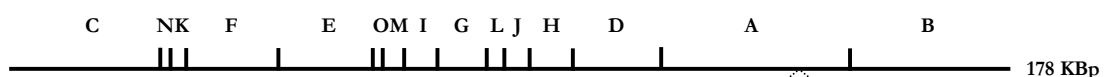
Das resultierende PCR-Produkt, das C7L mit einer C-terminalen V5-*tag*-Sequenz gefolgt von dem 3'UTR enthält sowie das F11L-Transferplasmid pGSV23-F11L (Zwilling *et al.*, 2010), wurden mit *NotI* und *AscI* verdaut und anschließend ligiert, so dass pGSV23-C7L-V5 dabei generiert wurde (siehe Abb. 4.15).

#### 4.4.2.2 Generierung der rekombinanten Viren

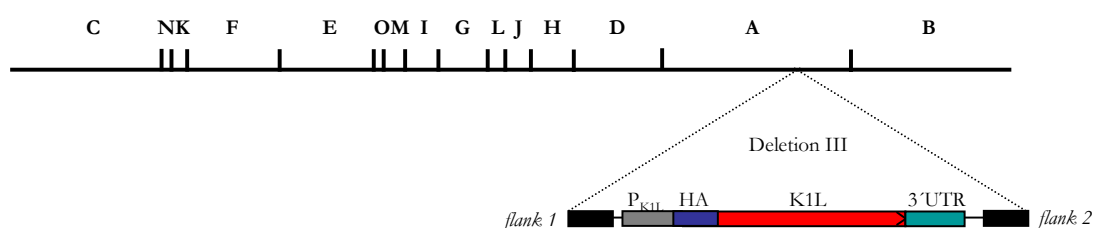
Zur Generierung von MVA-K1L-HA wurden BHK-21-Zellen mit MVA infiziert und mit pLWE-K1L-HA transfiziert. Im Fall der Generierung von MVA-C7L-V5 diente MVA $\Delta$ C7L (Backes *et al.*, 2010) als Ausgangsvirus, um Rekombinationsereignissen zwischen der in MVA erhalten gebliebenen C7L-Sequenz und der inserierten C7L-V5-Sequenz vorzubeugen. Sowohl die K1L-HA-, als auch C7L-V5-Sequenz in dem jeweiligen Insertionsplasmid, wurde von einer Sequenz eingerahmt, welche homolog zu der Sequenz stromabwärts und –aufwärts der im MVA-Genom natürlich vorhandenen Deletion III war (Del III *flank* 1 und 2). Hierdurch wurde eine homologe Rekombination ermöglicht, wodurch die gewünschten Sequenzen in die Deletion III des MVA-Genoms inseriert wurden (siehe Abb. 4.16). Es folgte die Passagierung, Selektionierung und Überprüfung rekombinanter Viren in RK-13-Zellen (siehe Abs. 3.2.6.2).

### A

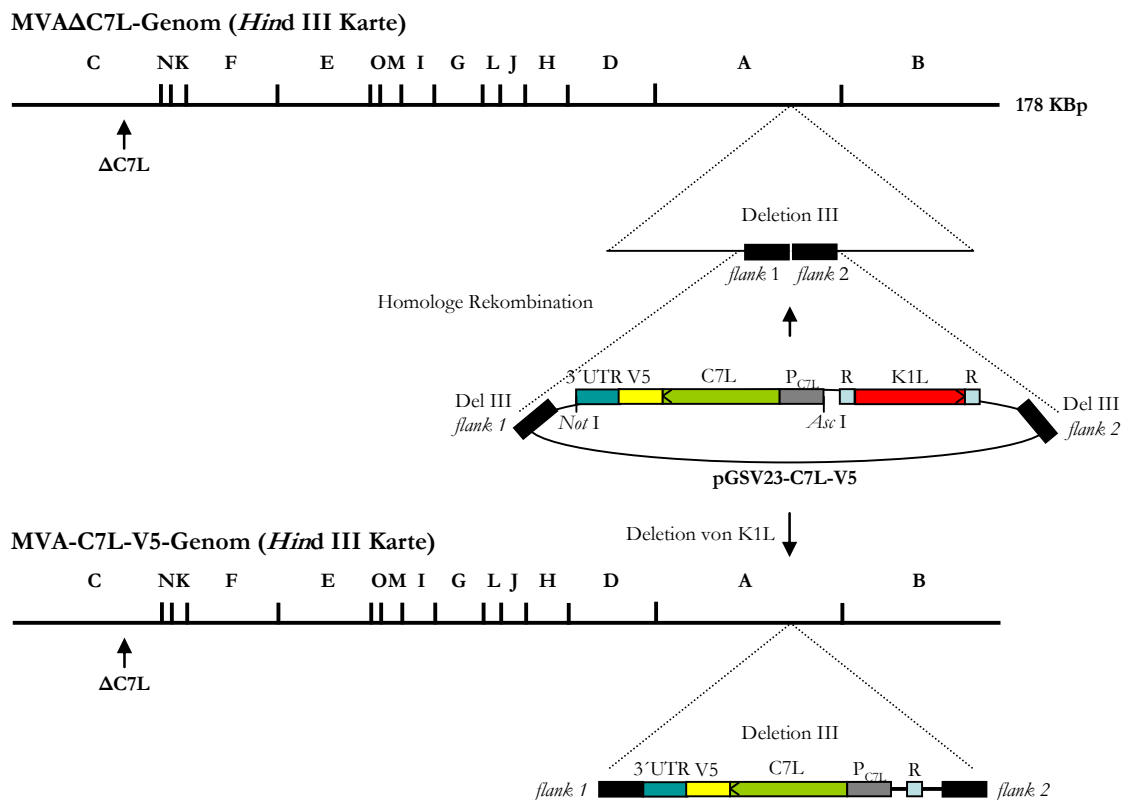
#### MVA-Genom (*Hind* III Karte)



#### MVA-K1L-HA-Genom (*Hind* III Karte)



## B



**Abb. 4.16 Schematische Darstellung der Generierung von MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5. A.** K1L-HA wurde durch Sequenzen, die homolog zu der Sequenz stromabwärts und –aufwärts der Deletion III im MVA-Genom sind, via homologer Rekombination inseriert. Rekombinante Viren wurden durch Passagierung in RK-13-Zellen selektiert. **B.** Die Inserierung von C7L-V5 erfolgte wie in A. beschrieben. Zusätzlich wurde K1L mit inseriert, um eine Selektion rekombinanter Viren in RK-13-Zellen zu ermöglichen, welche die C7L-V5-Sequenz enthalten. Die repetitiven Sequenzen (R) stromabwärts und –aufwärts von K1L ermöglichten nach abgeschlossener Selektion eine Deletion von K1L in für MVA permissiven CEF.

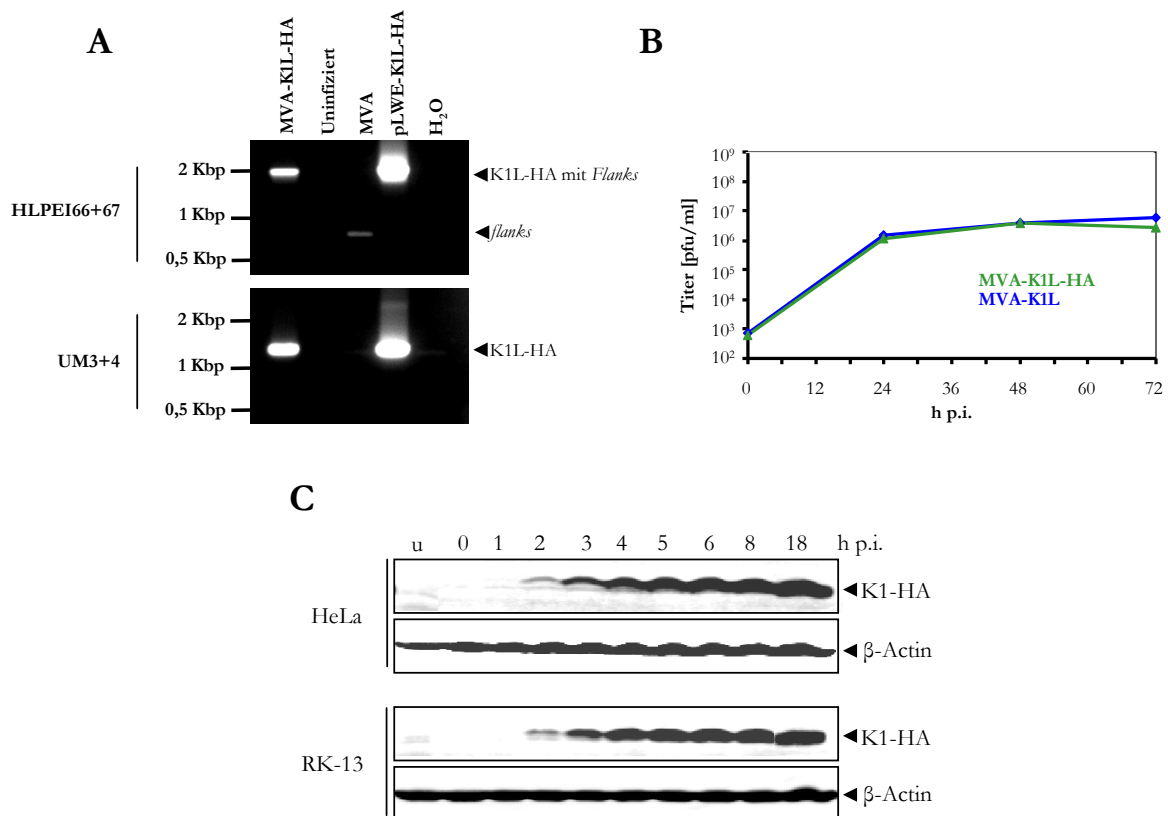
Die Selektionierung der rekombinanten Viren wurde hierbei durch die Insertion von K1L-HA bzw. K1L in das virale Genom gewährleistet, welche die *host-range* auf diese Zellen erweiterten. Bei MVA-K1L-HA wurde K1L-HA stabil ins Genom integriert.

Im Fall von MVA-C7L-V5 wurde nach erfolgreicher Selektion rekombinanter Viren die dann unerwünschte K1L-Sequenz dadurch entfernt, dass die Viren ohne Selektionsdruck in den für MVA permissiven CEF passagiert wurden, bis K1L durch die stromabwärts und –aufwärts gelegenen repetitiven Sequenzen (R) deletiert wurde (siehe Abb. 4.16).

Nach Amplifikation und Aufreinigung der rekombinanten Viren wurden diese hinsichtlich des Vorhandenseins der inserierten K1L-HA- bzw. C7L-V5-Sequenz mittels PCR untersucht. Bei MVA-K1L-HA wurde mit den *primern* HLPEI66 und HLPEI67, welche in der flankierenden Sequenz der Deletion III *flanks* binden, ein DNA-Fragment mit einer Größe von 1931 Bp amplifiziert, wohingegen mit MVA-Wildtyp DNA als Matrize ein Fragment mit einer Größe von 732 Bp amplifiziert wurde (siehe Abb. 4.17 A

oben). Eine zusätzliche PCR mit den *primern* UM3 und UM4, welche spezifisch K1L-HA amplifizieren, ergab eine Bande mit der erwarteten Größe von 1199 Bp. Dies zeigt, dass die Sequenz von K1L-HA erfolgreich inseriert wurde und dass zudem das rekombinante Virus nicht mit Wildtyp-Virus verunreinigt ist.

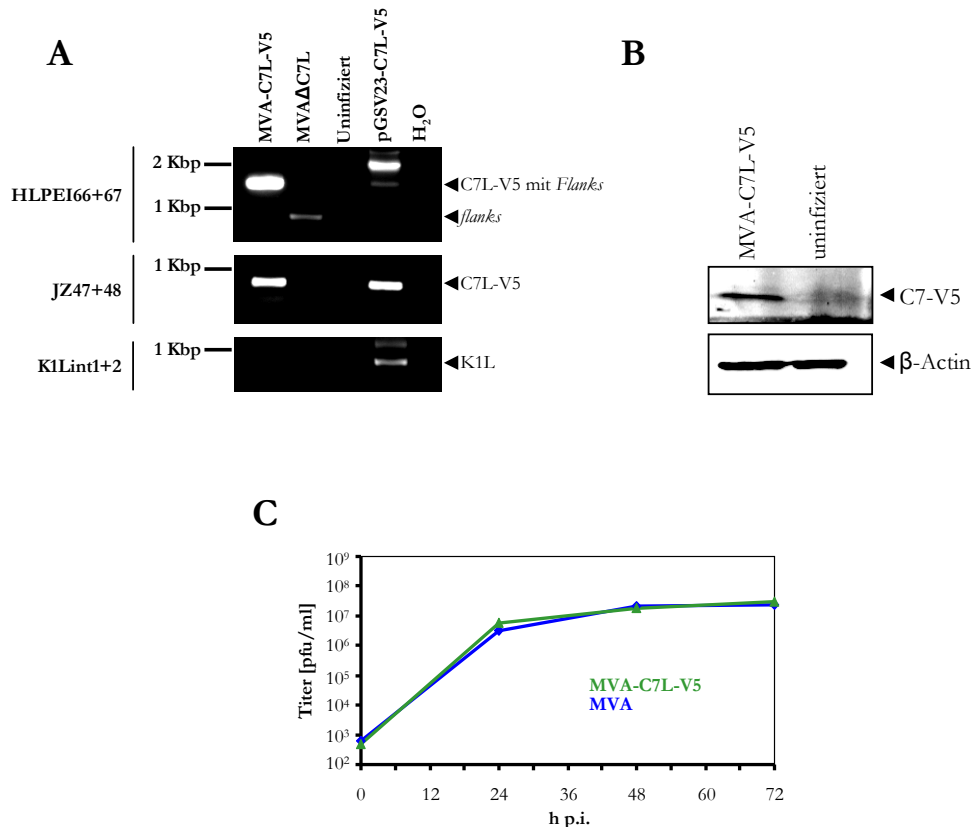
Eine Mehrstufen-Wachstumsanalyse (Durchführung siehe Abs. 3.2.6.4) in RK-13-Zellen, in welchen MVA nur bei Anwesenheit von K1L replizieren kann (Sutter *et al.*, 1994), zeigte zudem, dass MVA-K1L-HA im gleichem Maße wie MVA-K1L (Zwilling *et al.*, 2010) repliziert (siehe Abb. 4.17 B). Dies bedeutet, dass der HA-*tag* am N-Terminus von K1 keinen negativen Einfluss auf die Funktion von K1 hat, die *host-range* auf RK13-Zellen zu erweitern.



**Abb. 4.17 Charakterisierung von MVA-K1L-HA.** **A.** PCR-Analyse zur Insertion von K1L-HA in das Genom von MVA. CEF wurden mit MVA-K1L-HA oder MVA infiziert, 48 Stunden nach Infektion (h p.i.) wurde DNA extrahiert und per PCR analysiert. Als Kontrollen dienen die DNA von uninfizierten Zellen sowie das Transferplasmid (pLWE-K1L-HA) und eine PCR mit H<sub>2</sub>O. Die *primer* HLPEI66 und HLPEI67 binden in der *flank*-Region der Deletion III von MVA und UM3 und UM4 binden am 3'- und 5'-Ende von K1L-HA. **B.** Mehrstufen-Wachstumsanalyse von MVA-K1L-HA und MVA-K1L. RK-13-Zellen wurden mit dem jeweiligen Virus mit einer moi von 0,05 infiziert und nach 0, 12, 24, 48 und 72 h p.i. wurden die Zellen samt Überstand geerntet. Die Virustiter wurden durch Rücktitration in CEF bestimmt. **C.** Western Blot-Analyse der K1-HA-Expression in RK-13- und HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit einer moi von 5 mit MVA-K1L-HA infiziert. Als Kontrolle dienten uninfizierte Zellen (u). Nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 und 18 h p.i. wurden Zellysate hergestellt, per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. K1-HA wurde mit einem polyklonalen Antikörper, welcher gegen den HA-*tag* gerichtet ist, detektiert. Zur Kontrolle der gleichen Beladung wurde β-Aktin detektiert.

Anschließend wurde eine Expressionskinetik von K1-HA erstellt, um einen möglichst geeigneten Zeitpunkt nach Infektion für eine Co-Immunpräzipitierung zu ermitteln. Hierfür wurden humane HeLa- und RK-13-Zellen mit einer *moi* von 5 infiziert, und verschiedenen Zeitpunkten p.i. wurden Proteinlysate hergestellt. In einer Western Blot-Analyse wurde die Expression von K1-HA bestimmt (siehe Abb. 4.17 C). K1-HA war bereits 2 h p.i. zu detektieren, wobei kein nennenswerter Unterschied im Expressionsmuster zwischen RK-13-Zellen und HeLa-Zellen zu verzeichnen war. Für die später beschriebenen Co-Immunpräzipitierungen (siehe Abs. 4.4.3) wurde als Zeitpunkt 5 h p.i. gewählt, da hier ausreichend K1-HA-Protein vorhanden war.

Analog zu MVA-K1L-HA wurde MVA-C7L-V5 untersucht. Eine PCR mit den Primern HLPEI66 und HLPEI67 erbrachte bei MVA-C7L-V5-DNA ein Amplifikat mit der Größe von 1523 Bp, während bei MVA eine Bande bei 732 Bp entstand (siehe Abb. 4.18 A oben). Eine PCR mit JZ47 und JZ48, welche spezifisch C7L-V5 amplifiziert, ergab ein DNA-Fragment mit der erwarteten Größe von 791 Bp. In einer dritten PCR wurde mit den *primern* K1Lint1 und -2, die innerhalb der K1L-Sequenz banden, überprüft, ob der Selektionsmarker K1L aus dem Genom von MVA-C7L-V5 deletiert war. Das Fehlen eines PCR-Produktes mit MVA-C7L-V5-DNA als Matrize zeigte die erfolgreiche Deletion der K1L-Sequenz an (siehe Abb. 4.18 A unten). Dies bedeutet, dass die Inserierung erfolgreich war und weder eine Kontamination mit dem Wildtyp-Virus vorlag noch mit dem Virus-Intermediat, welches die Sequenz von K1L noch trägt. Die Expression von C7-V5 wurde 4 h p.i. in CEF per Western Blot-Analyse bestätigt (siehe Abb. 4.18 B). Eine Expressions-Kinetik wurde in diesem Falle nicht erstellt, da diese für C7 veröffentlicht ist (Backes *et al.*, 2010) und zeigt, dass C7 früh ab 2 h p.i. exprimiert wird. Eine Mehrstufen-Wachstumsanalyse (siehe Abs. 3.2.6.4) in CEF ergab keinen nennenswerten Unterschied im Wachstumsverhalten des Virus zum MVA-Wildtyp (siehe Abb. 4.18 C).



**Abb. 4.18 Charakterisierung von MVA-C7L-V5.** **A.** PCR-Analyse des Genoms von MVA-C7L-V5. CEF wurden mit MVA-C7L-V5 oder MVAΔC7L infiziert, 48 Stunden nach Infektion (h p.i.) wurde die DNA extrahiert und mittels PCR analysiert. Als Kontrollen dienten die DNA von uninfizierten Zellen sowie das Transferplasmid (pGSV23-C7L-V5) und H<sub>2</sub>O. Die *primer* HLPEI66 und HLPEI67 binden in der *flank*-Region und JZ47 und JZ48 binden am 5'- und 3'-Ende von C7L-V5. **B.** Western Blot-Analyse der C7-V5 Expression in CEF. Die Zellen wurden mit einer *moi* von 5 mit MVA-C7L-V5 infiziert oder als Kontrolle nicht infiziert. Nach 4 h p.i. wurden Zellysate hergestellt, per SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. C7-V5 wurde mit einem monoklonalen Antikörper, welcher gegen den V5-tag gerichtet ist, detektiert. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin detektiert. **C.** Mehrstufen-Wachstumsanalyse von MVA-C7L-V5 und MVA. CEF wurden mit beiden Viren mit einer *moi* von 0,05 infiziert und nach 0, 12, 24, 48 und 72 h p.i. wurden die Zellen samt Überstand geerntet. Die Virustiter wurden durch Rücktitration in CEF bestimmt.

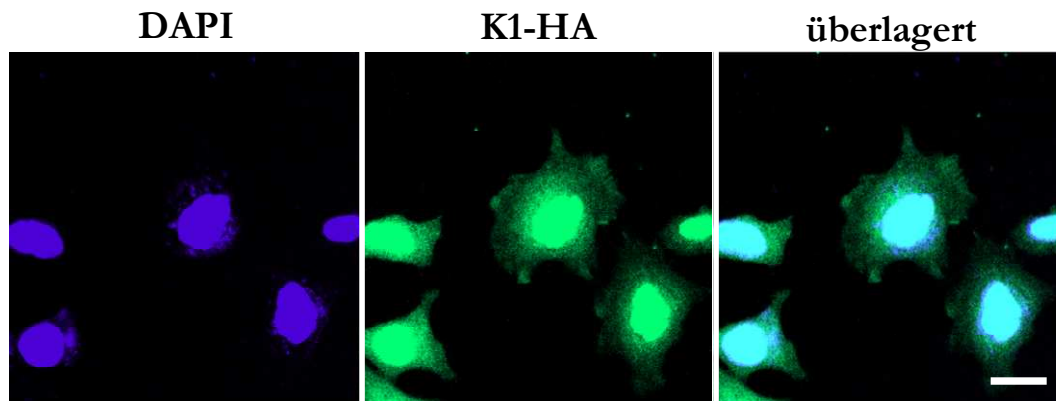
#### 4.4.2.3 Lokalisation von C7-V5 und K1-HA

Bedingt durch die Hefe-2-Hybrid-Methodik kann es zu artifiziellen Interaktionen zwischen Proteinen im Hefe-Zellkern kommen, die normalerweise nicht in demselben zellulären Kompartiment vorliegen. So könnte es sein, dass während einer natürlichen Infektion einer eukaryotischen Zelle K1 oder C7 an anderer Stelle lokalisiert sind, als die etwaigen Interaktionspartner. Aus diesem Grund wurde zunächst die Lokalisation von K1-HA und C7-V5 innerhalb MVA-K1L-HA- oder MVA-C7L-V5-infizierten Zellen untersucht, um anhand der beschriebenen Lokalisation der in Tabelle 4.3 aufgeführten Interaktionspartner einen oder mehrere ausschließen zu können. Hierfür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und einen Tag später mit MVA-K1L-HA oder MVA-

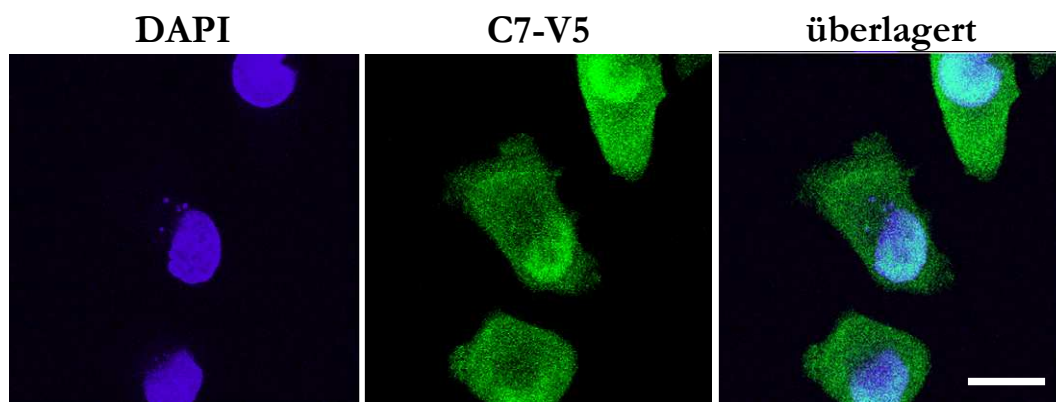
C7L-V5 mit einer *moi* von 10 infiziert. Nach 4 Stunden wurden die Zellen fixiert und einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen. Verwendung fanden Antikörper gegen den HA-*tag* oder dem V5-*tag* und DAPI, das zelluläre und virale DNA anfärbt (siehe Abs. 3.2.3.6). Die DAPI-Färbung ermöglichte nicht nur die Unterscheidung zwischen Zellkern und Zytoplasma, sondern sie diente zusätzlich als Infektionskontrolle, da die virale DNA der im Zytoplasma replizierenden Viren ebenfalls angefärbt wurde. Beide Proteine waren sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, wobei mehr Protein im Zellkern vorzukommen schien (siehe Abb. 4.19 A und B). Diese Lokalisation war vor allem bei K1-HA ausgeprägt. Es war aber auch vermehrt im perinukleären Raum der Zelle zu beobachten. Die DAPI-Färbung macht deutlich, dass sich in diesem Bereich auch die *viral factories* befinden, in welchen der Zusammenbau neuer Partikel und die virale DNA-Replikation stattfinden (siehe auch Abb. 2.2 B).

Um auszuschließen, dass der HA- oder V5-*tag* einen Einfluss auf die Lokalisation von K1 oder C7 hat, wurden MEF mit MVA-K1L oder MVA infiziert und nach 0, 2, 4 und 8 h p.i. wurden zytoplasmatische und nukleäre Proteinextrakte hergestellt. Die anschließende Western Blot-Analyse mit einem gegen K1 oder C7 gerichteten Antiserum (ungeeignet für Immunfluoreszenzfärbungen) zeigte, dass beide Proteine ohne *tag* ab 2 h p.i. sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma vorlagen (siehe Abb. 4.19 C und D). Diese Verteilung von K1 und C7 veränderte sich im Verlauf der Infektion nicht und reflektierte die Lokalisation der entsprechenden *getaggt*ten Proteine. Zusammengenommen kann durch diese Experimente kein in Tabelle 4.3 aufgeführter, möglicher Interaktionspartner von K1 oder C7 ausgeschlossen werden, da beide Proteine in der ganzen Zelle verteilt und nicht nur in bestimmten Kompartiment vorliegen.

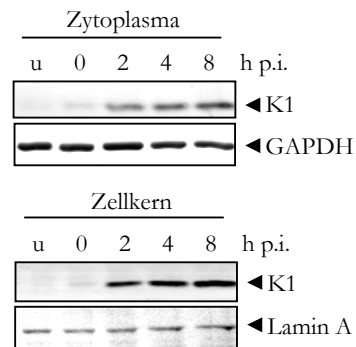
A



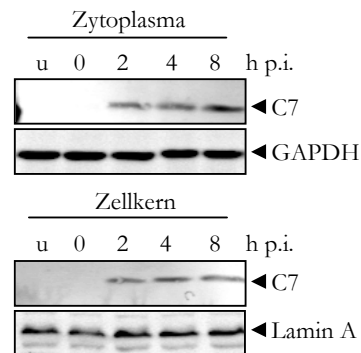
B



C



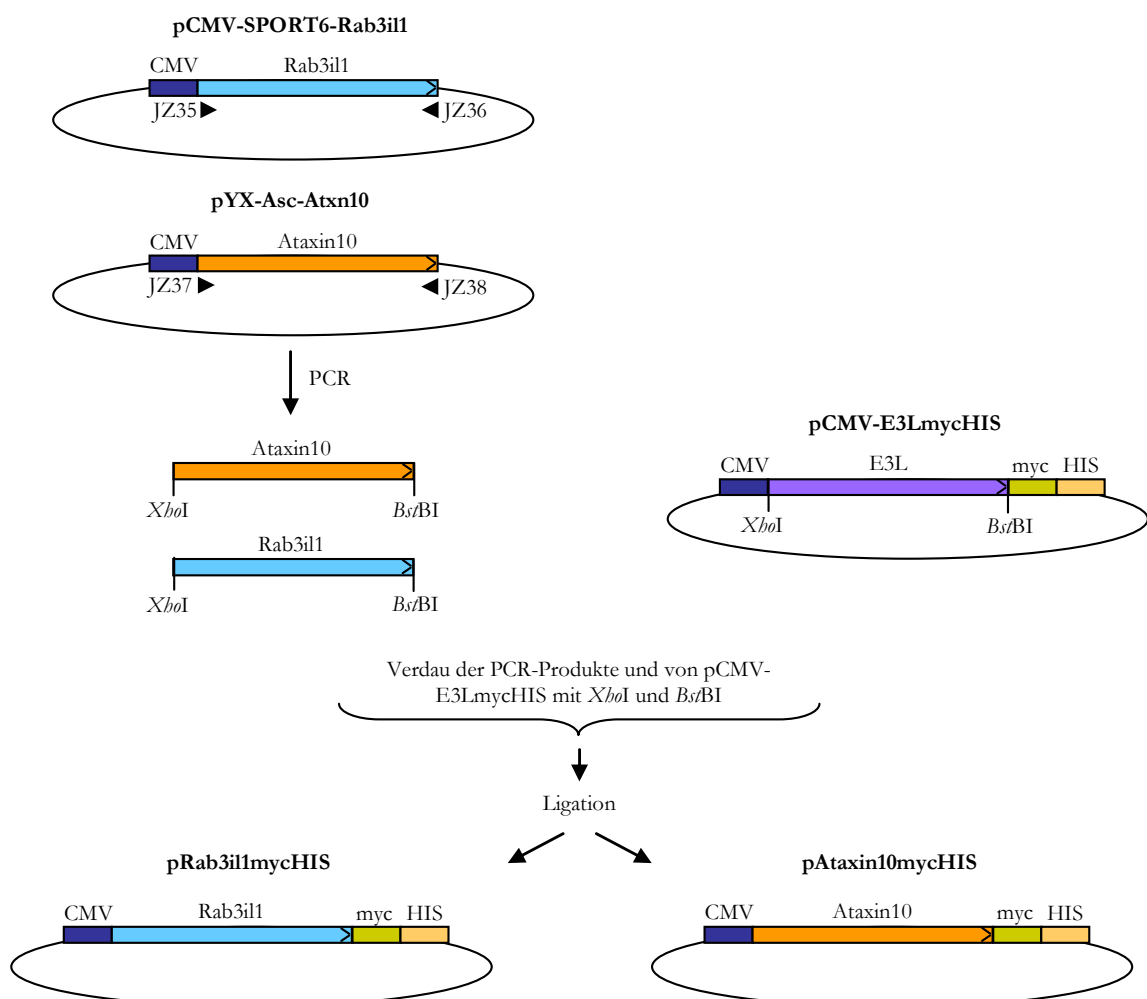
D



**Abb. 4.19 Lokalisationsstudien zu K1 und C7. A und B.** Immunfluoreszenzfärbung von K1-HA (A) und C7-V5 (B). HeLa-Zellen, auf Deckgläschen kultiviert, wurden mit dem entsprechenden Virus mit einer *moi* von 10 für 4 Stunden infiziert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Nach Anfärbung mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HA- oder V5-*tag* und einem entsprechenden AF488-gekoppelten sekundär-Antikörper wurden die Deckgläschen mit Einbettmedium, das DAPI enthält, auf Objektträgern fixiert und einen Tag später mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie analysiert. In der Abbildung sind repräsentative infizierte Zellen gezeigt. **C und D.** Western Blot-Analyse zytoplasmatischer und nukleärer Extrakte von MEF infiziert mit MVA-K1L (C) oder MVA (D). Protein-Extrakte, hergestellt 0, 2, 4 und 8 Stunden nach Infektion (h p.i.) wurden per SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und untersucht mit Antikörpern spezifisch gegen K1 (C) oder C7 (D) und GAPDH oder Lamin A als Ladekontrollen. Uninfizierte (U) Zellen dienten als Kontrolle.

#### 4.4.3 Co-Immunpräzipitierung von K1 und C7 mit den möglichen Interaktionspartnern

Für die Co-Immunpräzipitierung von K1-HA oder C7-V5 wurden Expressionsplasmide von den in Tabelle 4.3 aufgeführten Interaktionspartnern verwendet. Brg-1 (pBrg-1-HA), NCoR (pNCoR-Flag), Rnf10 (pRnf10-Flag) und RPC8 (pNCite-RPC8) wurden von Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt (siehe Abs. 3.1.9), wobei es sich bei letzterem um ein Expressionsplasmid für *E.coli* handelt, wodurch eine Umklonierung aufgrund des fehlenden eukaryotischen Promotors erforderlich war.

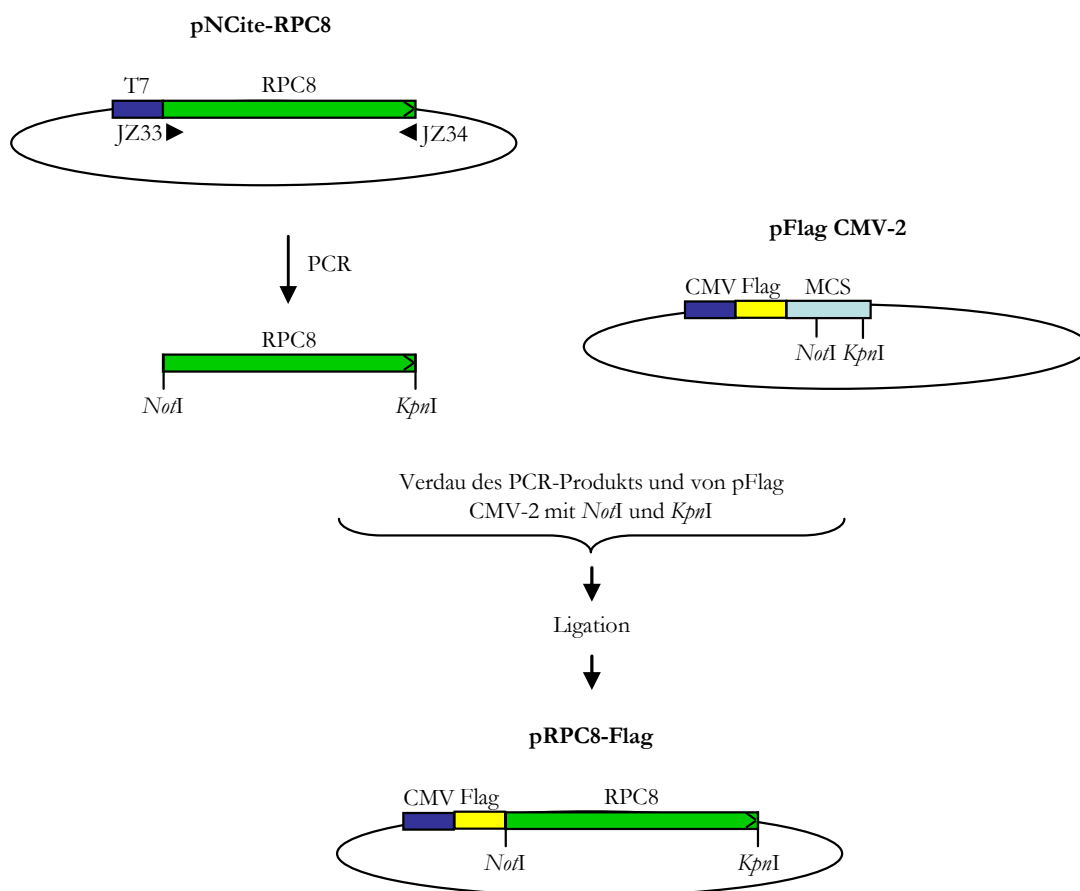


**Abb. 4.20 Klonierungen der Expressionsplasmide pRab3il1mycHIS und pAtaxin10mycHIS**  
 Rab3il1 und Ataxin10 wurden mit den *primern* (Pfeile) JZ35 und JZ36 bzw. JZ37 und JZ38 per PCR amplifiziert, wobei die Erkennungssequenz der *XhoI*- und *BstBI*-Restriktionsendonukleasen an die PCR-Produkte angefügt wurden. Nach Verdau der PCR-Produkte und des Zielvektors pCMV-E3LmycHIS, wurde eine Ligation durchgeführt, wodurch die gewünschten Vektoren entstanden. Die Expression wird durch den *immediate early*-Promotors des Cytomegalovirus (CMV) gesteuert. Die Proteine sind C-terminal mit einem myc- und HIS-*tag* fusioniert.



Für Rab3il1 und Ataxin10 wurden cDNA-Klone erworben (siehe Abs. 3.1.9), an welche durch eine Umklonierung eine *tag*-Sequenz angefügt wurde. Die Umklonierungen von RPC8, Rab3il1 und Ataxin10 sind schematisch in Abb. 4.20 und Abb. 4.21 dargestellt und werden im Folgenden beschrieben.

Rab3il1 wurde mit den *primern* JZ35 und JZ36, Ataxin10 mit JZ37 und JZ38 sowie RPC8 mit JZ33 und JZ34 mittels PCR amplifiziert. Im Falle von Rab3il1 und Ataxin10 wurden *XhoI*- und *BstBI*-, bei RPC8 *NoI*- und *KpnI*-Restriktionsschnittstellen durch die *primer* angefügt. Nach dem Verdau mit den entsprechenden Enzymen wurde Rab3il1 und Ataxin10 in den Vektor pCMV-E3LmycHIS (siehe Tabelle 3.9) eingefügt, sodass dadurch pRab3il1mycHIS und pAtxn10mycHIS entstanden. Hierbei wurden beide Gene mit einem C-terminalen myc- und HIS-*tag* versehen (siehe Abb. 4.20). RPC8 und pFlag CMV-2 (siehe Tabelle 3.9) wurden mit *NoI* und *KpnI* verdaut und anschließend ligiert, wobei pRPC8-Flag generiert wurde, das für RPC8 mit einem N-terminalen Flag-*tag* kodiert (siehe Abb. 4.21).

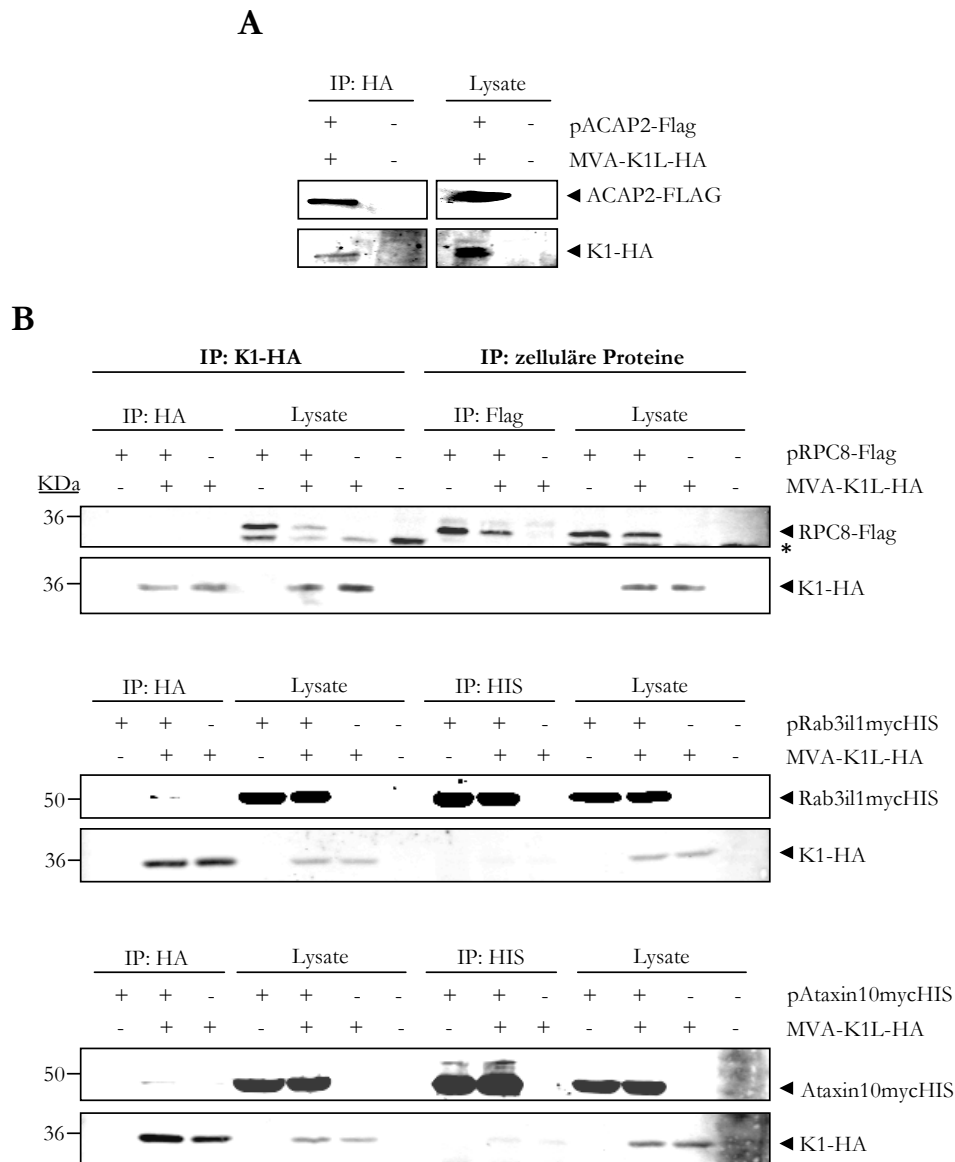


**Abb. 4.21 Klonierung des Expressionsplasmids pRPC8-Flag.** Für die Klonierung von pRPC8-Flag wurde RPC8 mit JZ33 und JZ34 mittels PCR amplifiziert, wodurch die Restriktionsschnittstellen *NoI* und *KpnI* mit angefügt wurden. Diese Schnittstellen befinden sich auch in der *multiple cloning site* (MCS) von pFlag CMV-2, das nach Restriktionsverdau mit RPC8 ligiert wurde. Die Expression wird durch den *immediate early* Promotors des Cytomegalovirus (CMV) gesteuert. Das Protein ist N-terminal mit einem Flag-*tag* fusioniert.

Die Sequenzen der fertigen Plasmide wurden durch eine Sequenzierung (siehe Abs. 3.2.2.13) überprüft und die Expression wurde in verschiedenen Zellen getestet (nicht gezeigt da auch in Abb. 4.22 B zu sehen).

Eine Interaktion von K1 mit dem zellulären Protein ACAP2 ist bereits beschrieben (Bradley and Terajima, 2005). Diese hat jedoch keinen Einfluss auf die Funktion von K1, die späte Genexpression in bestimmten Zellen zu ermöglichen (Meng and Xiang, 2006). ACAP2 wurde hier genutzt, um die geeigneten Versuchsbedingungen für die Co-Immunpräzipitierung zu definieren, und diente in weiteren Ansätzen als Positivkontrolle. Hierfür wurde ein Expressionsplasmid, welches ACAP2 mit einem Flag-*tag* kodiert (pACAP2-Flag), genutzt (siehe Abs. 3.1.9) und in 293T-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen mit MVA-K1L-HA mit einer *moi* von 10 infiziert. Weitere 5 Stunden später wurden Proteinlysate hergestellt und über Nacht mit einer Affinitätsmatrix inkubiert, an welche Antikörper kovalent gebunden sind, die gegen den HA-*tag* gerichtet sind. Damit sollte K1-HA gebunden und ACAP2-Flag co-präzipitiert werden (siehe Abs. 3.2.3.8). Die Eluate wurden anschließend mittels Western Blot-Analyse untersucht. Das Ergebnis zeigt, dass ACAP2-Flag mit K1-HA co-präzipitiert wurde (siehe Abb. 4.22 A). Dies bedeutet nicht nur, dass die optimalen Bedingungen gefunden wurden, sondern auch, dass der HA-*tag* die Interaktion von K1 mit ACAP2 nicht beeinträchtigt.

Für die folgenden Co-Immunpräzipitierungen wurden die Expressionsplasmide, welche für mögliche Interaktionspartner von K1 kodieren, in 293T-Zellen transfiziert, während die Expressionsplasmide, welche für mögliche Interaktionspartner von C7 kodieren, in BHK-21-Zellen transfiziert wurden. Am darauf folgenden Tag wurden die 293T-Zellen mit MVA-K1L-HA und die BHK-21-Zellen mit MVA-C7L-V5 mit einer *moi* von 10 infiziert und 5 h p.i. wurden Proteinlysate hergestellt. Als Kontrollen dienten hierbei jeweils Zellen, die nur transfiziert oder nur infiziert wurden. Die Co-Immunpräzipitierungen wurden wechselseitig durchgeführt, d.h. einerseits wurde K1-HA bzw. C7-V5 präzipitiert, andererseits wurden die potentiellen Interaktionspartner präzipitiert (siehe Abs. 3.2.3.8). Die Eluate wurden daraufhin mittels Western Blot-Analyse untersucht (siehe Abb. 4.22 B für K1-HA und Abb. 4.23 für C7-V5). Wie in beiden Abbildungen zu erkennen, konnten sowohl K1-HA bzw. C7-V5 als auch die möglichen Interaktionspartner erfolgreich (mit Hilfe der Matrix aus dem jeweiligen Lysat) präzipitiert werden. Jedoch konnte in keinem Fall der jeweilige Interaktionspartner co-präzipitiert werden.



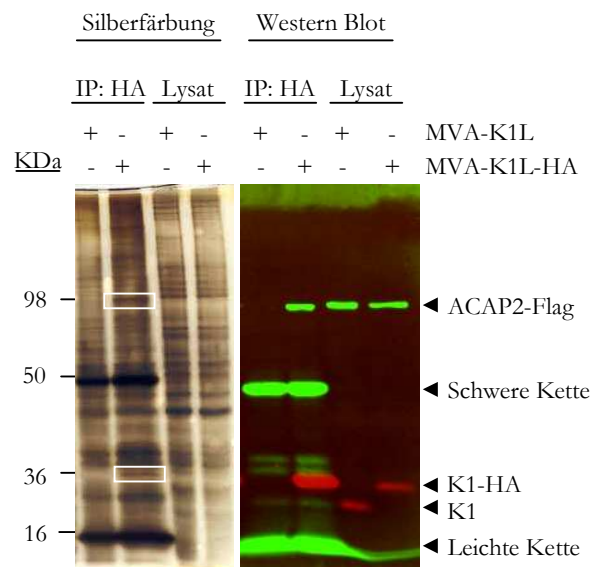
**Abb. 4.22 Co-Immunpräzipitierungen (Co-IP) von K1-HA mit den potentiellen zellulären Interaktionspartnern.** Die angegebenen Expressionsplasmide, kodierend für die möglichen Interaktionspartner von K1, wurden in 293T-Zellen transfiziert. Nach 24 Stunden wurde mit MVA-K1L-HA mit einer *moi* von 10 infiziert und weitere 5 Stunden später wurden Proteinlysate hergestellt. Als Kontrolle für die erfolgreiche Durchführung der Co-IP diente die bereits bekannte Interaktion zwischen K1 und ACAP2 (A). Bei den Co-IP mit den potentiellen Interaktionspartnern dienten jeweils Ansätze, die nur einen der beiden Interaktionspartner enthielten, als Kontrolle (B). D. h. entweder wurden nur die möglichen Interaktionspartner transfiziert oder nur mit MVA-K1L-HA infiziert. Nach der Co-IP wurden Western Blot-Analysen durchgeführt, die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferiert und mit Antikörpern detektiert, welche gegen den jeweiligen *tag* gerichtet sind. Die Größenangaben sind in kDa. Der Stern (\*) zeigt eine unspezifische Bande an (B).

Die direkte Untersuchung eines Teils der Lysate, welche für die Co-Immunpräzipitierung genutzt wurden, zeigte, dass grundsätzlich alle Proteine in den Lysaten vorlagen. Eine Ausnahme bildet jedoch NCoR-Flag, bei welchem in den Lysaten keine Bande zu sehen war. Jedoch wurde bei der Präzipitierung eine deutliche Bande detektiert (siehe Abb. 4.23). Dies hängt vermutlich mit der Größe von NCoR von ca. 250 kDa zusammen und der damit verbundenen schlechteren Effizienz bei dem Transfer aus dem SDS-Gel auf



durchgeführt. Daraufhin wurde eine Proteinfärbung des Gels und eine massenspektrometrischer Analyse von co-präzipitierten Proteinen, die aus dem SDS-Gel ausgeschnitten wurden, durchgeführt (siehe Abs. 3.2.4).

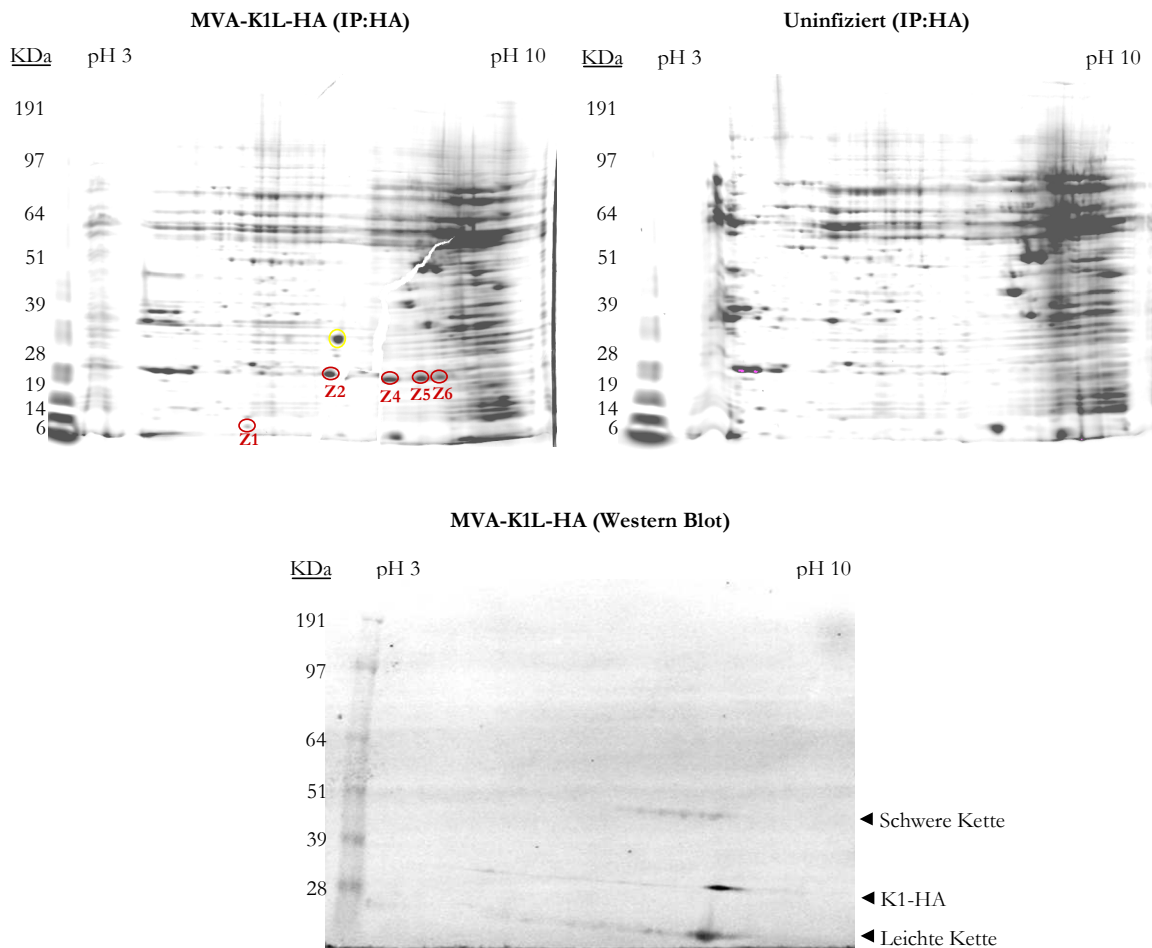
Zunächst wurde dies für die bekannte Interaktion zwischen K1 und ACAP2 als Kontrollexperiment durchgeführt. 293T-Zellen wurden mit pACAP2-Flag transfiziert und einen Tag später mit MVA-K1L-HA oder MVA-K1L als Kontrolle mit einer  $moi$  von 10 infiziert. Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-Immunpräzipitierung wurde durchgeführt. Die Eluate wurden anschließend zu gleichen Teilen in zwei SDS-Gele geladen, wovon bei einem Gel die Proteine per sensitiver Silberfärbung sichtbar gemacht wurden (Abs. 3.2.3.10.1). Mit dem zweiten Gel wurde mittels Western Blot-Analyse ACAP2-Flag und K1-HA detektiert (siehe Abb. 4.24).



**Abb. 4.24 Vergleichende Analyse der Co-Immunpräzipitierung von K1-HA und ACAP2-Flag mittels Proteinfärbung und Western Blot-Analyse.** 293T-Zellen wurden mit pACAP2-Flag transfiziert und 24 Stunden später mit MVA-K1L-HA mit einer  $moi$  von 10 infiziert. Fünf Stunden nach Infektion (h p.i.) wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-IP wurde mit einer Affinitätsmatrix, die einen Antikörper gegen den HA-tag kovalent gebunden hat, durchgeführt. Die Hälfte der Proben wurde nach der SDS-PAGE für eine Western Blot-Analyse genutzt, wobei mit einem HA-tag- und einem Flag-tag-Antikörper ACAP2-Flag bzw. K1-HA detektiert wurden. Die andere Hälfte wurde per SDS-PAGE separiert, wobei anschließend die Proteine im SDS-Gel via Silberfärbung angefärbt wurden. Die Größenangaben sind in Kilodatton (KDa). Bei ca. 100 KDa ist eine Bande in der Silberfärbung zu sehen, welche ACAP2-Flag entspricht und bei ca. 36 KDa eine Bande, die K1-HA darstellt (beide weiß eingrahmt).

Durch einen weißen Rahmen sind K1-HA und ACAP2-Flag in dem gefärbten Gel markiert, welche sich auf derselben Höhe befinden wie die per Antikörper detektierten der Wester Blot-Analyse. Allerdings sind viele weitere Proteinbanden zu erkennen, die offenbar von Proteinen stammen, welche unspezifisch mit der Affinitätsmatrix interagierten. Diese und auch die schwere und leichte Kette des Antikörpers könnten Banden von spezifischen Interaktionspartnern überdecken. Aus diesem Grund wurde in

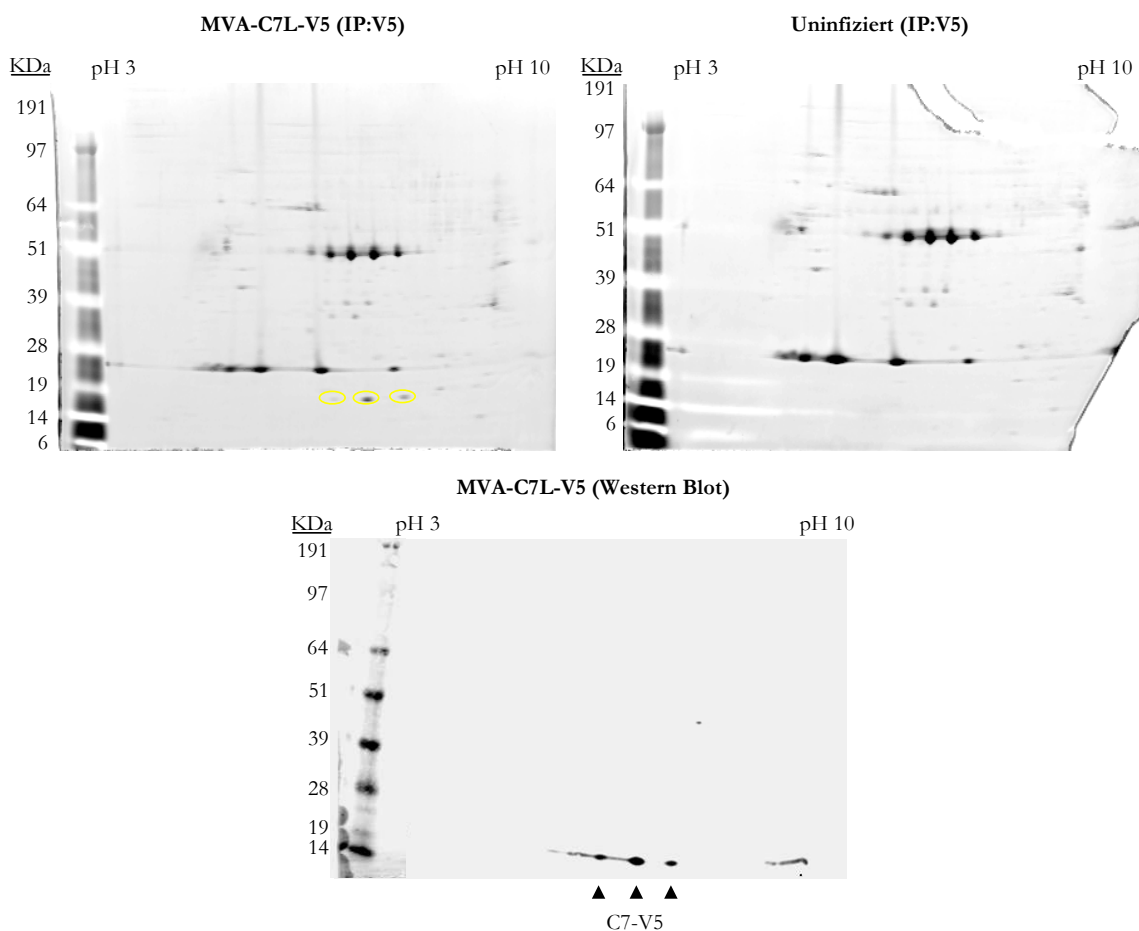
den folgenden Experimenten eine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, wobei Proteine zunächst nach ihrem isoelektrischen Punkt und dann nach ihrer Größe getrennt werden (Abs. 3.2.3.11). NIH-3T3-Zellen wurden mit einer *moi* von 10 mit MVA-K1L-HA oder MVA-C7L-V5 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen.



**Abb. 4.25 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit K1-HA co-immunpräzipitierten Proteinen.**  $1 \times 10^9$  NIH-3T3-Zellen wurden mit MVA-K1L-HA mit einer *moi* von 10 infiziert oder uninfiziert belassen. Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-Immünpräzipitierung erfolgte mit einer Affinitätsmatrix, die den Antikörper gegen den HA-tag gekoppelt hat. Daraufhin wurden eine IEF, eine SDS-PAGE und schließlich eine Sypro-Ruby-Färbung durchgeführt. Eingekreiste Proteinpunkte wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie identifiziert. Der gelb umrandete Proteinpunkt wurde als K1-HA identifiziert. Rot umrandete Proteinpunkte stellen potentielle Interaktionspartner dar. Mit einem Teil der Proben wurde nach der IEF eine Western Blot-Analyse durchgeführt und K1-HA wurde mit einem Antikörper für den HA-tag detektiert. Die Größenangaben sind in Kilodatton (kDa).

Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die jeweiligen viralen Proteine (K1-HA oder C7-V5) präzipitiert. Nach der isoelektrischen Fokussierung (IEF) der Eluate folgte die SDS-PAGE und Proteinfärbung per Sypro-Ruby-Färbung (siehe Abs. 3.2.3.10.2), deren Sensitivität mit einer Silberfärbung vergleichbar ist, jedoch einen besseren Kontrast bot für das etwaige Ausschneiden von co-präzipitierten Proteinen. Weiterhin wurde ein Teil der Proben für eine IEF verwendet, welche nach SDS-PAGE

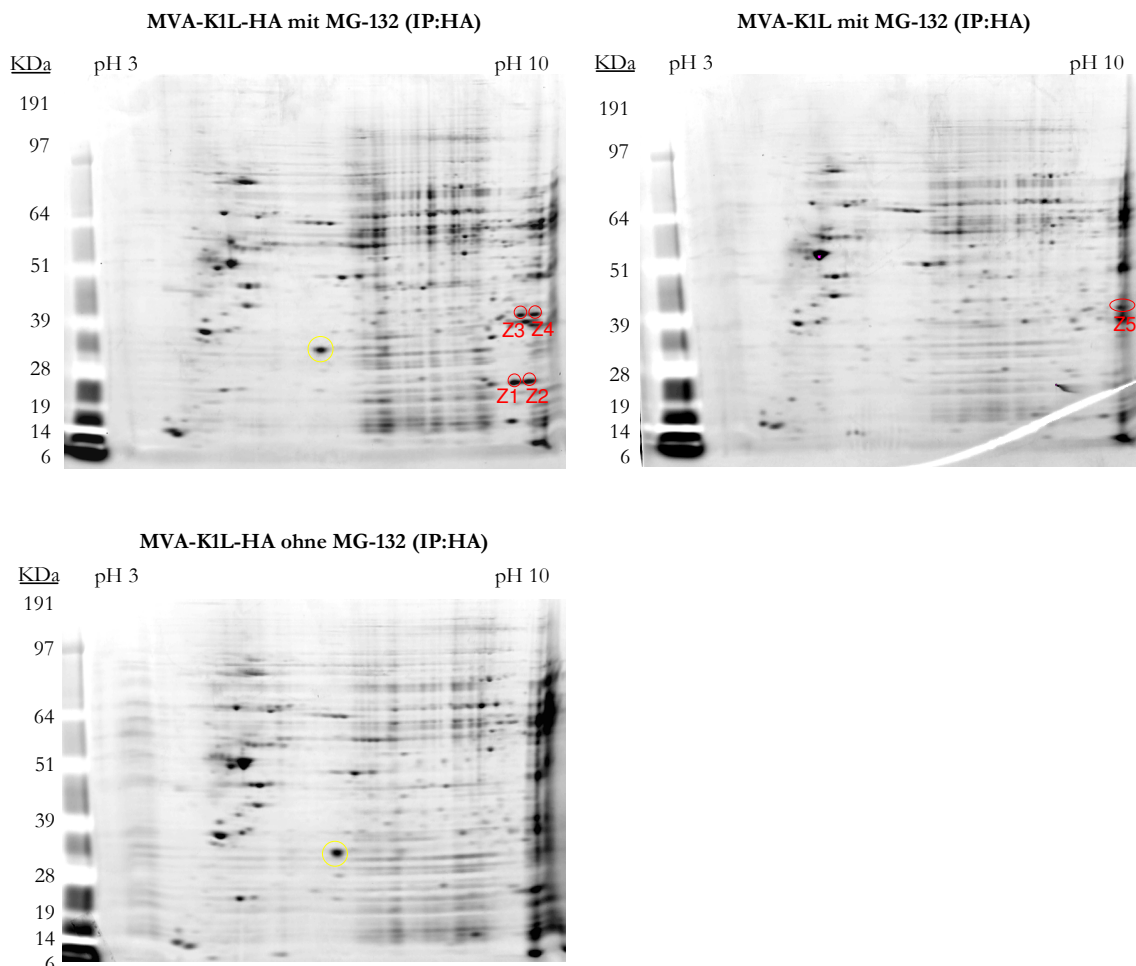
per Western Blot analysiert wurde. Wie in den Abb. 4.25 und Abb. 4.26 zu erkennen, wurden K1-HA bzw. C7-V5 präzipitiert (gelb eingekreiste Proteinpunkte; auch in nachfolgenden Abb.). Die Proteinpunkte wurden massenspektrometrisch überprüft und sind auch jeweils auf dem Western Blot zu sehen. C7-V5 wird dem pH-Wert nach in drei Proteinpunkte getrennt (siehe Abb. 4.26). Dies könnte durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierungen oder Acetylierungen, aber auch artifiziell bei der Probenaufbereitung durch Deamidierung bedingt sein (Immler *et al.*, 1998; Sarioglu *et al.*, 2000). Rot eingekreiste Proteinpunkte, die sich nur bei der Co-Immünpräzipitierung mit K1-HA fanden, sind potentielle Interaktionspartner (siehe Abb. 4.25).



**Abb. 4.26 2D-gel electrophoretische Analyse von mit C7-V5 co-immunpräzipitierten Proteinen.**  $1 \times 10^9$  NIH-3T3-Zellen wurden mit MVA-C7L-V5 mit einer *moi* von 10 infiziert oder uninfiziert belassen. Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-Immünpräzipitierung erfolgte mit einer Affinitätsmatrix, die den Antikörper gegen den V5-*tag* gekoppelt hat. Daraufhin wurden eine IEF, eine SDS-PAGE und schließlich eine Sypro-Ruby-Färbung durchgeführt. Eingekreiste Proteinpunkte wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie identifiziert. Die gelb umrandeten Proteinpunkte wurden als C7-V5 identifiziert. Mit einem Teil der Proben wurde nach der IEF eine Western Blot-Analyse durchgeführt und C7-V5 wurde mit einem Antikörper für den V5-*tag* detektiert. Die Größenangaben sind in Kilodaton (kDa).

Diese wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (siehe Abs. 3.2.4). Jedoch ergab sich für die ausgeschnittenen Proteine abgesehen von K1-HA oder C7-V5

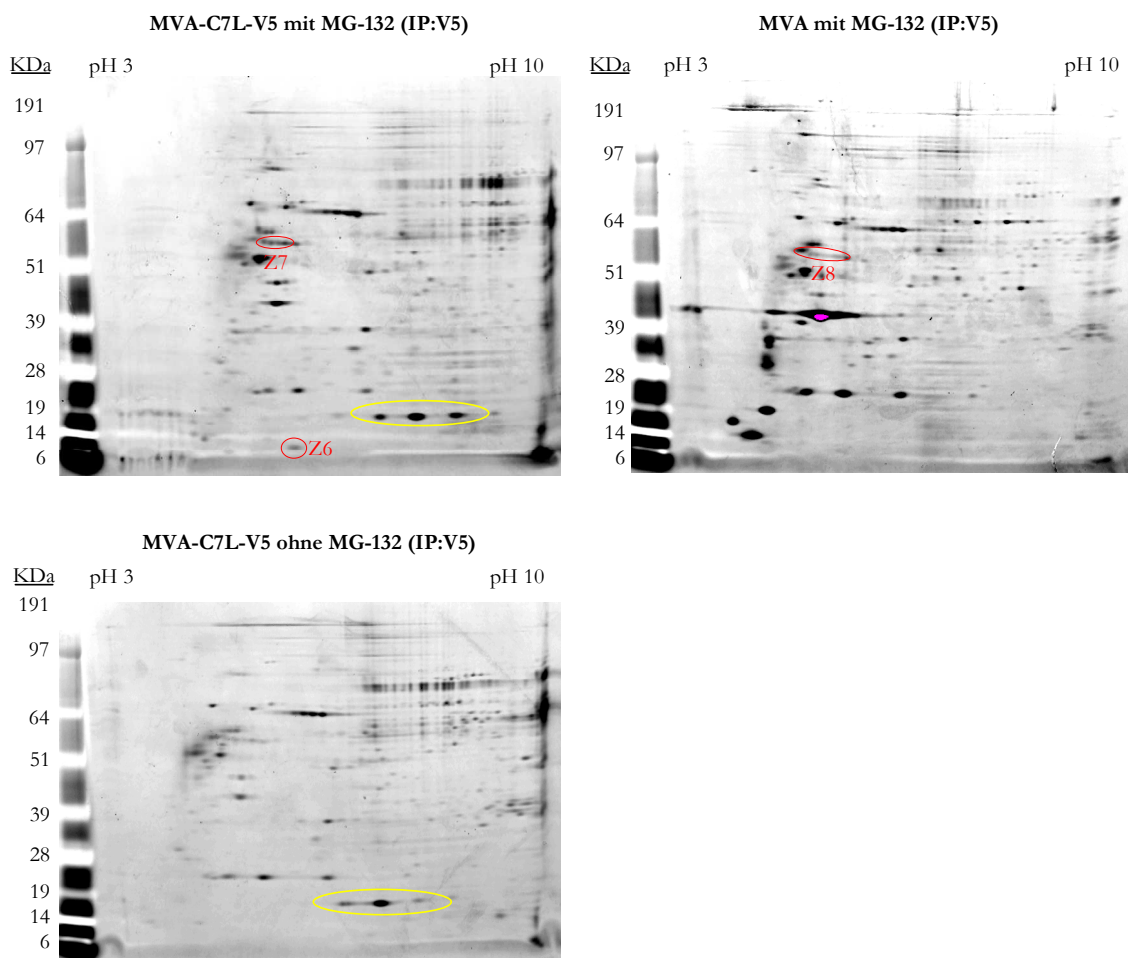
keine Übereinstimmung mit der verwendeten Protein-Datenbank. Dies könnte mit einer unzureichenden Entschlüsselung der Aminosäuresequenz aufgrund einer zu niedrigen Peptidmenge zusammenhängen (persönliche Kommunikation mit Dr. Andreas Reuter, Paul-Ehrlich-Institut). Alle anderen angefärbten Proteine, die auch auf dem Kontrollgel zu sehen waren, stellen unspezifisch mit der Affinitätsmatrix interagierende Proteine dar. Eine Möglichkeit, weshalb kein Interaktionspartner detektierbar war, besteht darin, dass K1 oder C7 für dessen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System sorgen. Andere VACV-Proteine, die wie K1 Ankyrin-*Repeats* in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen, können auf diese Art und Weise wirken, wie beispielsweise CP77, welches K1 funktional ersetzen kann (Chang *et al.*, 2009), oder das 68k-Protein (Sperling *et al.*, 2008).



**Abb. 4.27 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit K1-HA co-immunpräzipitierten Proteinen bei gleichzeitiger Inhibition des proteasomalen Abbaus zur Stabilisierung möglicher Interaktionspartner.**  $2 \times 10^7$  NIH-3T3-Zellen wurden mit einer *moi* von 10 mit MVA-K1L-HA oder MVA-K1L infiziert, die mit oder ohne  $10 \mu\text{M}$  des Proteasom-Inhibitors MG-132 behandelt wurden. Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-Immünpräzipitierung erfolgte mit einer Affinitätsmatrix, die den Antikörper gegen den HA-*tag* gekoppelt hat. Daraufhin wurden eine IEF, eine SDS-PAGE und schließlich eine Sypro-Ruby-Färbung durchgeführt. Einkreiste Proteinpunkte wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie identifiziert. Der gelb umrandete Proteinpunkt wurde als K1-HA identifiziert. Rot umrandete Proteinpunkte stellen potentielle Interaktionspartner dar. Die Größenangaben sind in Kilodaton (kDa).



Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die Infektionen in Anwesenheit eines Proteasominhibitors durchgeführt. Bei diesen Experimenten wurden NIH-3T3-Zellen mit MVA-K1L-HA bzw. MVA-C7L-V5 in An- und Abwesenheit des Inhibitors (MG-132) infiziert. Als Kontrolle für MVA-C7L-V5 wurden Zellen mit MVA infiziert und als Kontrolle für MVA-K1L-HA dienten MVA-K1L infizierte Zellen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Abb. 4.27 und Abb. 4.28 dargestellt. Prinzipiell waren durch die Inhibierung des Proteasoms nur wenige Proteinpunkte sichtbar, die auf den Kontrollgelen nicht zu sehen waren (z.B. Abb. 4.28 Nr. Z6). Die rot eingekreisten Proteinpunkte wurden wiederum ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht.



**Abb. 4.28 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit C7-V5 co-immunpräzipitierten Proteinen bei gleichzeitiger Inhibition des proteasomalen Abbaus zur Stabilisierung möglicher Interaktionspartner.**  $2 \times 10^7$  NIH-3T3-Zellen wurden mit einer *moi* von 10 mit MVA-C7L-V5 oder MVA infiziert, die mit oder ohne  $10 \mu\text{M}$  des Proteasom-Inhibitors MG-132 behandelt wurden. Nach 5 Stunden wurden Proteinlysate hergestellt und die Co-Immünpräzipitierung erfolgte mit einer Affinitätsmatrix, die den Antikörper gegen den V5-*tag* gekoppelt hat. Daraufhin wurden eine IEF, eine SDS-PAGE und schließlich eine Sypro-Ruby-Färbung durchgeführt. Einkreiste Proteinpunkte wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie identifiziert. Die gelb umrandeten Proteinpunkte wurden als C7-V5 identifiziert. Rot umrandete Proteinpunkte stellen potentielle Interaktionspartner dar. Die Größenangaben sind in Kilodaton (KDa).

Die Proteinpunkten, die vermeintlich auch auf dem Kontrollgel zu sehen waren, wurden zur Prüfung ebenfalls aus dem Kontrollgel ausgeschnitten und bestimmt (siehe Abb. 4.28 Nr. Z7 und Z8 als Kontrolle bzw. Abb. 4.27 Nr. Z3, Z4 und Z5 als Kontrolle). Die massenspektrometrische Analyse erbrachte nur für Proteinpunkt Z7 (Abb. 4.28) eine Übereinstimmung mit der Protein-Datenbank, welcher als *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K* (HNRPK) identifiziert wurde (Identifikations-Nr. P61979; Siehe 7.1). Dieses Ergebnis konnte jedoch bei Wiederholung des Versuchs nicht reproduziert werden (nicht gezeigt).

#### **4.5 Untersuchungen zur möglichen Wiederherstellung der Replikation von MVA in humanen und murinen Zellen durch K1L und F11L**

Die vorangegangenen Abschnitte beschäftigten sich mit der Charakterisierung und Aufklärung der Funktion der *host-range*-Gene K1L und C7L. Der nun folgende Abschnitt geht der Frage nach, welches Gen neben K1L in MVA verloren gegangen ist, das für den eingeschränkten Wirtstropismus verantwortlich ist. Die Reinsertion eines funktionalen K1L-Gens in das MVA-Genom erweitert den Wirtstropismus von MVA nur auf RK-13-Zellen (Carroll and Moss, 1997). In den meisten anderen Zellen muss also ein anderer viraler Faktor für die Replikationsfähigkeit verantwortlich sein.

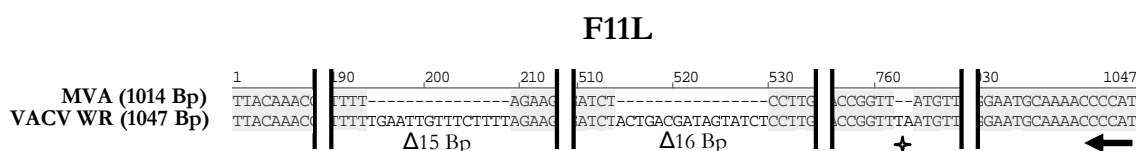
Interessanterweise bedingt der *knock-down* von F11L in VACV WR infizierten HeLa-Zellen einen Defekt des Virionenzusammenbaus, der zu unreifen, nicht-infektiösen Vorläuferformen der Viruspartikel führt. Dieser Defekt ist auch bei einer MVA-Infektion von u.a. HeLa-Zellen zu beobachten (Sutter and Moss, 1992; Valderrama *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigte sich, dass eine VACV WR F11L-Deletionsmutante einen kleineren Plaque-Phänotyp in BSC-40- (Morales *et al.*, 2008) und BS-C-1-Zellen (Cordeiro *et al.*, 2009) aufweist, was auf eine eingeschränkte Virusreplikation oder Ausbreitung hinweist. Diese Beobachtungen ließen die Hypothese zu, dass die Insertion von F11L, das in MVA nicht funktional ist, den Wirtsbereich auf humane und murine Zellen erweitern könnte. Der folgende Abschnitt untersucht, ob die Insertion von F11L alleine oder in Kombination mit K1L den Wirtstropismus von MVA auf humane und murine Zellen erweitern kann.

#### 4.5.1 Generierung und Charakterisierung von MVA-F11L und MVA-F11L-K1L

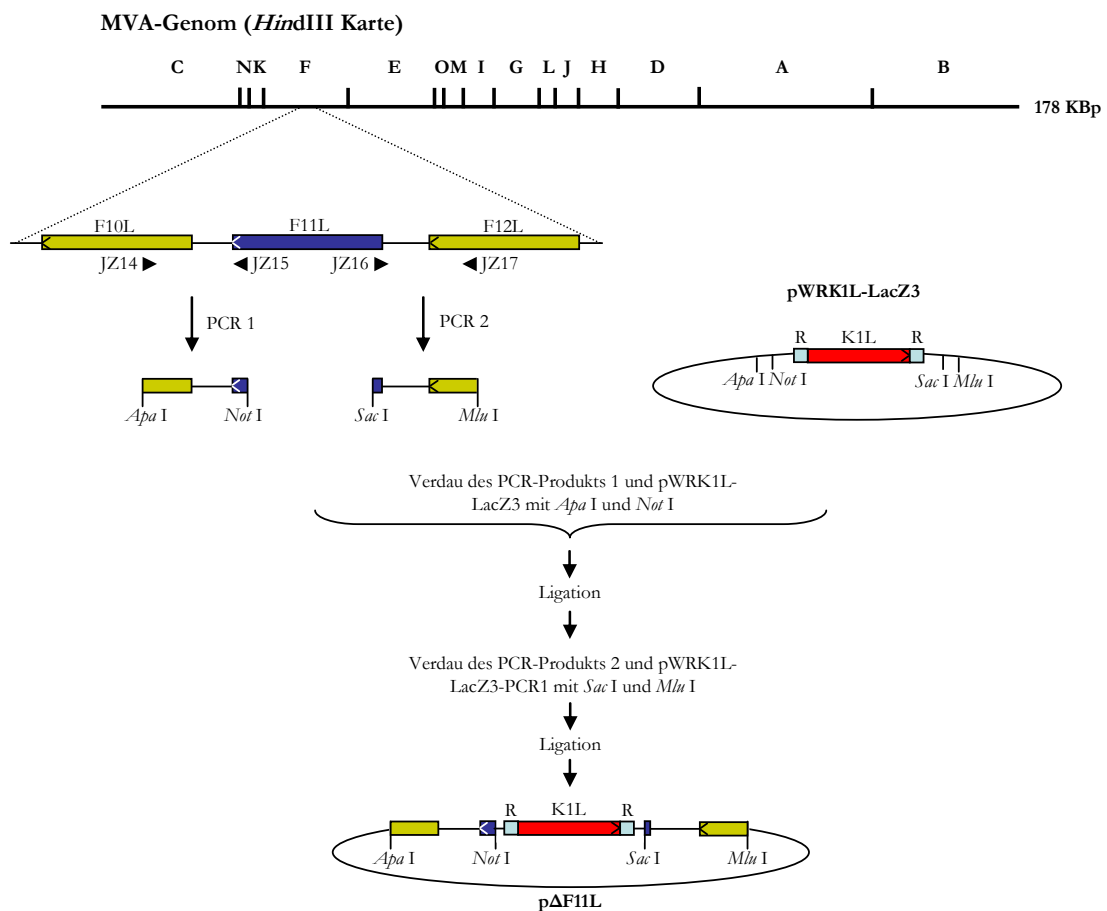
Die Sequenz des F11L-Gens ist in MVA zum Großteil erhalten geblieben. Im Vergleich zur F11L-Sequenz von VACV WR weist sie jedoch drei Deletionen auf, wovon eine zu einem Rasterschub führt. Dadurch entsteht ein Stopp-Codon, welches vermutlich ein frühzeitiges Abbrechen der Translation und somit ein nicht funktionales verkürztes Protein bedingt (siehe Abb. 4.29 A).

Vor der Herstellung eines MVA mit funktionalem F11L, erfolgte zunächst die Deletion der MVA-eigenen F11L-Sequenz. Auf diese Weise sollte verhindert werden, dass es zwischen diesem Sequenzabschnitt und dem zu inserierenden vollständigen F11L-Gen (aus VACV WR) zu Rekombinationsereignissen kommt. In das so entstandene F11L-defiziente MVA (MVA $\Delta$ F11L) wurde anschließend F11L allein oder zusammen mit K1L inseriert. Die Klonierungsstrategie, mit welcher das Plasmid zur Deletion der F11L-Restsequenz in MVA (p $\Delta$ F11L) generiert wurde, ist in Abb. 4.29 B gezeigt. In zwei getrennten PCR wurden stromabwärts bzw. -aufwärts der F11L-Sequenz gelegene DNA-Abschnitte amplifiziert. Gleichzeitig wurden durch die *Primer* Restriktionsschnittstellen an die Amplifikate angefügt, über welche diese in den pWRK1L-LacZ3-Vektor ligiert werden konnten. Das resultierende Plasmid p $\Delta$ F11L ermöglichte es, die F11L-Restsequenz mittels homologer Rekombination durch das K1L-Gen zu ersetzen, welches als Selektionsmarker für das Wachstum in RK-13-Zellen fungierte. Dabei wurden 89 Bp am 3'-Ende des F11L ORF erhalten, um die Promotor-Region des angrenzenden Gens (F10L) nicht zu deletieren, welche vermutlich schon in der F11L-Sequenz beginnt (Broyles, 2003). Zur MVA $\Delta$ F11L-Generierung wurden BHK-21-Zellen mit MVA infiziert und anschließend mit p $\Delta$ F11L transfiziert. Virusklone, bei welchen eine Rekombination und somit auch eine Deletion der F11L-Restsequenz stattgefunden hatte, wurden durch mehrere Passagen in RK-13-Zellen selektioniert (siehe Abs. 3.2.6.2). Nachdem das Wildtyp-Virus per PCR nicht mehr nachweisbar war, wurden Passagen in CEF durchgeführt, in welchen das K1L-Gen nicht mehr für eine produktive Infektion benötigt wird.

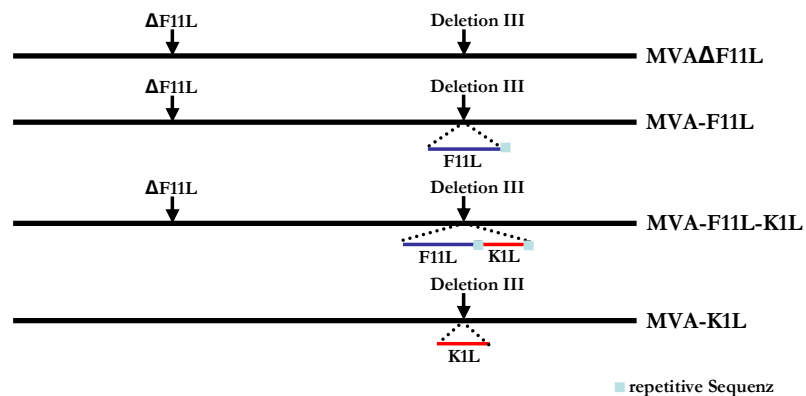
**A**



B



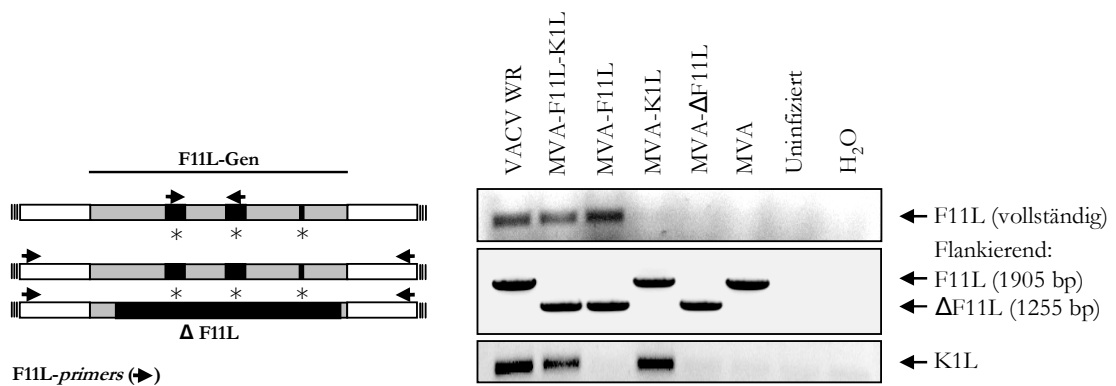
C



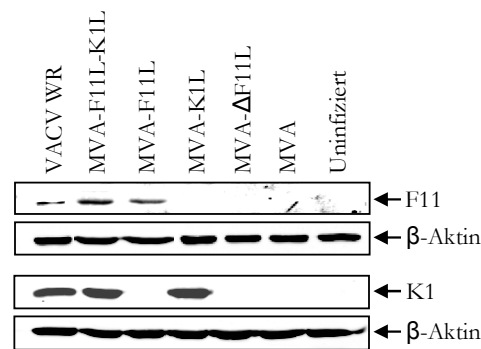
**Abb. 4.29 Generierung von MVAΔF11L, MVA-F11L und MVA-F11L-K1L.** **A.** *Alignment* der F11L-Sequenz von MVA und VACV WR. Das F11L-Gen ist im MVA-Genom um 33 Bp gegenüber dem F11L-Gen in VACV WR verkürzt. Gezeigt sind eine 15 Bp-, eine 16 Bp- und eine 2 Bp-Deletion, wovon letztere eine *nonsense*-Mutation ist (Stern). Pfeil: Start-Codon. **B.** Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Generierung von pΔF11L. Über die *Primer* (Pfeile) JZ14 und JZ15, bzw. JZ16 und JZ17 wurden 500 Bp große DNA-Fragmente per PCR mit MVA-DNA als Matrize amplifiziert, sodass die durch die *Primer* angefügten Restriktionsschnittstellen nach Inkubation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen eine Ligation mit pWRK1L-LacZ3 erlaubten. Das resultierende Plasmid hat die K1L-Sequenz als Selektionsmarker, flankiert von repetitiven Sequenzen (R), und die Sequenz stromabwärts und –aufwärts von F11L in MVA für die Integration durch homologe Rekombination. **C.** Schematische Darstellung der rekombinanten Virusgenome. Der F11L-Lokus wurde wie im Text beschrieben deletiert (ΔF11L). In die Deletion III (natürlich vorhanden in MVA) wurde das vollständige F11L-Gen alleine oder in Kombination mit K1L inseriert. Die hellblauen Kästchen stellen die repetitiven Sequenzen dar, welche die K1L-Sequenz flankieren.

Durch die repetitiven Sequenzen zu beiden Seiten der K1L-Sequenz wurde eine Rekombination ermöglicht, die zur Deletion von K1L führte, sodass bei MVA $\Delta$ F11L nur die F11L-Restsequenz deletiert ist. In dieses Virus wurde die Sequenz von F11L, amplifiziert aus VACV WR, in die natürliche Deletion III inseriert. Hierfür wurde das Plasmid pGSV23-F11L genutzt (siehe Abb. 4.15 und Abs. 3.1.9) und mit der gleichen Methodik (K1L-Selektion in RK-13-Zellen; siehe Abs. 3.2.6.2) die Viruskclone selektioniert, welche F11L inseriert hatten.

A



B



**Abb. 4.30 Charakterisierung von MVA $\Delta$ F11L, MVA-F11L und MVA-F11L-K1L.** **A.** PCR-Analyse viraler DNA, extrahiert aus mit VACV WR-, MVA-F11L-K1L-, MVA-F11L-, MVA-K1L-, MVA $\Delta$ F11L- oder MVA-infizierten CEF (moi 10). DNA aus uninfizierten Zellen diente als Kontrolle. Abb. rechts oben: Überprüfung des vollständigen F11L-Gens durch *Primer*, die in den deletierten Bereichen der F11L-Restsequenz von MVA binden. Rechts mitte: Überprüfung des F11L-Originalloкус durch *Primer*, die 479 Bp stromaufwärts und 412 Bp stromabwärts des F11L ORFs binden. Rechts unten: K1L-spezifische PCR-Fragmente. Links: Schematische Darstellung des F11L-Lokus und der für die PCR-Analysen genutzten *Primer* (Pfeile). Die schwarzen Bereiche stellen Deletionen dar, wobei die bereits in MVA deletierten Bereiche zusätzlich mit Sternchen gekennzeichnet sind. **B** Analyse der F11- und K1-Expression der rekombinanten MVA. HeLa-Zellen wurden mit den unter A. angegebenen Viren mit moi 5 infiziert oder nicht infiziert. Proteinlysate wurden 5 Stunden nach Infektion (h p.i.) hergestellt. Diese wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit für F11 und K1 spezifischen Antikörpern.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

Nachdem das Ausgangsvirus (MVA $\Delta$ F11L) nicht mehr nachweisbar war, wurde dann das Virus in CEF passagiert, sodass die K1L-Sequenz durch homologe Rekombination der flankierenden repetitiven Sequenzen deletiert wurde und daraus MVA-F11L entstand. Um MVA-F11L-K1L zu erhalten, wurde alternativ ein Teil des Virus ohne CEF-Passagierung direkt in RK-13-Zellen amplifiziert, sodass K1L erhalten blieb. Eine schematische Übersicht der Viren ist in Abb. 4.29 C zu sehen.

Die generierten Viren erfuhren eine Charakterisierung auf genomischer Ebene mittels PCR (siehe Abb. 4.30 A). Hierbei wurde mit *Primern* (JZ10 und JZ11), die in dem Bereich der inserierten F11L-Sequenz binden, welche in der F11L-Restsequenz von MVA fehlt, spezifisch das vollständige F11L-Gen nachgewiesen. Über *Primer* (JZ14 und JZ17), die stromabwärts und –aufwärts der F11L-Restsequenz in MVA binden, wurde die Deletion dieser Sequenz durch Analyse von Größenunterschieden der entstehenden PCR-Produkte überprüft (siehe Abb. 4.30 A, Mitte). Schließlich wurde das Vorhandensein der K1L-Sequenz durch *Primer* getestet, welche in der Sequenz von K1L binden (K1Lint1 und -2). Alle rekombinanten Viren zeigten die zu erwarteten Banden, was bedeutet, dass die gewünschte Deletion der F11L-Restsequenz bzw. die Insertion des vollständigen F11L-Gens erfolgreich war. Die Expression von F11 und K1 wurde per Western Blot-Analyse überprüft (siehe Abb. 4.30 B). Hierfür wurden HeLa-Zellen mit den unterschiedlichen Viren mit einer *moi* von 5 infiziert und 5 h p.i. Proteinlysate hergestellt. Wie erwartet, wurde F11 bei MVA-F11L, MVA-F11L-K1L und VACV WR exprimiert, während K1 bei MVA-F11L-K1L, MVA-K1L und VACV WR nachgewiesen werden konnte.

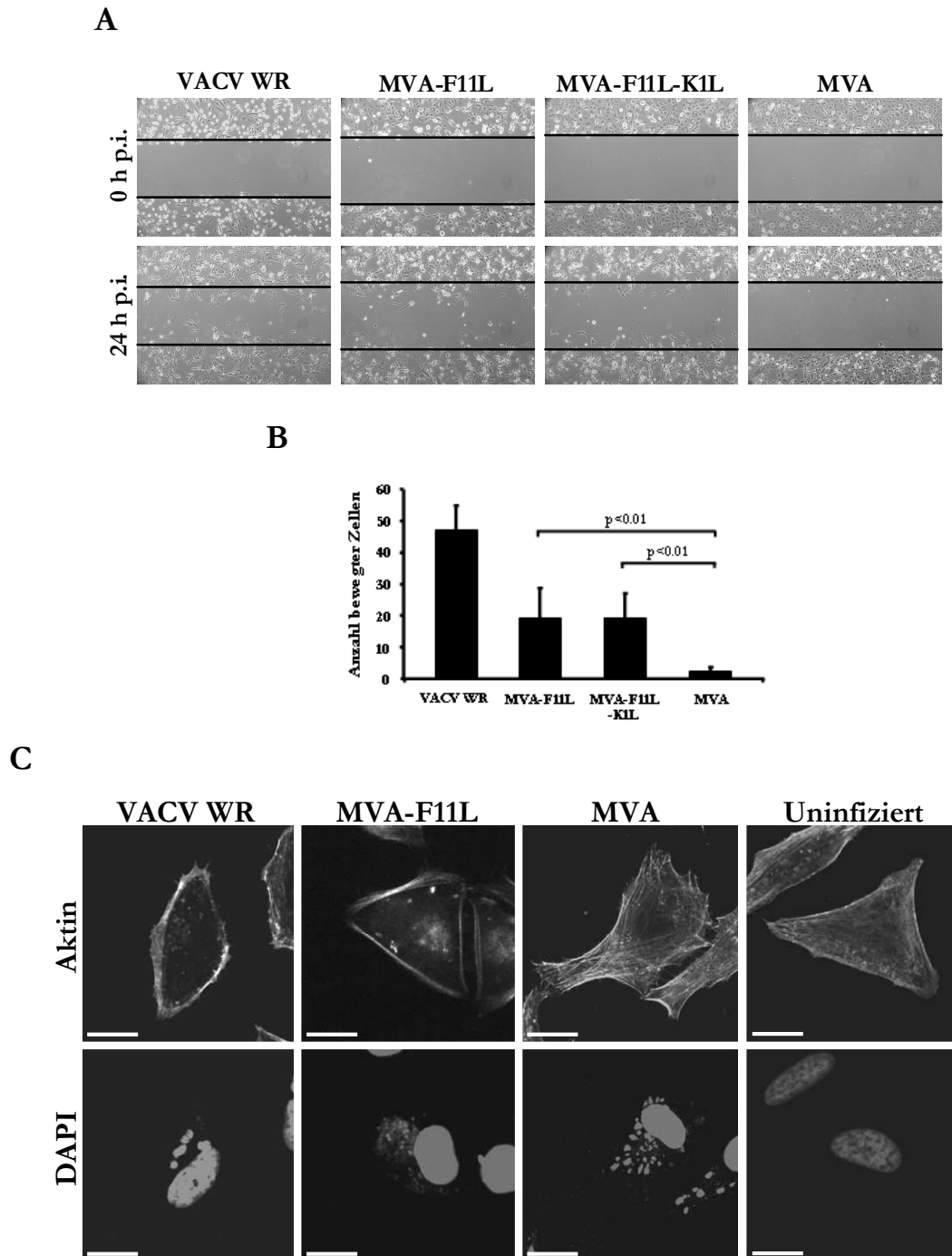
#### 4.5.2 Das inserierte F11L-Gen ist funktional

Das F11-Protein induziert die Migration infizierter Zellen. Dies wurde für VACV WR-infizierte BS-C-1-Zellen durch einen sog. Wundheilungs-*assay* (engl.: *wound healing assay*) gezeigt (Valderrama *et al.*, 2006). Bei diesem *assay* wird in einen konfluenten Zellrasen mit einer Pipettenspitze ein Streifen gezogen, sodass die Zellen an dieser Stelle entfernt sind. Die Zellen, die nach Infektion in ein definiertes Areal dieser „Wunde“ einwandern, können anschließend gezählt werden (Abs. 3.2.6.5).

Um zu bestimmen, ob das in MVA eingesetzte F11L-Gen diese Funktion erfüllen kann, wurden „Wunden“ durch konfluente BS-C-1-Zellrasen gezogen. Anschließend wurden die Zellen mit MVA-F11L, MVA-F11L-K1L sowie VACV WR und MVA als Kontrollen

mit einer *moi* von 10 infiziert. Definierte Wundareale wurden selektiert und direkt nach der Infektion sowie nach einem Tag (0 bzw. 24 h p.i.) mittels einer Kamera dokumentiert. Typische Wunden sind in Abb. 4.31 A gezeigt. In Abb. 4.31 B ist eine statistische Auswertung der durchschnittlichen Anzahl von Zellen, welche in acht unterschiedliche Wundareale eingewandert waren, dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass signifikant mehr MVA-F11L- oder MVA-F11L-K1L-infizierte Zellen in das Wundareal 24 h p.i. eingewandert waren als nach MVA-Infektion. Die Anzahl der eingewanderten Zellen war jedoch geringer als bei VACV WR-infizierten Zellen. Die zusätzliche Expression von K1L hatte auf die Zelleinwanderung keinen Einfluss.

Ein weiterer bekannter Phänotyp, der auf die F11L-Funktion zurückgeführt werden kann, ist der Verlust der zentral gelegenen Aktinstressfasern innerhalb der ersten Stunden nach der Infektion der Zelle. Bei uninfizierten und MVA-infizierten Zellen ist der gesamte Zellkörper von Aktinstressfasern durchkreuzt, wohingegen diese Stressfasern nach VACV WR-Infektion in der Zellperipherie konzentriert werden (Morales *et al.*, 2008). Um dies für MVA-F11L zu untersuchen wurden HeLa-Zellen mit MVA, MVA-F11L oder VACV WR mit einer *moi* von 20 infiziert oder uninfiziert belassen. Die Zellen wurden 4 h p.i. fixiert, und das Aktinzytoskelett wurde mit Phalloidin-Rhodamin bzw. DNA mit DAPI angefärbt (siehe 3.2.3.6). Typische Zellen sind in Abb. 4.31 C gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei VACV WR und MVA-F11L-infizierten Zellen die zentral gelegenen Aktinstressfasern abgebaut wurden, wohingegen bei MVA-infizierten wie bei uninfizierten Zellen der gesamte Zellkörper von Aktinfasern durchzogen war. Diese Ergebnisse zeigen anhand von zwei unabhängigen Methoden, dass das wieder eingesetzte F11L-Gen in MVA funktional ist.



**Abb. 4.31 Analyse der F11-Funktion mittels Wundheilungs-assays und Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinzytoskeletts. A und B.** Konfluente BS-C-1-Zellen, welche 2 h mit Medium ohne FCS inkubiert worden waren, wurden mit VACV WR, MVA-F11L, MVA-F11L-K1L oder MVA mit einer moi von 10 infiziert, nachdem Wunden in den Zellrasen mit einer Pipettenspitze geritzt wurden. **A.** Jede Wunde wurde 0 und 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) fotografiert. Die schwarzen Balken veranschaulichen die Wundbreite zum Zeitpunkt der Infektion. **B.** Durchschnittliche Anzahl der Zellen, welche 24 h p.i. in das Wundareal eingewandert waren. Das dargestellte Ergebnis spiegelt 8 unabhängige Experimente wider. **C.** VACV-induzierte Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. HeLa-Zellen wurden mit VACV WR, MVA-F11L oder MVA Viren mit einer moi von 20 infiziert. Zellen wurden 4 h p.i. fixiert, Aktin wurde via Phalloidin-Rhodamin und zelluläre sowie virale DNA mit DAPI angefärbt. Typische Zellen sind abgebildet. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ . Die p-Werte wurden mit dem Wilcoxon-Rangsummentest berechnet (Wilcoxon, 1946).

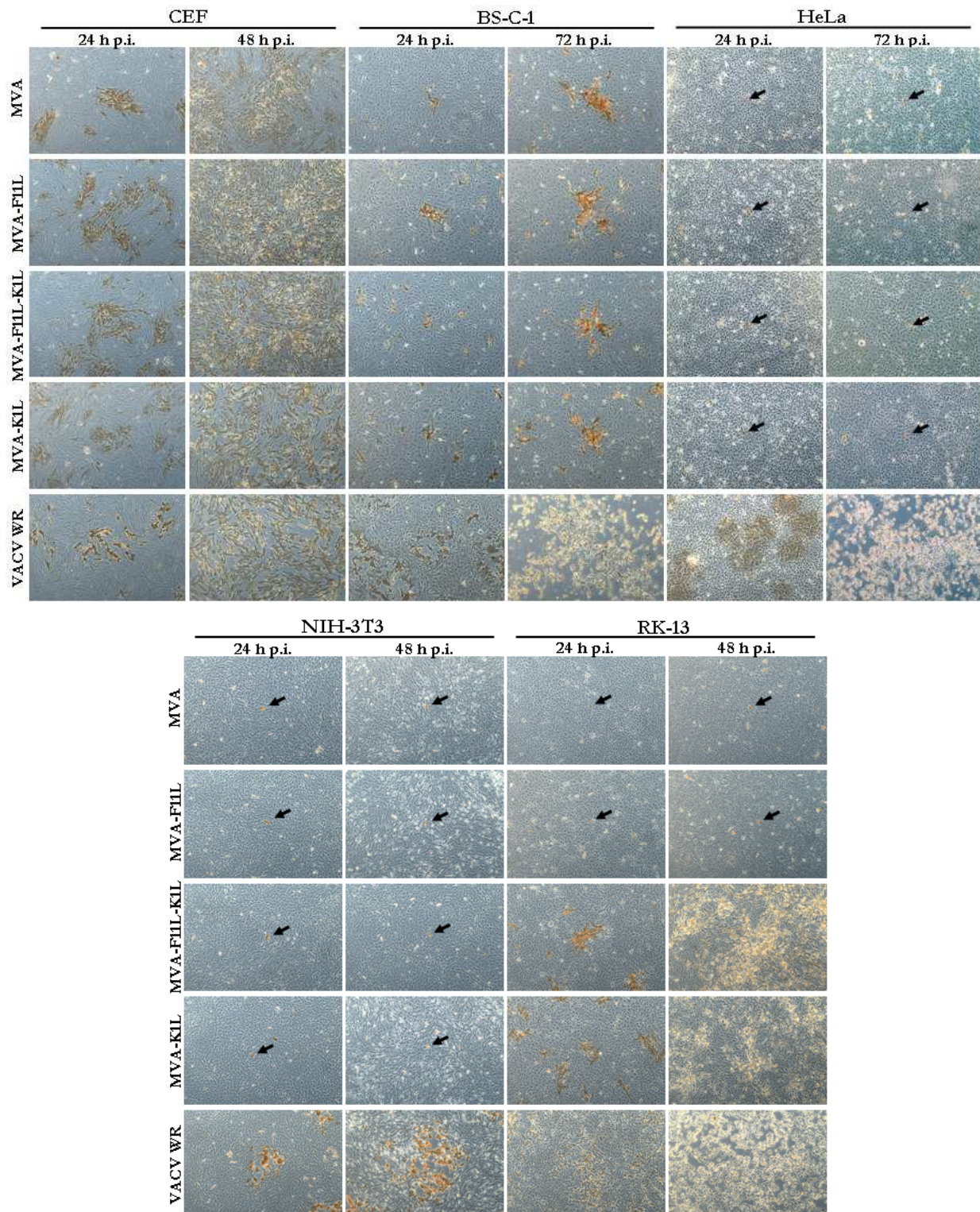


### 4.5.3 Die F11L-Expression hat keinen Einfluss auf die *host-range* von MVA

Die Replikationsdefizienz in den meisten Säugerzellen ist eine charakteristische Eigenschaft von MVA. Carroll und Moss (Carroll and Moss, 1997) charakterisierten das Wachstum von MVA in vielen unterschiedlichen Zelllinien und klassifizierten die Zellen daraufhin als permissiv, semi-permissiv oder nicht-permissiv, basierend auf dem Anstieg des Virustiters 72 h p.i. Um zu testen, ob die Expression von F11L alleine oder zusammen mit dem *host-range*-Gen K1L einen Einfluss auf die Replikation von MVA hat, wurde die virale Ausbreitung in CEF (permissiv), BS-C-1-Zellen (semi-permissiv) und HeLa- oder NIH-3T3-Zellen (nicht-permissiv) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit MVA-F11L, MVA-F11L-K1L, MVA-K1L, MVA oder VACV WR mit einer niedrigen  $moi$  von 0,05 infiziert. Zusätzlich wurde auch die Ausbreitung in RK-13-Zellen analysiert, in denen K1L die Replikation von MVA erlaubt. In Abb. 4.32 ist die Virusausbreitung zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Es zeigte sich, dass es keine nennenswerten Unterschiede zwischen der Ausbreitung von MVA-F11L und MVA zu verzeichnen gab. Unter permissiven Bedingungen (CEF) bildeten beide Viren Plaques mit vergleichbarer Größe. Unter nicht-permissiven Bedingungen (HeLa- oder NIH-3T3-Zellen) waren auch nach Reinsertion von F11L – mit oder ohne K1L – nur einzelne Zellen infiziert. Das bedeutet, dass es zwar zur Infektion, aber zu keiner Ausbreitung der Infektion kam. Auch in semi-permissiven BS-C-1-Zellen brachte die zusätzliche Expression von F11L oder K1L keinen sichtbaren Vorteil für die Virusausbreitung. Nur in RK-13-Zellen war das Vorhandensein von K1L für die Ausbreitung der Viren entscheidend. Die zusätzliche Expression von F11L erbrachte auch hier keinen Vorteil (siehe Abb. 4.32).

Um das Viruswachstum genauer zu analysieren und zu quantifizieren, wurden Mehrstufen-Wachstumsanalysen in den eben beschriebenen Zellen mit den unterschiedlichen Viren durchgeführt (siehe Abs. 3.2.6.3 und 3.2.6.4). Es war kein Replikationsvorteil von MVA-F11L gegenüber MVA oder  $MVA\Delta F11L$  zu beobachten (siehe Abb. 4.33). In HeLa- und NIH-3T3-Zellen waren MVA-F11L und MVA-F11L-K1L nicht in der Lage zu replizieren (siehe Abb. 4.33 B und D). In den semi-permissiven BS-C-1-Zellen zeigten MVA-F11L und MVA-F11L-K1L einen 10-15-fachen Virus-Titeranstieg 72 h p.i., der aber mit dem in MVA-,  $MVA\Delta F11L$ - oder MVA-K1L-infizierten Zellen beobachteten vergleichbar war (siehe Abb. 4.33 A). In RK-13-

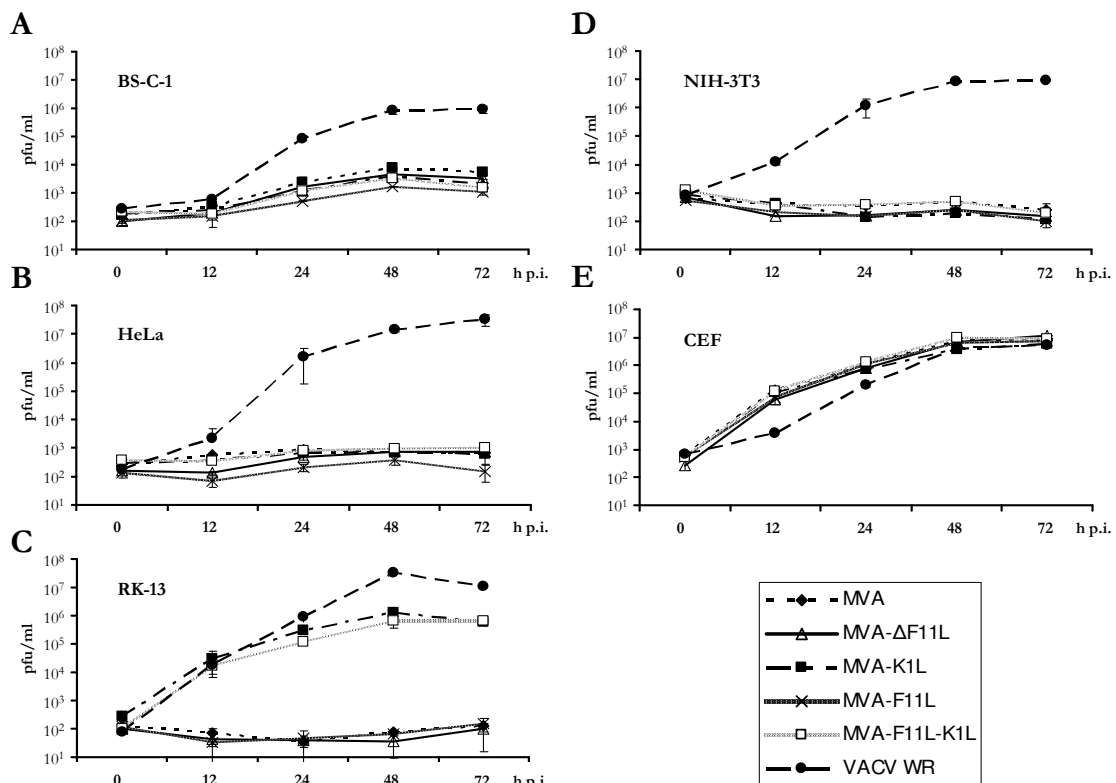
Zellen war kein Unterschied zwischen dem Wachstum von MVA-F11L-K1L und MVA-K1L zu erkennen (siehe Abb. 4.33 C).



**Abb. 4.32** Untersuchung des Einflusses von F11L und K1L auf die Virusausbreitung *in vitro*. Konfluente CEF, BS-C-1-, HeLa-, NIH-3T3- und RK-13-Zellen wurden mit VACV WR, MVA-F11L, MVA-F11L-K1L, MVA-K1L oder MVA mit einer *moi* von 0,05 infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und mit einem anti-Vaccinia Serum und einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper infizierte Zellen angefärbt. Pfeile zeigen infizierte, einzelne Zellen.

Interessanterweise zeigte VACV WR im Vergleich dazu einen 10-fach höheren Virustiter. In CEF war, wie zu erwarten, kein Unterschied zwischen MVA und den rekombinanten Viren zu verzeichnen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Reinsertion eines funktionalen F11L-Gens alleine oder in Kombination mit K1L die generelle Wachstumsrestriktion von MVA in Säugerzellen nicht aufheben kann.



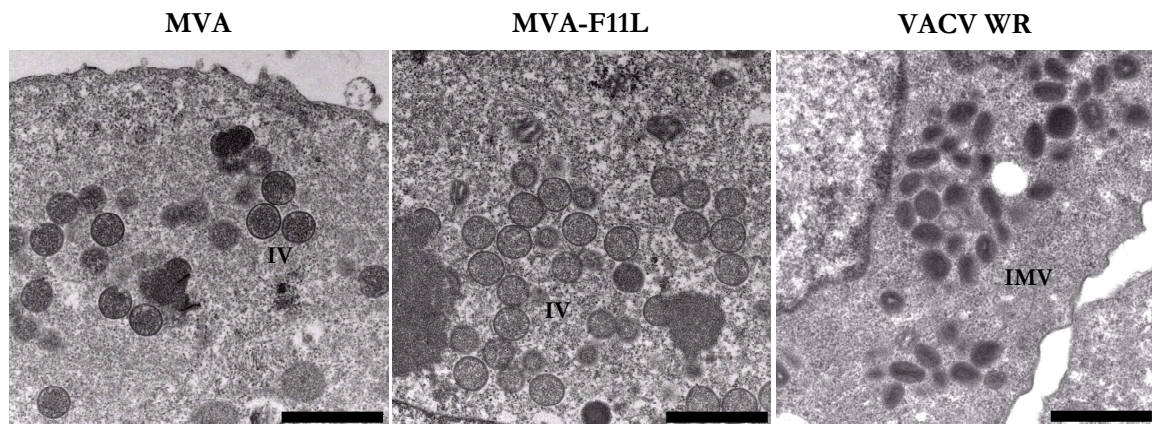
**Abb. 4.33 Untersuchung des Einflusses von F11L und K1L auf die Virusvermehrung mittels Mehrstufen-Wachstumsanalysen.** Konfluente BS-C-1- (A), HeLa- (B), RK-13- (C), NIH-3T3-Zellen (D) und CEF (E) wurden mit VACV WR, MVA-F11L, MVA-F11L-K1L, MVA-K1L oder MVA mit einer moi von 0,05 infiziert. Nach 0, 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Infektion (h p.i.) wurden die Zellen zusammen mit dem Überstand geerntet und die Virustiter wurden durch Titration in CEF bestimmt. Die durchschnittlichen Titer von zwei unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

#### 4.5.4 Die F11L-Expression hat keinen Einfluss auf die Virionmorphogenese von MVA

Im Folgenden wurde analysiert, ob die Expression von F11L MVA zu zusätzlichen Reifungsschritten bei der Virionmorphogenese verhilft. Hierzu wurden HeLa-Zellen mit MVA-F11L sowie VACV WR und MVA als Kontrollen mit einer moi von 5 infiziert und wurden 24 h p.i. elektronenmikroskopisch untersucht (siehe 3.2.7). Wie bereits beschrieben (Sutter and Moss, 1992), fanden sich Akkumulationen sphärischer, unreifer



Partikel in MVA-infizierten Zellen (siehe Abb. 4.34). Diese waren auch in MVA-F11L-infizierten Zellen zu beobachten, wobei keine nennenswerten Unterschiede zu MVA erkennbar waren. Lediglich in VACV WR-infizierten Zellen konnten vollständig gereifte Partikel nachgewiesen werden, was zu erwarten war. Schlussfolgernd hat die Expression von F11L in MVA-infizierten HeLa-Zellen keinen Einfluss auf die Virionenmorphogenese.



**Abb. 4.34 Elektronenmikroskopische Analyse des Einflusses von F11L auf die Virionenmorphogenese.** Konfluente HeLa-Zellen wurden mit MVA, MVA-F11L oder VACV WR mit einer *moi* von 5 infiziert. Zellen wurden 24 Stunden nach Infektion (h p.i.) fixiert. Epon-eingebettete Schnitte wurden präpariert die elektronenmikroskopisch untersucht wurden. Maßstabsbalken: 1000 nm. Beispiele für unreife Partikel (engl. *immature virions*, IV) und reife Partikel (engl. *intracellular mature virions*, IMV) sind indiziert.

## 5 Diskussion

Im Gegensatz zu dem breiten Wirts- und Zelltropismus von Vacciniavirus (VACV) ist der des modifizierten Vacciniavirus Ankara (MVA) aufgrund seiner Attenuierung stark eingeschränkt. Die multiplen Virus-Wirts-Interaktionen von VACV sind bisher noch vielfach unklar. Wichtig für den Wirtstropismus bzw. -bereich (engl.: *host-range*) ist die Klasse der sogenannten *host-range*-Gene, welche für das Wachstum in bestimmten Zellen wichtig sind. Dabei ist noch völlig unklar, auf welche Art und Weise viele dieser Faktoren eine Replikation des Virus in andernfalls nicht-permissiven Zellen ermöglichen. Im Fall von MVA konnten das Gen oder die Gene, welche während des Attenuierungsprozesses verloren gingen und somit den eingeschränkten Wirtstropismus bedingen, bislang nicht identifiziert werden. Weiterhin ist die Wirkweise der *host-range*-Gene K1L und C7L noch weitestgehend unklar. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit die noch unbekannt Funktionen der *host-range*-Gene K1L und C7L analysiert und darüber hinaus das F11L-Gen als weiteres potentiell *host-range*-Gen untersucht.

### 5.1 Die K1- und C7-Proteine ermöglichen die späte Genexpression von MVA in bestimmten Zellen

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass ein C7L-defizientes MVA im Gegensatz zum Wildtypvirus in murinen (NIH-3T3) als auch humanen Zellen (MRC-5, HeLa) keine späten Gene mehr exprimieren kann. Dieser Defekt konnte durch K1 kompensiert werden (Backes *et al.*, 2010).

In dieser Arbeit wurde anhand des späten Strukturproteins B5 (Engelstad and Smith, 1993) die späte Genexpression in einer darüber hinausgehenden größeren Anzahl unterschiedlicher Zelllinien untersucht (siehe Abb. 4.3 und Tabelle 4.2). Hierbei zeigte sich, dass C7L und K1L nicht in allen MVA-infizierten humanen Zellen (293T-, HeLa und Huh7-Zellen) für die B5-Expression erforderlich sind. Aus dieser Beobachtung lässt sich schließen, dass die Funktion von K1 und C7 nicht in allen Zellen benötigt wird. Dies spiegelt sich zudem darin wider, dass BHK-21-Zellen und CEF für MVA $\Delta$ C7L permissiv sind (Backes *et al.*, 2010). Das bedeutet, dass in diesen Zellen weder K1L noch C7L für die späte Genexpression von MVA essentiell sind.

Hinweise für diese unterschiedliche Abhängigkeit der späten Genexpression von C7 und K1 in unterschiedlichen Zellen wurden kürzlich veröffentlicht. In Huh7-Zellen wurde beobachtet, dass eine Deletionsmutante des VACV-Stamms Western Reserve (WR), in welcher das K1L- und das C7L-Gen deletiert wurden, sich in diesen Zellen vermehren kann (Meng *et al.*, 2009). In Interferon- $\beta$ -behandelten Huh7-Zellen war jedoch das Wachstum dieser Mutante von der zusätzlichen Expression von K1L oder C7L abhängig. Das bedeutet, dass K1 und C7 vermutlich einen durch Interferon- $\beta$ -Stimulation aktivierten Signalweg oder ein exprimiertes Protein (Interferon-stimuliertes Gen-Produkt, ISG) inhibieren, welche den Lebenszyklus von VACV unterbrechen.

Ein solches ISG mit anti-viraler Funktion ist beispielsweise die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (2'-5'-OAS), welche zwar in HeLa-Zellen, aber nicht in BHK-21-Zellen exprimiert wird. Dadurch ist das *host-range*-Gen E3L wichtig für das Wachstum von VACV in HeLa-Zellen und entbehrlich in BHK-21-Zellen (beschrieben in Abs. 2.4.1) (Langland and Jacobs, 2002). Im Fall von K1L und C7L könnte es sich ähnlich verhalten, sodass ein oder mehrere ISG, die ohne Interferon- $\beta$ -Stimulation in Huh7-Zellen nicht vorliegen, möglicherweise in anderen Zellen exprimiert werden und die virale Replikation verhindern. Eine Eingrenzung auf bestimmte ISG wird durch die Vielzahl Interferon- $\beta$ -stimulierter Gene (>300) erschwert, deren Funktion, auch in Bezug auf anti-virale Wirkungen, z.T. noch unzureichend verstanden sind (de Veer *et al.*, 2001).

Eine Diskrepanz der Ergebnisse in Bezug auf die B5-Expression ergibt sich bei HeLa-Zellen. Eine S<sup>35</sup>-metabolische Markierung der gesamten Proteinsynthese in diesen Zellen offenbarte, dass nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion keine späten Genprodukte synthetisiert werden (Backes *et al.*, 2010), jedoch zeigten die eigenen Beobachtungen eine deutliche B5-Expression (siehe Abb. 4.3). In der Literatur wird die Abhängigkeit der VACV-Replikation in HeLa-Zellen von K1L oder C7L kontrovers beschrieben. VACVhr ist ein mutiertes Vacciniavirus vom Stamm Copenhagen, dem eine Region von 18 KBp im Genom fehlt, welche K1L und C7L umfasst und eine Blockade bei der intermediären Translation in HeLa-Zellen aufweist (Hsiao *et al.*, 2004). Die Insertion von entweder K1L oder C7L konnte die intermediäre bzw. späte Genexpression und somit auch die Replikation von VACVhr wiederherstellen (Oguiura *et al.*, 1993). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass K1 und C7 die intermediäre und späte Translation in HeLa-Zellen ermöglichen. Im Gegensatz dazu erfolgte die Blockade des Lebenszyklus von VACV NYVAC, das VACV Copenhagen abgeleitet ist und in welchem neben C7L und K1L noch 16 weitere Gene fehlen, in HeLa-Zellen erst während der Virionenmorphogenese.

Eine Expressions-Analyse von fünf späten Proteinen zeigte hier jedoch, dass während der NYVAC-Infektion zwei der fünf Proteine exprimiert werden. Dieses Ergebnis macht es fraglich, ob die ganze Klasse der späten Proteine von der durch das Fehlen von K1 und C7 verursachten Blockade betroffen ist, oder nur ein Teil der Faktoren. Soweit bekannt, stellen diese Unterschiede in der späten Genexpression von VACV in HeLa-Zellen jedoch eine Ausnahme dar, welche noch genauerer Untersuchung bedarf. Bei NIH-3T3- und MRC-5-Zellen, welche vorwiegend in den hier dargestellten Untersuchungen genutzt wurden, gab es keine widersprüchlichen Ergebnisse durch die unterschiedlichen Untersuchungsmethoden der späten Genexpression.

Eine Ausnahme davon, dass C7L das Fehlen von K1L kompensieren kann, stellt die Kanichennieren-Zelllinie RK-13 dar. Für diese Zelllinie ist bereits seit längerem bekannt, dass K1L, aber nicht C7L für das Wachstum von sowohl VACV Copenhagen, als auch MVA wichtig ist (Perkus *et al.*, 1990; Sutter *et al.*, 1994). Dies spiegelt sich auch in dem Ergebnis wider, dass sowohl für MVA als auch MVA $\Delta$ C7L keine späte B5-Expression in diesen Zellen möglich ist (siehe Abb. 4.3).

## **5.2 K1 und C7 inhibieren die PKR-induzierte eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung**

In der Literatur gab es Hinweise, dass C7 in infizierten Zellen die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung inhibiert (Najera *et al.*, 2006; Hsiao *et al.*, 2004). Diese Phosphorylierung hat zur Folge, dass der zelluläre Translationsinitiationskomplex nicht gebildet wird und somit auch keine virale Translation mehr stattfindet (Clemens, 2001). In dieser Arbeit wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass der Translationsinitiationsfaktor eIF2 $\alpha$  bei Infektionen ohne K1L und C7L phosphoryliert werden könnte und das die Begründung für das Fehlen der späten Genexpression in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen sein könnte.

In der Tat konnte eine Korrelation zum Fehlen der späten Genexpression hergestellt werden, da in NIH-3T3-, MRC-5- und RK-13-Zellen eine deutliche eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion zu beobachten war (siehe Abb. 4.4). Bei MVA $\Delta$ C7L-infizierten HeLa-Zellen, die eine B5-Expression zuließen, war dagegen die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung nur schwach ausgeprägt. Studien mit einem C7-defizienten, aber K1-exprimierenden Virus (MVA $\Delta$ C7L-K1L) ergaben, dass K1 ebenfalls dazu in der

Lage ist, die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in den unterschiedlichen Zellen zu inhibieren, und somit C7 komplementieren kann.

Von den drei Kinasen, die eIF2 $\alpha$  phosphorylieren können, konnte die PKR als diejenige identifiziert werden, welche im Kontext einer MVA $\Delta$ C7L-Infektion relevant ist. Dies konnte in Studien mit PKR<sup>-/-</sup>-MEF bewiesen werden (siehe Abb. 4.6). Das auch in MVA erhalten gebliebene E3-Protein verhindert spezifisch die Aktivierung dieser Kinase, indem es dsRNA bindet (siehe Abs. 2.4.1). Meng *et al.* postulierten, dass die Inhibition der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch C7 indirekt über die Erhöhung der E3L-Expression erfolgt (Meng *et al.*, 2008). Zwar wurde in den eigenen Untersuchungen eine vergleichsweise niedrigere E3L-Expression in MVA $\Delta$ C7L-infizierten Zellen beobachtet (siehe Abb. 4.7), jedoch zeigte sich anhand der unbeeinflussten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung in MVA $\Delta$ C7L-infizierten NIH-3T3-E3L-Zellen, dass C7 und K1 nicht indirekt über E3 wirken (siehe Abb. 4.8). Hierdurch konnte die von Meng und Kollegen aufgestellte Theorie widerlegt werden. Letztlich zeigte sich jedoch, dass die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L nicht alleine von der PKR-vermittelten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und dem damit verbundenen Translationsstopp unterdrückt wird. Dies steht im Gegensatz zu MVA $\Delta$ E3L-infizierten PKR<sup>-/-</sup>-MEF, in welchen die späte Genexpression wiederhergestellt werden konnte (siehe Abb. 4.9; Ludwig *et al.*, 2006).

Zeitgleich wurden nahezu übereinstimmende Daten veröffentlicht, die belegen, dass nach Infektion von RK-13-Zellen mit einer VACV WR-Mutante, in welcher K1L deletiert ist (WR $\Delta$ K1L), PKR-abhängig eIF2 $\alpha$  phosphoryliert wird (Willis *et al.*, 2009). Auch hier zeigte sich über einen siRNA-vermittelten *knock-down* der PKR, dass das Fehlen dieser Kinase nicht ausreicht, um die späte Genexpression wiederherzustellen. Darüber hinaus beobachteten die Autoren dieser Publikation bei der Infektion von RK-13-Zellen mit WR $\Delta$ K1L ebenfalls eine niedrigere E3L-Expression. Ähnlich zu den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten mit den NIH-3T3-E3L-Zellen (siehe Abs. 4.2.3), generierten die Autoren RK-13-Zellen, die stabil E3L exprimieren und konnten beweisen, dass die niedrigere E3L-Expression nicht für die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung verantwortlich ist (Willis *et al.*, 2009). Dies bestätigt die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse und zeigt nochmals die Besonderheit, dass in RK-13-Zellen nur K1 einen inhibitorischen Einfluss auf die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung hat, im Gegensatz zu allen anderen untersuchten Zelllinien, bei welchen auch C7 diese Funktion ausübt (siehe Abb. 4.4).

Diese zelltypspezifischen Beobachtungen könnten mehrere Ursachen haben. Zum einen könnte K1 gegenüber C7 eine zusätzliche Funktion besitzen, die nur in RK-13-Zellen



wichtig ist. Andererseits könnte ein möglicher zellulärer Interaktionspartner von C7 und K1 eine in Kaninchen (im Vergleich zu Mäusen oder Menschen) leicht veränderte Aminosäuresequenz haben, wodurch nur noch die Interaktion mit K1 möglich ist. Darüber hinaus wäre es auch denkbar, dass K1 und C7 unterschiedliche Zielproteine in dem gleichen Signaltransduktionsweg inhibieren. Falls C7 diesen Signalweg beispielsweise stromabwärts von K1 inhibiert und das Signal in Kaninchenzellen anders transduziert wird als in humanen oder murinen Zellen, könnte es sein, dass C7 im Gegensatz zu K1 keinen Einfluss mehr hat. Diese mögliche Erklärung steht im Einklang mit der Beobachtung, dass im Gegensatz zu humanen Zellen, andere Ankyrin-*Repeats* des K1-Proteins essentiell waren, um die Replikation in RK-13-Zellen wiederherzustellen (Meng and Xiang, 2006). Das bedeutet, dass zumindest die Interaktion Spezies-spezifisch divergiert, sagt jedoch nichts darüber aus, ob es sich um einen unterschiedlichen Interaktionspartner handelt oder ob sich die Aminosäuresequenz desselben Proteins zwischen den Spezies zu stark unterscheidet. Zumindest scheint es sich um einen Effekt zu handeln, der nicht artifiziell nur bei der RK-13-Zelllinie vorkommt, da nur K1 – aber nicht C7 – auch in anderen Kaninchen-Zelllinien (LLC-RK1- und R9AB-Zellen) die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung inhibieren konnte (Willis *et al.*, 2009).

Auf welche Art und Weise wird die PKR-Aktivierung und damit die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung durch K1 und C7 verhindert? Möglicherweise vermindern beide Proteine die Bildung von dsRNA während der intermediären Transkription, sodass die Menge an E3 ausreicht, um diese zu maskieren. Dies könnte beispielsweise über einen Mechanismus erfolgen, welcher die mRNA-Stabilität herabsetzt, wie es kürzlich für CP77 berichtet wurde, sodass zueinander komplementäre virale Transkripte nur zeitlich begrenzt in der Zelle vorliegen (XVIII International Poxvirus, Asfvirus, and Iridovirus Symposium, Sedona, USA; Poster Nr. PS5.13).

Alternativ könnten K1 und C7 einen anderen Stimulus inhibieren, der zur PKR-Aktivierung führt. In den letzten Jahren wurde neben viraler dsRNA eine Reihe anderer aktivierender Stimuli für die PKR entdeckt. Zum einen wurden Proteine beschrieben, wie PACT und mda7, welche die PKR aktivieren können (Patel and Sen, 1998; Pataer *et al.*, 2002). Weiterhin spalten in Folge von Apoptose aktivierte Caspase-3, -7 oder -8, die PKR proteolytisch, wonach diese konstitutiv aktiv wird (Saelens *et al.*, 2001). Eine Induktion der Apoptose in Folge von MVA $\Delta$ C7L-Infektion konnte jedoch ausgeschlossen werden (Backes *et al.*, 2010). Zum anderen aktivieren auch zelluläre mRNAs die PKR. Zu diesen aktivierenden Transkripten gehört die mRNA des Tumor

Nekrose Faktors  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interferon  $\gamma$ , p23/TCTP, Tropomyosin und Stress-induzierte Alu RNA (Sadler and Williams, 2007). Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass K1 die durch MVA-Infektion induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert oder zumindest reduziert (Shisler and Jin, 2004). Zu den durch den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B regulierten Genen gehört TNF $\alpha$ . Shisler und Jin zeigten als zusätzlichen Nachweis der NF $\kappa$ B-Aktivierung mit einer semi-quantitativen RT-PCR, dass sowohl in RK-13-Zellen als auch in humanen 293T-Zellen nach MVA-Infektion vermehrt TNF $\alpha$ -mRNA transkribiert wird im Vergleich zu MVA-K1L-infizierten Zellen. Dies ließ die Hypothese zu, dass eine erhöhte Menge an TNF $\alpha$ -mRNA zur Aktivierung der PKR führen könnte. Die 3'UTR der TNF $\alpha$ -mRNA besteht aus dem Sequenzbereich 2-Aminopurin *response element* (2-APRE), welcher eine Haarnadelschleife und somit einen dsRNA-Abschnitt bildet, der die PKR aktiviert (Osman *et al.*, 1999). Eine MVA-Infektion führt zur NF $\kappa$ B-Aktivierung (Oie and Pickup, 2001), jedoch mit Ausnahme von RK-13-Zellen nicht zu einer PKR-induzierten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung (siehe Abb. 4.4). Es könnte jedoch sein, dass C7 wie K1 auch die NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert und somit bei einer MVA-Infektion zwar eine Aktivierung stattfindet, diese jedoch nicht so stark ausgeprägt ist wie bei einer MVA $\Delta$ C7L-Infektion. In der Folge könnte die exprimierte Menge an TNF $\alpha$ -mRNA im Fall einer MVA-Infektion nicht ausreichend sein bzw. die 2-APRE-Sequenz noch von E3 maskiert werden, sodass die PKR nicht aktiviert wird. Falls C7 auch die NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibieren würde, so könnte in Folge einer MVA $\Delta$ C7L-Infektion mehr TNF $\alpha$ -mRNA exprimiert werden. Dadurch könnte die Menge an E3 nicht mehr ausreichend sein, wodurch es zur PKR-Aktivierung und schließlich eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung kommt. Diese Mutmaßung setzt voraus, dass C7 wie K1 eine NF $\kappa$ B-inhibitorische Funktion besitzt, weshalb dies als Teil dieser Arbeit untersucht wurde.

### 5.3 C7 reduziert die NF $\kappa$ B-Aktivierung durch die MVA-Infektion

Als Anzeichen für die NF $\kappa$ B-Aktivierung wurde der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau untersucht. Wie bereits für andere Zellen beschrieben (Shisler and Jin, 2004), zeigte sich auch in MEF und MRC-5-Zellen, dass die Infektion mit MVA einerseits zum I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau führt, K1 diesen jedoch reduziert (siehe Abb. 4.10). Darüber hinaus wurde in diesem Zusammenhang erstmals für C7 eine inhibitorische Funktion für den I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau und somit der NF $\kappa$ B-Aktivierung nachgewiesen. Dies zeigte sich anhand des signifikant stärkeren Abbaus von

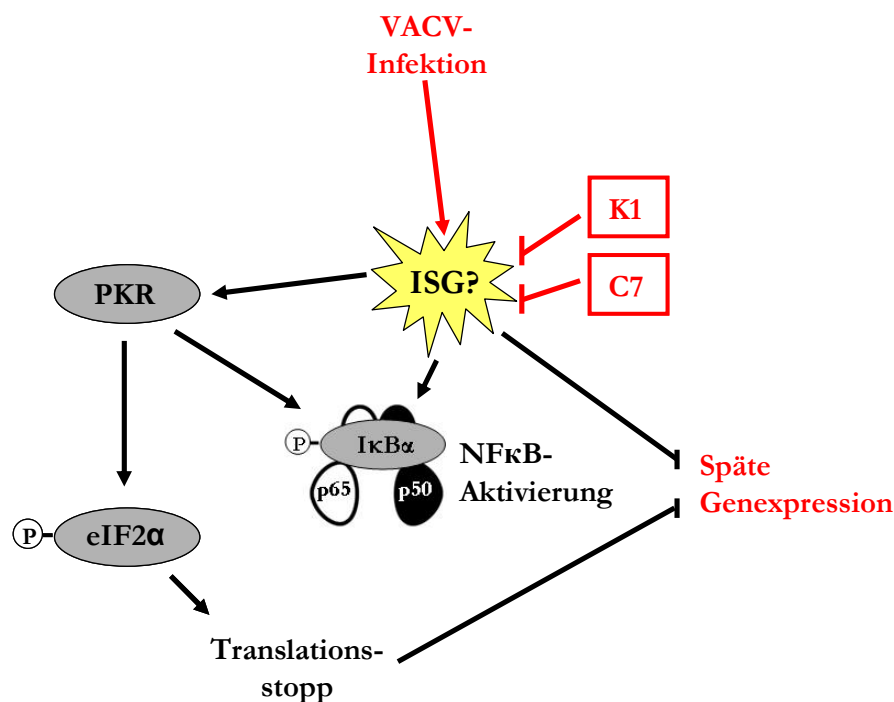
I $\kappa$ B $\alpha$  nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion im Vergleich zu einer MVA-Infektion (siehe Abb. 4.10). Im Gegensatz zur Inhibition der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung, welche lediglich entweder K1 oder C7 erforderte, scheinen beide Faktoren synergistisch den I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau in MRC-5-Zellen und MEF zu reduzieren. Dies äußerte sich dadurch, dass der I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion am stärksten ausfiel, während das Vorhandensein von C7L (MVA) bzw. K1L (MVA $\Delta$ C7L-K1L) den Abbau vergleichbar verringerte. Die gleichzeitige Expression beider Faktoren (MVA-K1L) bewirkte nahezu keine I $\kappa$ B $\alpha$ -Degradierung. Darüber hinaus wurde dieses Ergebnis durch die stärkere bzw. früher einsetzende Kern-Translokation von NF $\kappa$ B p65 nach Infektion mit den entsprechenden Viren gestützt (siehe Abb. 4.11). Diese synergistische Inhibition der NF $\kappa$ B-Aktivierung durch C7 und K1 würde die aufgestellte Theorie für die PKR-Aktivierung unterstützen, dass erst mit dem Fehlen beider Faktoren die durch NF $\kappa$ B regulierte TNF $\alpha$ -mRNA-Expression einen gewissen Schwellenwert überschreitet, der dann zur Aktivierung der PKR führt.

Im Laufe der Untersuchungen wurde veröffentlicht, dass die MVA-bedingte NF $\kappa$ B-Aktivierung durch die PKR verursacht wird und nicht wie angenommen umgekehrt (Lynch *et al.*, 2009). Lynch und Kollegen zeigten, dass die MVA-Infektion in PKR<sup>-/-</sup>-MEF im Gegensatz zu Wildtyp-MEF keine NF $\kappa$ B-Aktivierung mehr verursacht. Deshalb wurde untersucht, ob dies auch für MVA $\Delta$ C7L zutrifft. Hierbei zeigte sich in Übereinstimmung zu den Daten von Lynch und Kollegen, dass in PKR<sup>-/-</sup>-MEF die MVA $\Delta$ C7L-bedingte NF $\kappa$ B-Aktivierung reduziert wurde. Interessanterweise war aber immer noch eine leichte NF $\kappa$ B-Aktivierung zu beobachten, die im gleichen Maße wie in Wildtyp-MEF über die MVA-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung hinaus ging (siehe Abb. 4.13). Dies spricht deutlich für einen PKR-unabhängigen Mechanismus, der nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion zusätzlich zur NF $\kappa$ B-Aktivierung beiträgt.

Zusätzlich wurde durch die Untersuchung des I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbaus unter Bedingungen, welche die DNA-Replikation inhibieren (AraC), nachgewiesen, dass der verkürzte Lebenszyklus und die damit verbundene unterschiedliche Genexpression von MVA $\Delta$ C7L im Gegensatz zu MVA nicht für die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung verantwortlich ist (siehe Abb. 4.12). Die bis zu diesen Punkt diskutierten Erkenntnisse über die Funktion von K1 und C7 sind in Abb. 5.1 zu einem Modell zusammengefasst dargestellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten das Wissen um die Funktionen von K1 und C7 hinsichtlich der Inhibition der PKR-bedingten eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ergänzen und zeigten auch, dass C7 die NF $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert. Zusammenfassend lässt sich folgern, dass das unbekannte inhibierte Protein oder die unbekannt inhibierten

Proteine von K1 und C7 zum einen die PKR aktivieren, was in der Folge zur eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und NF $\kappa$ B-Aktivierung führt. Zum anderen aktivieren das oder diese Proteine über einen PKR-unabhängigen Signalweg NF $\kappa$ B und unterbinden auf unbekannte Art und Weise die späte Genexpression. Als Ursache für die Inhibition der späten Genexpression können durch das in dieser Arbeit gesammelte Wissen sowohl die PKR als auch die 2'-5'-Oligoadenylatsynthetase (siehe Abb. 4.9) ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ist es unwahrscheinlich, dass die NF $\kappa$ B-Aktivierung für das Fehlen der späten Genexpression verantwortlich ist, da die NF $\kappa$ B-Aktivierung beispielsweise auch in BHK-21-Zellen beobachtet wurde (Oie and Pickup, 2001), die permissiv für das Wachstum von MVA sind, oder in 293T-Zellen (Shisler and Jin, 2004), welche eine späte B5-Expression zulassen (siehe Abb. 4.2). Um jedoch die zugrunde liegenden Mechanismen zu erforschen, schien es unabdingbar zu sein, den oder die zellulären Interaktionspartner von K1 und C7 ausfindig zu machen.



**Abb. 5.1 Modell der Funktion von K1 und C7 in humanen oder murinen Zellen.** C7 und K1 inhibieren vermutlich ein oder mehrere Interferon-stimulierte Genprodukte (ISG), welche zum einen die Proteinkinase R (PKR) aktivieren, welche in der Folge eIF2 $\alpha$  phosphoryliert und NF $\kappa$ B aktiviert. Zum anderen inhibiert das oder die ISG direkt oder indirekt die späte virale Genexpression. Virale Komponenten des Schemas sind rot dargestellt.

## 5.4 Verifizierung der Hefe-2-Hybrid-Interaktionspartner von C7 und K1

Mit Hilfe eines Hefe-2-Hybrid-*screening* wurden potentielle Interaktionspartner für K1 und C7 identifiziert (Übersicht siehe Tabelle 4.3). Aufgrund der hohen falsch-positiv-Rate dieser Methode (Deane *et al.*, 2002), müssen Interaktionen mit einer anderen Nachweismethode bestätigt werden, wofür in dieser Arbeit Co-Immunpräzipitierungen durchgeführt wurden. Hierfür wurden Expressionsplasmide für die jeweiligen Interaktionspartner sowie MVA-C7L-V5 und MVA-K1L-HA generiert (siehe Abs. 4.4.2). Bei K1L wurde ein HA-*tag* mit dem N-terminalen Bereich des Gens fusioniert, da bereits gezeigt wurde, dass die Funktion von K1 dadurch nicht beeinträchtigt wird (Backes, 2008). Im Fall von C7L wurde der C-terminale Bereich für die Fusion des V5-*tags* gewählt, da hier der N-Terminus hoch konserviert ist und für die Funktion des Proteins wichtig zu sein scheint (Meng *et al.*, 2008).

Beide Viren exprimierten das jeweilige Fusionsprotein und hatten in Wachstumskurven keinen Nachteil gegenüber dem Wildtypvirus, was dafür spricht, dass es zu keinen offensichtlichen Mutationen während der Generierung der Viren gekommen war (siehe Abb. 4.17 und Abb. 4.18). Weiterhin zeigt dies im Fall von MVA-K1L-HA, dass wie K1 auch K1-HA das Wachstum in RK-13-Zellen uneingeschränkt ermöglichen kann. Dies bestätigt, dass der N-terminale HA-*tag* keinen negativen Einfluss hat. Durch die Generierung der Viren war es möglich, Interaktionen im Kontext einer natürlichen Infektion der schon untersuchten Wirtszellen zu studieren.

Als Interaktionspartner von K1 wurden Ataxin10, RNA-Polymerase III Polypeptid H (RPC8), RING-finger Protein 10 (Rnf10), RAB3A interagierendes protein (*rabin3-like* (Rab3il1) und *embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila-like 3* (Elavl3) identifiziert (siehe Tabelle 4.3). Elavl3 wurde aufgrund der ausschließlichen Expression in Neuronen als tatsächlicher Interaktionspartner ausgeschlossen (Fornaro *et al.*, 2007). Die anderen Interaktionen sind potentiell möglich und konnten anhand etwaiger Unterschiede ihrer Lokalisation zu K1 oder C7 nicht ausgeschlossen werden, da sowohl K1 als auch C7 in der gesamten Zelle verteilt vorliegen (siehe Abb. 4.19).

Ataxin10 ist ein 53 Kilodalton (kDa) großes Protein, welches vorwiegend im perinukleären Raum der Zelle lokalisiert ist und mit dem Neuritenwachstum von Neuronen in Verbindung gebracht wurde (Waragai *et al.*, 2006). RING-finger Protein 10 (Rnf10) ist ein 100 kDa großer Transkriptionsfaktor und besitzt eine RING-finger Domäne, welche der Zink-Finger-Bindedomäne ähnelt und Protein- und DNA-

Interaktionen ermöglicht (Saurin *et al.*, 1996). Welche Gene durch Rnf10 reguliert werden ist noch wenig erforscht. In einer Studie wurde berichtet, dass Rnf10 den MAG-Promotor reguliert, welcher eine Funktion in der Myelinbildung bei Schwann'schen Zellen hat (Hoshikawa *et al.*, 2008). Bei Rab3il1 handelt es sich um einen *GTP-exchange factor* (GEF) des G-Proteins Rab3A, welches für den Vesikeltransport wichtig ist (Luo *et al.*, 2001). Die RNA-Polymerase III Untereinheit RPC8 wurde bei den Untersuchungen als wahrscheinlichster Interaktionspartner betrachtet. Neben den seit Langem bekannten Funktionen der RNA-Polymerase III, die darin bestehen, tRNA und rRNA zu bilden, wurde kürzlich bekannt, dass die RNA-Polymerase III im Zytoplasma als Sensor fungiert, welcher virale dsDNA erkennt (Chiu *et al.*, 2009). In Folge einer Adenovirus-Infektion belegten die Autoren dieser Publikation, dass die RNA-Polymerase III die virale DNA als Matrize nutzend dsRNA polymerisiert, welche über den *retinoic acid inducible gene I* (RIG-I)-Signalweg eine Typ I Interferonantwort induziert und sowohl NFκB als auch die PKR aktiviert (Chiu *et al.*, 2009). Da es sich bei Vacciniavirus um ein Virus mit dsDNA-Genom handelt, könnte die Infektion potentiell über die RNA-Polymerase III in der Zelle bemerkt werden. Weiterhin könnte dies der PKR-unabhängige Signalweg darstellen, der in Folge der MVAΔC7L-Infektion zur NFκB-Aktivierung führt (siehe Abs. 5.3). Sofern K1 mit der RNA-Polymerase III interagieren und diese dadurch inhibieren würde, könnte das die bisherigen Beobachtungen zur K1-Funktion erklären.

Für C7 wurden *SWI/SNF related, matrix associated, Actin dependent regulator of chromatin*, Unterfamilie a, Mitglied 4 (Brg-1) und Nukleärer Rezeptor Co-Repressor 1 (NCoR) identifiziert. Brg-1 ist eine Untereinheit des SWI/SNF-Komplex A (BAF), welcher Chromatin remoduliert und dadurch die Expression von über 80 Genen reguliert (Liu *et al.*, 2001; Varga-Weisz, 2001). Zu diesen regulierten Genen gehört u.a. IκBα, welches NFκB in seinem inaktiven Zustand hält (Deroo and Archer, 2002). Weiterhin interagiert Brg-1 mit unterschiedlichen Proteinen, wie z.B. *breast cancer 1, early-onset* (BRCA1), dem Riboblastom-Protein (pRb) sowie verschiedenen Transkriptionsfaktoren (Bochar *et al.*, 2000; DiRenzo *et al.*, 2000; Dunaief *et al.*, 1994; Kadam *et al.*, 2000; Kowenz-Leutz and Leutz, 1999). Der Co-Repressor NCoR bildet mit anderen Proteinen zusammen den NCoR-Komplex, welcher als Histon-Deacetylase fungiert und somit die Expression bestimmter Gene reprimiert (Perissi *et al.*, 2010). In Folge eines aktivierenden Stimulus kommt es zum Austausch des Co-Repressors gegen einen Co-Aktivator, wodurch die Expression des vorher reprimierten Gens aktiviert wird. Der NCoR-Komplex reprimiert u.a. Promotoren von Inflammations-assoziierten Genen, welche beispielsweise von

NF $\kappa$ B reguliert werden sowie Promotoren, die in Folge einer Typ I Interferon-Antwort aktiviert werden (Perissi *et al.*, 2010; Le May *et al.*, 2008).

In den hier vorgestellten Studien konnte keine der vermeintlichen Interaktionen bestätigt werden (siehe Abs. 4.4.3). Ein Problem bei Co-Immünpräzipitierungen (Co-IPs) ist die Wahl des Lysepuffers, welcher die Proteine möglichst in nativer Konformation halten muss, sodass Protein-Protein-Interaktionen erhalten bleiben. Dies wurde im Fall von K1-HA kontrolliert, indem der bereits beschriebene Interaktionspartner ACAP2 als Kontrolle genutzt wurde (Bradley and Terajima, 2005). Unter den gewählten Bedingungen in dieser Arbeit konnten ACAP2 und K1-HA co-präzipitiert werden (siehe Abb. 4.23 A). Dies bedeutet auch, dass der HA-tag zumindest bei ACAP2 die Interaktion sterisch nicht behindert. Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass unter anderen Bedingungen als den untersuchten eine Interaktion von C7-V5 oder K1-HA mit den beschriebenen Proteinen stattfinden würde. Weiterhin könnte die Interaktion transient und/oder im Gegensatz zu der Interaktion von K1 mit ACAP2 nicht sehr stark sein, sodass sie nicht im gesamten Verlauf der Co-Immünpräzipitierung erhalten bleibt. Auch mit einem zweiten Standard-Lysepuffer (RIPA) konnte keine Interaktion bestätigt werden (nicht gezeigt).

Der potentiellen Interaktion von K1 mit der RNA-Polymerase III Untereinheit RPC8 wurde, wie bereits erwähnt, besondere Bedeutung zugemessen. Ausschlaggebend waren hierfür, dass diese Interaktion am häufigsten bei dem Hefe-2-Hybrid-*screening* identifiziert wurde (siehe Tabelle 4.3) und dass sie die bisherigen Beobachtungen zur K1-Funktion erklären könnte (s.o.). Daher wurde neben den Interaktionsstudien versucht, einen etwaigen inhibitorischen Einfluss von K1 auf die RNA-Polymerase III nachzuweisen (nicht gezeigte Daten). Wie bereits beschrieben, aktiviert die RNA-Polymerase III den RIG-I-Signalweg, wobei die weitere Transduktion des Signals über das Adapter-Protein CARD *adaptor-inducing* interferon- $\beta$  (Cardif) erfolgt (Chiu *et al.*, 2009). In MEF, die von Cardif-defizienten Mäusen abstammen (Cardif<sup>-/-</sup>-MEF), in welchen dieser Signalweg unterbrochen ist, wurde zum einen untersucht, ob die späte Genexpression nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion wiederhergestellt ist. Zum anderen wurde analysiert, ob die durch MVA-, MVA $\Delta$ C7L-, MVA $\Delta$ C7L-K1L- oder MVA-K1L-Infektion hervorgerufene NF $\kappa$ B-Aktivierung moduliert ist. In beiden Fällen konnte jedoch kein Unterschied zu Wildtyp-MEF festgestellt werden (nicht gezeigt). Weiterhin konnte auch der RNA-Polymerase III-Inhibitor ML-60218 die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L in MEF und MRC-5-Zellen nicht wiederherstellen (nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass K1 keinen inhibitorischen Einfluss auf die RNA-Polymerase III zu haben scheint.

Zusammengenommen konnte in dieser Arbeit keine per Hefe-2-Hybrid-Methode entdeckte Interaktion bestätigt werden. Aus diesem Grund wurde versucht, mit K1-HA und C7-V5 co-immunpräzipitierte Proteine massenspektrometrisch zu identifizieren.

## 5.5 Eine massenspektrometrische Analyse identifiziert HNRPK als möglichen Interaktionspartner von C7-V5

Mittels 2D-Gelelektrophorese und Proteinfärbung konnte sowohl K1-HA als auch C7-V5 präzipitiert und darüber hinaus einige Proteine co-präzipitiert werden, die Interaktionspartner von K1-HA und C7-V5 darstellen könnten (siehe Abb. 4.25 und Abb. 4.26). Die massenspektrometrische Analyse dieser daraufhin ausgeschnittenen co-präzipitierten Proteine (z.B. Proteinpunkt Z1, Abb. 4.25) ließ jedoch in den meisten Fällen keine Zuordnung zu einer bekannten Aminosäuresequenz in Protein-Datenbanken zu. Vermutlich war die Peptid-Menge nicht ausreichend, um mit dem Massenspektrometer eine Aminosäuresequenz zu bestimmen (persönliche Kommunikation mit Dr. Andreas Reuter, Paul-Ehrlich-Institut).

Das CP77-Protein, das die *host-range*-Funktion von K1 und C7 übernehmen kann, führt interagierende zelluläre Proteine dem proteasomalen Abbau zu (siehe Abs. 2.4.2). Deshalb bestand die Hypothese, dass K1 und C7 evtl. interagierende Proteine auch dem Abbau zuführen könnten, wodurch eine Identifizierung durch Co-Immünpräzipitierung schwierig wäre. Aus diesem Grund wurden im Folgenden Lysate von Zellen zur Co-Immünpräzipitierung eingesetzt, die in Anwesenheit des Proteasominhibitors MG-132 mit MVA-K1L-HA bzw. MVA-C7L-V5 infiziert worden waren. Hierbei wurde als ein möglicher Interaktionspartner von C7-V5 das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (HNRPK) identifiziert (siehe Abb. 4.28 Nr. Z7 und 7.1). Dieses Protein ist in vielen zellulären Prozessen involviert und vermittelt, soweit bekannt, die Interaktion zwischen Kinasen auf der einen Seite und Chromatin-Remodulierungs-, Transkriptions-, *splicing*- und Translationsfaktoren auf der anderen Seite (Bomsztyk *et al.*, 2004). Darüber hinaus beschreiben einige Studien, dass HNRPK einen Einfluss auf den Lebenszyklus verschiedener Viren hat (Chang *et al.*, 2001; Hernaez *et al.*, 2008; Hernaez *et al.*, 2008; Hsieh *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2005; Wolf *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Schmidt *et al.*, 2010). Es zeigte sich beispielsweise, dass die Überexpression von HNRPK die Replikation von Hepatitis B Virus fördert, wohingegen ein siRNA-vermittelter *knock-down* von HNRPK den Virustiter signifikant verminderte (Ng *et al.*, 2005). Im Herpes



Simplex Virus-1 Lebenszyklus scheint HNRPK beim Austritt der Virionen aus der Wirtszelle wichtig zu sein (Schmidt *et al.*, 2010). Auch eine Interaktion mit dem *African swine fever virus* Protein p30 wurde beschrieben, die möglicherweise zur Herunterregulierung der zellulären Translation führt (Hernaiz *et al.*, 2008). Weiterhin wurde für das Enterovirus 71 eine Interaktion von HNRPK mit dem RNA-Genom des Virus und eine damit verbundene Erhöhung der viralen Replikation beobachtet (Lin *et al.*, 2008). Das multifunktionale Protein HNRPK hat also bei den unterschiedlichsten Viren einen Einfluss auf den Replikationszyklus, was bedeutet, dass es durchaus auch bei VACV die späte Genexpression modulieren könnte. Durch eine Wiederholung der in Abb. 4.28 dargestellten Co-IP ließ sich jedoch die Interaktion nicht reproduzieren (nicht gezeigt).

## **5.6 Die Insertion von F11L und K1L in MVA stellt die Virus-induzierte Zellbewegung, jedoch nicht das virale Wachstum in Säugierzellen wieder her**

Die Blockade des Lebenszyklus von MVA in Säugierzellen, wie z.B. HeLa-Zellen, ist durch eine Akkumulation von unreifen Virionen (IV) gekennzeichnet, welche nicht weiter zu infektiösen Partikeln reifen (Sutter and Moss, 1992). Ein ähnlicher Phänotyp zeigte sich nach einem *knock-down* von F11L in VACV WR infizierten HeLa-Zellen, der sowohl zu Ansammlungen von IV als auch zu vermindertem viralem Wachstum führte (Valderrama *et al.*, 2006). Dies ließ auf einen Einfluss von F11 auf die Virionemorphogenese schließen, zusätzlich gestützt durch die Co-Lokalisation von F11 mit den *viral factories* (Valderrama *et al.*, 2006). Da MVA nicht mehr für ein funktionales F11-Protein kodiert, bestand die Vermutung, dass die Insertion eines vollständigen F11L-Gens das Wachstum von MVA in HeLa-Zellen und damit evtl. auch anderen Zellen wiederherstellen könnte. Darüber hinaus wurde analysiert, ob die zusätzliche Expression von K1L für die Wiederherstellung der Replikationsfähigkeit nötig ist.

Das Wiedereinsetzen von F11L in MVA resultierte in F11-Expression (siehe Abb. 4.30 E), Migration (siehe Abb. 4.31 A und B) und einem Verlust der zentralen Aktinstressfasern infizierter Zellen (siehe Abb. 4.31 C). Die Zellbewegung von BS-C-1-Zellen erfolgte nach Infektion mit allen F11L-kodierenden Viren (MVA-F11L, MVA-F11L-K1L und VACV WR). Obwohl die Anzahl der in die „Wunde“ im Zellrasen einwandernden MVA-F11L- und MVA-F11L-K1L-infizierten Zellen einerseits

signifikant höher war als die Anzahl bei MVA-infizierten Zellen, war sie andererseits deutlich geringer im Vergleich zu VACV WR-infizierten Zellen (siehe Abb. 4.31 B). F11 induziert die Zellbewegung durch das Binden an das kleine G-Protein *Ras homolog gene family, member A* (RhoA), wodurch stromabwärts keine Signaltransduktion zu *Diaphanous-related formin* (mDia) mehr stattfindet, dass an der Regulation der Aktinpolymerisierung beteiligt ist (Valderrama *et al.*, 2006). Es wurde jedoch darüber hinaus bereits spekuliert, dass die zur RhoA-Familie gehörenden Proteine *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac) und *cell division cycle 42* (Cdc42), welche auch an der Regulation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts beteiligt sind, durch VACV-kodierte Proteine beeinflusst werden könnten (Arakawa *et al.*, 2007). Obwohl MVA-F11L und MVA-F11L-K1L eine zu VACV WR vergleichbare F11-Proteinmenge exprimierten, wurde bei vergleichsweise weniger Zellen die Bewegung induziert. Dieser Fakt lässt darauf schließen, dass MVA neben F11L andere Gene verloren haben muss, welche die Zellbewegung induzieren. Ein Gen, welches im MVA-Genom inaktiv ist und hier auch analysiert wurde, ist K1L. Wie bereits erwähnt interagiert K1 mit ACAP2, einem GTPase aktivierendes Protein (GAP) für Arf6, wobei diese Interaktion nicht mit der *host-range*-Funktion von K1 in Verbindung steht (Bradley and Terajima, 2005). Interessanterweise ist Arf6 involviert in dem Prozess der Aktinremodulierung und Zellmigration (Donaldson, 2003). Somit wäre K1 auch ein guter Kandidat gewesen, an der VACV-induzierten Zellbewegung mitzuwirken. Aus den hier vorgestellten Daten geht jedoch klar hervor, dass K1 keinen Einfluss darauf hat (Abb. 4.31 A und B).

Die zentrale Frage der Studien zu F11L war, ob ein funktionales F11L in MVA die Wirtsrestriktion von MVA in murinen und humanen Zellen wieder aufheben kann. Die Mehrstufen-Wachstumsanalysen zeigten jedoch, dass die F11L-Expression keinen Einfluss auf das virale Wachstum oder die Permissivität der Zellen hat (siehe Abb. 4.33). Dies äußerte sich auch in den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Virionenmorphogenese in HeLa-Zellen, da hier kein Unterschied zum charakteristischen Phänotyp von MVA in diesen Zellen zu verzeichnen war und dementsprechend nur IV nach MVA-F11L-Infektion zu beobachten waren (siehe Abb. 4.34) (Sutter and Moss, 1992). Im Gegensatz dazu wurde die erwartete Erweiterung der *host-range* von K1L-kodierenden Viren (MVA-K1L und MVA-F11L-K1L) auf RK-13-Zellen bestätigt (siehe Abb. 4.33 C).

Morales und Kollegen (Morales *et al.*, 2008) zeigten, dass eine VACV WR F11L-Deletionsmutante (VACV $\Delta$ F11L) einen kleineren Plaquephänotyp bei BSC40-Zellen verursacht als VACV WR. Das Wiedereinsetzen von F11L in MVA hingegen hatte

keinen Einfluss auf die Virusausbreitung und somit auf die Plaquegröße (siehe Abb. 4.32). Die signifikant höhere Induktion der Zellbewegung von zumindest BS-C-1-Zellen nach MVA-F11L- und MVA-F11L-K1L-Infektion hätte vermuten lassen, dass bei diesen Zellen auch eine zu MVA vergleichsweise stärkere Virusausbreitung zu beobachten wäre. Jedoch scheint die nur zum Teil wiederhergestellte Auslösung der Migration hierfür nicht auszureichend zu sein. Alternativ könnte die VACV-bedingte Zellbewegung nicht der entscheidende Faktor für die Virusausbreitung sein. Die Induktion von Aktinschwänzen durch Zell-assoziierte extrazelluläre Virionen (engl.: *cellular-associated extracellular virion*, CEV, siehe Abb. 2.2 Nr.17) und ihre Auswirkung auf die Infektion benachbarter Zellen, wurde bereits als wichtiger Prozess bei der VACV-Ausbreitung beschrieben (Ward and Moss, 2001). Die Fähigkeit von MVA, die Bildung von Aktinschwänzen auszulösen, scheint in infizierten CEF erhalten zu sein (Meiser *et al.*, 2003). In BSC-40-Zellen hingegen scheint dies jedoch nicht der Fall zu sein (Gallego-Gomez *et al.*, 2003). Weiterhin ist selbst bei einer Infektion mit einer hohen *moi*, bei welcher die Virusausbreitung nicht in die Wachstumskinetik mit einfließt, da jede Zelle direkt infiziert wird, der Virus-Titeranstieg von MVA in BS-C-1-Zellen deutlich niedriger als bei VACV WR (Carroll and Moss, 1997). Schlussfolgernd lässt dies vermuten, dass die Virusverbreitung von MVA zumindest bei BS-C-1-Zellen weniger von der Induktion der Zellbewegung abhängt als von der Kinetik der viralen Replikation und Virionenbildung. Zusammengefasst konnte durch die hier vorgestellten Daten eindeutig belegt werden, dass F11L die Restriktion von MVA in Säugerzellen nicht wiederaufheben kann, wobei die Co-Expression von K1L auf dieses Resultat keinen Einfluss hatte.

## 5.7 Ausblick

In dieser Arbeit wurden neue Aspekte von K1 und C7 beschrieben. Um die Fragestellung zu beantworten, wie beide Proteine die späte Genexpression von VACV ermöglichen, scheint es unerlässlich zu sein, den oder die zellulären Interaktionspartner zu identifizieren. Hierfür werden MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5 auch in zukünftigen Analysen wertvolle Werkzeuge darstellen. Darüber hinaus sollte die hier entdeckte Interaktion von C7 mit HNRPK nochmals verifiziert werden. Eine andere Arbeitsgruppe, welche versuchte Interaktionspartner von C7 und K1 zu identifizieren, hatte ähnliche Probleme bei den Co-IPs, wie in der vorliegenden Arbeit. K1 und C7 wurden präzipitiert, jedoch wurde kein Protein co-präzipitiert (persönliche

Kommunikation mit Dr. Yan Xiang, Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Health, USA). Um dieses Problem in Zukunft zu umgehen, könnten so genannte *cross-linker* eingesetzt werden, welche miteinander interagierende Proteine chemisch verbinden, wodurch die Interaktionen stabilisiert würden.

Ein anderer Ansatz besteht darin, das vermeintliche ISG ausfindig zu machen, welches das Vorhandensein von K1 oder C7 nötig macht (diskutiert in Abs. 5.1). Mit Hilfe von Expressionsplasmiden der unterschiedlichen ISG könnte untersucht werden, welches die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L im Gegensatz zu MVA in Huh7- oder 293T-Zellen verhindert. Es sind bereits ca. 50 ISG-Expressionsplasmide beschrieben, die hierfür verwendet werden könnten (Jiang *et al.*, 2008; Itsui *et al.*, 2006).

Zusätzlich würde es sich anbieten, weiter nach dem PKR-aktivierenden Stimulus zu suchen, welcher durch K1 und C7 unterdrückt wird. Hierfür könnte vergleichend die Bildung von dsRNA während der Replikation von MVA $\Delta$ C7L und MVA untersucht werden. Wie bereits erwähnt, zeigten kürzlich präsentierte Ergebnisse zu CP77, dass dieses Protein den *turn-over* der intermediären viralen mRNA erhöht. Dadurch liegt die dsRNA, die sich durch die komplementären Bereiche der Transkripte bilden, nur zeitlich begrenzt in der Wirtszelle vor. Vielleicht reduzieren K1 oder C7 auch die Bildung von dsRNA während der Replikation von VACV, welche eben zur beobachteten PKR-Aktivierung führen würde.

Letztlich könnten C7 und K1 dazu dienen, ein bisher unbekanntes zelluläres Protein aufzuspüren, das die VACV-Infektion in der Wirtszelle erkennt. Beispielsweise wurden viele zelluläre Faktoren, die virale DNA im Zytoplasma erkennen, wie DAI, AIM2 oder die RNA-Polymerase III, erst in den letzten Jahren entdeckt (Takaoka *et al.*, 2007; Schroder *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2009). Chiu und Kollegen mutmaßten bereits, dass es neben den bekannten zytoplasmatischen DNA-Sensoren noch andere geben muss, die bisher unbekannt sind (Chiu *et al.*, 2009). Diese könnten potentiell über die Interaktion mit K1 oder C7 entdeckt werden.

In Bezug auf den eingeschränkten Wirtstropismus von MVA wurde das F11L-Gen als mögliches verlorenes *host-range*-Gen ausgeschlossen. Zur Identifizierung unbekannter *host-range*-Gene könnten die sechs großen Deletionen, welche mehrere Gene umfassen, in das MVA-Genom wieder inseriert werden. Erste Arbeiten hierzu zeigten, dass die Insertion der durch die Deletion I verlorenen Gene den eingeschränkten Wirtstropismus von MVA zum Teil wiederherstellen konnte (Zwilling *et al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Darüber hinaus wurde kürzlich veröffentlicht, dass die F11-Funktion in VACV WR für die Virusausbreitung *in vitro* und *in vivo* wichtig ist. Obwohl die hier gezeigten Ergebnisse diese Beobachtungen nicht stützen können, wurde erwogen, F11L in VACV-basierenden Impfstoffvektoren aus Sicherheitsgründen zu deletieren (Cordeiro *et al.*, 2009). In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *host-range*-Restriktion von MVA durch die Insertion von F11L alleine nicht aufgehoben werden kann. Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die *in vivo* Attenuierung von MVA durch eine zusätzliche F11L-Expression unbeeinflusst wäre. Andererseits könnte die möglicherweise auch unter nicht-permissiven Bedingungen (*in vivo*) teilweise wiederhergestellte Zellbewegung in MVA-F11L-infizierten Zellen die Vakzin-Eigenschaften von MVA verbessern, da so die infizierten Zellen potentiell besser mit Komponenten des Immunsystems in Kontakt kämen. Somit könnte MVA-F11L als Impfvektor eine bessere Immunantwort auslösen als MVA.

In diesem Zusammenhang scheint entweder C7L oder K1L für MVA als Impfvektor zwingend erforderlich zu sein, da die späten Genprodukte wichtig sind für den Aufbau einer Immunantwort (Backes, 2008). Ob MVA $\Delta$ C7L-K1L gegenüber MVA als Impfvektor besser wäre, ist fraglich, da eine unterschiedliche Funktionalität scheinbar nur in Kaninchenzellen vorhanden ist.

Letztlich wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Deletion der F11L-Restsequenz keinen negativen Einfluss hat, da keine Unterschiede zwischen MVA und MVA $\Delta$ F11L zu beobachten waren. Deshalb könnte in Zukunft dieser Locus als alternative Insertionsstelle für exogene Sequenzen in das MVA-Genom genutzt werden.

## 6 Literaturangaben

Albers, M., Kranz, H., Kober, I., Kaiser, C., Klink, M., Suckow, J., Kern, R., Koegl, M., 2005. Automated yeast two-hybrid screening for nuclear receptor-interacting proteins. *Mol.Cell Proteomics*. 4, 205-213.

Albrecht, M., Alessandri, S., Conti, A., Reuter, A., Lauer, I., Vieths, S., Reese, G., 2008. High level expression, purification and physico- and immunochemical characterisation of recombinant Pen a 1: a major allergen of shrimp. *Mol.Nutr.Food Res.* 52 Suppl 2, S186-S195.

Altenburger, W., Suter, C. P., Altenburger, J., 1989. Partial deletion of the human host range gene in the attenuated vaccinia virus MVA. *Arch.Virol.* 105, 15-27.

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

Arakawa, Y., Cordeiro, J. V., Way, M., 2007. F11L-mediated inhibition of RhoA-mDia signaling stimulates microtubule dynamics during vaccinia virus infection. *Cell Host.Microbe* 1, 213-226.

Backes, S. Vaccinia virus host range factor C7L plays an important regulatory role in the MVA life cycle. 19-5-2008. Technische Universität München.  
Ref Type: Thesis/Dissertation

Backes, S., Sperling, K. M., Zwilling, J., Gasteiger, G., Ludwig, H., Kremmer, E., Schwantes, A., Staib, C., Sutter, G., 2010. Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha. *J.Gen.Virol.* 91, 470-482.

beattie, E., kauffman, E. B., Martinez, H., Perkus, M. E., Jacobs, B. L., Paoletti, E., Tartaglia, J., 1996. Host-range restriction of vaccinia virus E3L-specific deletion mutants. *Virus Genes* 12, 89-94.

beattie, E., Tartaglia, J., Paoletti, E., 1991. Vaccinia virus-encoded eIF-2 alpha homolog abrogates the antiviral effect of interferon. *Virology* 183, 419-422.

Berlanga, J.J., Ventoso, I., Harding, H. P., Deng, J., Ron, D., Sonenberg, N., Carrasco, L., de Haro, C., 2006. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2alpha kinase GCN2 against RNA viruses. *EMBO J.* 25, 1730-1740.

Bisht, H., Weisberg, A. S., Moss, B., 2008. Vaccinia virus I1 protein is required for cell entry and membrane fusion. *J.Virol.* 82, 8687-8694.

Bochar, D.A., Wang, L., Beniya, H., Kinev, A., Xue, Y., Lane, W. S., Wang, W., Kashanchi, F., Shiekhhattar, R., 2000. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF-related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. *Cell* 102, 257-265.

Bomsztyk, K., Denisenko, O., Ostrowski, J., 2004. hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-638.

- Boone, R.F., Parr, R. P., Moss, B., 1979. Intermolecular duplexes formed from polyadenylated vaccinia virus RNA. *J.Virol.* 30, 365-374.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N. E., 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J.Cell Biol.* 106, 761-771.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72, 248-254.
- Bradley, R.R., Terajima, M., 2005. Vaccinia virus K1L protein mediates host-range function in RK-13 cells via ankyrin repeat and may interact with a cellular GTPase-activating protein. *Virus Res* 114, 104-112.
- Brandt, T.A., Jacobs, B. L., 2001. Both carboxy- and amino-terminal domains of the vaccinia virus interferon resistance gene, E3L, are required for pathogenesis in a mouse model. *J.Virol.* 75, 850-856.
- Breman, J.G., Arita, I., Fenner, F., 2003. Preventing the return of smallpox. *N.Engl.J.Med.* 348, 463-466.
- Brent, R., Ptashne, M., 1985. A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* 43, 729-736.
- Brown, E., Senkevich, T. G., Moss, B., 2006. Vaccinia virus F9 virion membrane protein is required for entry but not virus assembly, in contrast to the related L1 protein. *J.Virol.* 80, 9455-9464.
- Broyles, S.S., 2003. Vaccinia virus transcription. *J.Gen.Virol.* 84, 2293-2303.
- Budt, M., Niederstadt, L., Valchanova, R. S., Jonjic, S., Brune, W., 2009. Specific inhibition of the PKR-mediated antiviral response by the murine cytomegalovirus proteins m142 and m143. *J.Virol.* 83, 1260-1270.
- Carroll, K., Elroy-Stein, O., Moss, B., Jagus, R., 1993. Recombinant vaccinia virus K3L gene product prevents activation of double-stranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* 268, 12837-12842.
- Carroll, M.W., Moss, B., 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* 238, 198-211.
- Chang, C.J., Luh, H. W., Wang, S. H., Lin, H. J., Lee, S. C., Hu, S. T., 2001. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP K) interacts with dengue virus core protein. *DNA Cell Biol.* 20, 569-577.
- Chang, H.W., Jacobs, B. L., 1993a. Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* 194, 537-547.
- Chang, H.W., Jacobs, B. L., 1993b. Identification of a conserved motif that is necessary for binding of the vaccinia virus E3L gene products to double-stranded RNA. *Virology* 194, 537-547.

- Chang, H.W., Watson, J. C., Jacobs, B. L., 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89, 4825-4829.
- Chang, S.J., Hsiao, J. C., Sonnberg, S., Chiang, C. T., Yang, M. H., Tzou, D. L., Mercer, A. A., Chang, W., 2009. Poxvirus host range protein CP77 contains an F-box-like domain that is necessary to suppress NF-kappaB activation by tumor necrosis factor alpha but is independent of its host range function. *J.Virol.* 83, 4140-4152.
- Chiu, Y.H., Macmillan, J. B., Chen, Z. J., 2009. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell* 138, 576-591.
- Chung, C.S., Hsiao, J. C., Chang, Y. S., Chang, W., 1998. A27L protein mediates vaccinia virus interaction with cell surface heparan sulfate. *J.Virol.* 72, 1577-1585.
- Clemens, M.J., 2001. Initiation factor eIF2 alpha phosphorylation in stress responses and apoptosis. *Prog.Mol.Subcell.Biol.* 27, 57-89.
- Cordeiro, J.V., Guerra, S., Arakawa, Y., Dodding, M. P., Esteban, M., Way, M., 2009. F11-mediated inhibition of RhoA signalling enhances the spread of vaccinia virus in vitro and in vivo in an intranasal mouse model of infection. *PLoS.ONE.* 4, e8506.
- Dales, S., Mosbach, E. H., 1968. Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology* 35, 564-583.
- de Haro, C., Mendez, R., Santoyo, J., 1996. The eIF-2alpha kinases and the control of protein synthesis. *FASEB J.* 10, 1378-1387.
- de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J. M., Silverman, R. H., Williams, B. R., 2001. Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J.Leukoc.Biol.* 69, 912-920.
- Deane, C.M., Salwinski, L., Xenarios, I., Eisenberg, D., 2002. Protein interactions: two methods for assessment of the reliability of high throughput observations. *Mol.Cell Proteomics.* 1, 349-356.
- DeLange, A.M., McFadden, G., 1987. Efficient resolution of replicated poxvirus telomeres to native hairpin structures requires two inverted symmetrical copies of a core target DNA sequence. *J.Virol.* 61, 1957-1963.
- Deroo, B.J., Archer, T. K., 2002. Differential activation of the IkappaBalpha and mouse mammary tumor virus promoters by progesterone and glucocorticoid receptors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* 81, 309-317.
- Diaz-Guerra, M., Rivas, C., Esteban, M., 1997. Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 227, 220-228.
- DiRenzo, J., Shang, Y., Phelan, M., Sif, S., Myers, M., Kingston, R., Brown, M., 2000. BRG-1 is recruited to estrogen-responsive promoters and cooperates with factors involved in histone acetylation. *Mol.Cell Biol.* 20, 7541-7549.
- Donaldson, J.G., 2003. Multiple roles for Arf6: sorting, structuring, and signaling at the plasma membrane. *J Biol Chem* 278, 41573-41576.



- Drexler, I., Heller, K., Wahren, B., Erfle, V., Sutter, G., 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* 79 ( Pt 2), 347-52.
- Drexler, I., Staib, C., Sutter, G., 2004. Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? *Curr.Opin.Biotechnol.* 15, 506-512.
- Drillien, R., Koehren, F., Kirn, A., 1981. Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells. *Virology* 111, 488-499.
- Dunaief, J.L., Strober, B. E., Guha, S., Khavari, P. A., Alin, K., Luban, J., Begemann, M., Crabtree, G. R., Goff, S. P., 1994. The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest. *Cell* 79, 119-130.
- Engelstad, M., Smith, G. L., 1993. The vaccinia virus 42-kDa envelope protein is required for the envelopment and egress of extracellular virus and for virus virulence. *Virology* 194, 627-637.
- Fenner, F., 1982. A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev.Infect.Dis.* 4, 916-930.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., Ladnyi, I. D., 1988. Smallpox and its eradication. World Health Organization, Geneva.
- Fornaro, M., Raimondo, S., Lee, J. M., Giacobini-Robecchi, M. G., 2007. Neuron-specific Hu proteins sub-cellular localization in primary sensory neurons. *Ann.Anat.* 189, 223-228.
- Gallego-Gomez, J.C., Risco, C., Rodriguez, D., Cabezas, P., Guerra, S., Carrascosa, J. L., Esteban, M., 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.* 77, 10606-10622.
- Garcia, M.A., Meurs, E. F., Esteban, M., 2007. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. *Biochimie* 89, 799-811.
- Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., 1985. Mapping of a vaccinia host range sequence by insertion into the viral thymidine kinase gene. *J.Virol.* 53, 316-318.
- Gillard, S., Spehner, D., Drillien, R., Kirn, A., 1986. Localization and sequence of a vaccinia virus gene required for multiplication in human cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83, 5573-5577.
- Gorg, A., Weiss, W., Dunn, M. J., 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* 4, 3665-3685.
- Griffiths, G., 1993. *Fine Structure Immunocytochemistry.* Springer, Heidelberg.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., Ron, D., 2000a. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol.Cell* 6, 1099-1108.

- Harding, H.P., Zhang, Y., Bertolotti, A., Zeng, H., Ron, D., 2000b. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol.Cell* 5, 897-904.
- Harrison, S.C., Alberts, B., Ehrenfeld, E., Enquist, L., Fineberg, H., McKnight, S. L., Moss, B., O'Donnell, M., Ploegh, H., Schmid, S. L., Walter, K. P., Theriot, J., 2004. Discovery of antivirals against smallpox. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101, 11178-11192.
- Hayden, M.S., West, A. P., Ghosh, S., 2006. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 25, 6758-6780.
- Healy, G.M., Teleki, S., von Seefried, A., Walton, M. J., Macmorine, H. G., 1971. Improved chemically defined basal medium (CMRL-1969) for primary monkey kidney and human diploid cells. *Appl.Microbiol.* 21, 1-5.
- Herbert, A., Alfken, J., Kim, Y. G., Mian, I. S., Nishikura, K., Rich, A., 1997. A Z-DNA binding domain present in the human editing enzyme, double-stranded RNA adenosine deaminase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94, 8421-8426.
- Hernaez, B., Escribano, J. M., Alonso, C., 2008. African swine fever virus protein p30 interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K) during infection. *FEBS Lett.* 582, 3275-3280.
- Hornemann, S., Harlin, O., Staib, C., Kisling, S., Erfle, V., Kaspers, B., Hacker, G., Sutter, G., 2003. Replication of modified vaccinia virus Ankara in primary chicken embryo fibroblasts requires expression of the interferon resistance gene E3L. *J Virol* 77, 8394-407.
- Hoshikawa, S., Ogata, T., Fujiwara, S., Nakamura, K., Tanaka, S., 2008. A novel function of RING finger protein 10 in transcriptional regulation of the myelin-associated glycoprotein gene and myelin formation in Schwann cells. *PLoS.ONE.* 3, e3464.
- Hsiao, J.C., Chung, C. S., Chang, W., 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.* 72, 8374-8379.
- Hsiao, J.C., Chung, C. S., Chang, W., 1999. Vaccinia virus envelope D8L protein binds to cell surface chondroitin sulfate and mediates the adsorption of intracellular mature virions to cells. *J.Virol.* 73, 8750-8761.
- Hsiao, J.C., Chung, C. S., Drillien, R., Chang, W., 2004. The cowpox virus host range gene, CP77, affects phosphorylation of eIF2 alpha and vaccinia viral translation in apoptotic HeLa cells. *Virology* 329, 199-212.
- Hsieh, T.Y., Matsumoto, M., Chou, H. C., Schneider, R., Hwang, S. B., Lee, A. S., Lai, M. M., 1998. Hepatitis C virus core protein interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *Journal of Biological Chemistry* 273, 17651-17659.
- Hu, P., Wu, S., Sun, Y., Yuan, C. C., Kobayashi, R., Myers, M. P., Hernandez, N., 2002. Characterization of human RNA polymerase III identifies orthologues for *Saccharomyces cerevisiae* RNA polymerase III subunits. *Mol.Cell Biol.* 22, 8044-8055.

- Husain, M., Moss, B., 2003. Evidence against an essential role of COPII-mediated cargo transport to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment in the formation of the primary membrane of vaccinia virus. *J.Virol.* 77, 11754-11766.
- Immler, D., Gremm, D., Kirsch, D., Spengler, B., Presek, P., Meyer, H. E., 1998. Identification of phosphorylated proteins from thrombin-activated human platelets isolated by two-dimensional gel electrophoresis by electrospray ionization-tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) and liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS). *Electrophoresis* 19, 1015-1023.
- Itsui, Y., Sakamoto, N., Kurosaki, M., Kanazawa, N., Tanabe, Y., Koyama, T., Takeda, Y., Nakagawa, M., Kakinuma, S., Sekine, Y., Maekawa, S., Enomoto, N., Watanabe, M., 2006. Expressional screening of interferon-stimulated genes for antiviral activity against hepatitis C virus replication. *J.Viral Hepat.* 13, 690-700.
- Izmailyan, R.A., Huang, C. Y., Mohammad, S., Isaacs, S. N., Chang, W., 2006. The envelope G3L protein is essential for entry of vaccinia virus into host cells. *J.Virol.* 80, 8402-8410.
- Jackson, T.R., Brown, F. D., Nie, Z., Miura, K., Foroni, L., Sun, J., Hsu, V. W., Donaldson, J. G., Randazzo, P. A., 2000. ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *J.Cell Biol.* 151, 627-638.
- Jenner, E., 1796. *An Enquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae, a Disease Discovered in Some of the Western Counties of England Known by the Name of the Cow Pox.* Law Murray & Highly, London, England.
- Jiang, D., Guo, H., Xu, C., Chang, J., Gu, B., Wang, L., Block, T. M., Guo, J. T., 2008. Identification of three interferon-inducible cellular enzymes that inhibit the replication of hepatitis C virus. *J.Virol.* 82, 1665-1678.
- Jordan, I., Horn, D., Oehmke, S., Leendertz, F. H., Sandig, V., 2009. Cell lines from the Egyptian fruit bat are permissive for modified vaccinia Ankara. *Virus Res.* 145, 54-62.
- Jordan, R., Wang, L., Graczyk, T. M., Block, T. M., Romano, P. R., 2002. Replication of a cytopathic strain of bovine viral diarrhoea virus activates PERK and induces endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of MDBK cells. *J.Virol.* 76, 9588-9599.
- Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., Emerson, B. M., 2000. Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev.* 14, 2441-2451.
- Katsafanas, G.C., Moss, B., 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. *Journal of Biological Chemistry* 279, 52210-52217.
- Katsafanas, G.C., Moss, B., 2007. Colocalization of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus factories coordinates viral expression and subjugates host functions. *Cell Host.Microbe* 2, 221-228.
- Keegan, L., Gill, G., Ptashne, M., 1986. Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* 231, 699-704.

- Khabar, K.S., Dhalla, M., Siddiqui, Y., Zhou, A., Al Ahdal, M. N., Der, S. D., Silverman, R. H., Williams, B. R., 2000. Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *J. Interferon Cytokine Res.* 20, 653-659.
- Kochan, G., Escors, D., Gonzalez, J. M., Casasnovas, J. M., Esteban, M., 2008. Membrane cell fusion activity of the vaccinia virus A17-A27 protein complex. *Cell Microbiol.* 10, 149-164.
- Kowenz-Leutz, E., Leutz, A., 1999. A C/EBP beta isoform recruits the SWI/SNF complex to activate myeloid genes. *Mol. Cell* 4, 735-743.
- Kumar, R., Choubey, D., Lengyel, P., Sen, G. C., 1988. Studies on the role of the 2'-5'-oligoadenylate synthetase-RNase L pathway in beta interferon-mediated inhibition of encephalomyocarditis virus replication. *J. Virol.* 62, 3175-3181.
- Langland, J.O., Jacobs, B. L., 2002. The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 299, 133-141.
- Le May, N., Mansuroglu, Z., Leger, P., Josse, T., Blot, G., Billecocq, A., Flick, R., Jacob, Y., Bonnefoy, E., Bouloy, M., 2008. A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells. *PLoS Pathog.* 4, e13.
- Li, Y., Meng, X., Xiang, Y., Deng, J., 2010. Structure function studies of vaccinia virus host range protein k1 reveal a novel functional surface for ankyrin repeat proteins. *J. Virol.* 84, 3331-3338.
- Lin, C.L., Chung, C. S., Heine, H. G., Chang, W., 2000. Vaccinia virus envelope H3L protein binds to cell surface heparan sulfate and is important for intracellular mature virion morphogenesis and virus infection in vitro and in vivo. *J. Virol.* 74, 3353-3365.
- Lin, J., Friesen, M. T., Bocangel, P., Cheung, D., Rawszer, K., Wigle, J. T., 2005. Characterization of Mesenchyme Homeobox 2 (MEOX2) transcription factor binding to RING finger protein 10. *Mol. Cell Biochem.* 275, 75-84.
- Lin, J.Y., Li, M. L., Huang, P. N., Chien, K. Y., Horng, J. T., Shih, S. R., 2008. Heterogeneous nuclear ribonuclear protein K interacts with the enterovirus 71 5' untranslated region and participates in virus replication. *J. Gen. Virol.* 89, 2540-2549.
- Liu, R., Liu, H., Chen, X., Kirby, M., Brown, P. O., Zhao, K., 2001. Regulation of CSF1 promoter by the SWI/SNF-like BAF complex. *Cell* 106, 309-318.
- Ludwig, H., Suezter, Y., Waibler, Z., Kalinke, U., Schnierle, B. S., Sutter, G., 2006. Double-stranded RNA-binding protein E3 controls translation of viral intermediate RNA, marking an essential step in the life cycle of modified vaccinia virus Ankara. *J. Gen. Virol.* 87, 1145-1155.
- Luo, H.R., Saiardi, A., Nagata, E., Ye, K., Yu, H., Jung, T. S., Luo, X., Jain, S., Sawa, A., Snyder, S. H., 2001. GRAB: a physiologic guanine nucleotide exchange factor for Rab3A, which interacts with inositol hexakisphosphate kinase. *Neuron* 31, 439-451.
- Lynch, H.E., Ray, C. A., Oie, K. L., Pollara, J. J., Petty, I. T., Sadler, A. J., Williams, B. R., Pickup, D. J., 2009. Modified vaccinia virus Ankara can activate NF-kappaB

- transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology* 391, 177-186.
- Mahnel, H., Mayr, A., 1994. [Experiences with immunization against orthopox viruses of humans and animals using vaccine strain MVA]. *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 107, 253-256.
- Martin, S., Shisler, J. L., 2009. Early viral protein synthesis is necessary for NF-kappaB activation in modified vaccinia Ankara (MVA)-infected 293 T fibroblast cells. *Virology* 390, 298-306.
- Mayr, A., Hochstein-Mintzel, V., Stickl, H., 1975. Abstammung, Eigenschaften und Verwendung des attenuierten Vaccinia-Stammes MVA. *Infection* 3, 6-14.
- McFadden, G., 2005. Poxvirus tropism. *Nat.Rev.Microbiol.* 3, 201-213.
- Meiser, A., Boulanger, D., Sutter, G., Krijnse Locker, J., 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* 84, 1383-92.
- Meisinger-Henschel, C., Schmidt, M., Lukassen, S., Linke, B., Krause, L., Konietzny, S., Goesmann, A., Howley, P., Chaplin, P., Suter, M., Hausmann, J., 2007. Genomic sequence of chorioallantois vaccinia virus Ankara, the ancestor of modified vaccinia virus Ankara. *J.Gen.Virol.* 88, 3249-3259.
- Meng, X., Xiang, Y., 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* 353, 220-233.
- Meng, X., Chao, J., Xiang, Y., 2008. Identification from diverse mammalian poxviruses of host-range regulatory genes functioning equivalently to vaccinia virus C7L. *Virology* 372, 372-383.
- Meng, X., Jiang, C., Arsenio, J., Dick, K., Cao, J., Xiang, Y., 2009. Vaccinia virus K1L and C7L inhibit antiviral activities induced by type I interferons. *J.Virol.* 83, 10627-10636.
- Mercer, J., Helenius, A., 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
- Meyer, H., Sutter, G., Mayr, A., 1991. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *J Gen Virol* 72 ( Pt 5), 1031-8.
- Morales, I., Carbajal, M. A., Bohn, S., Holzer, D., Kato, S. E. M., Greco, F. A. B., Moussatche, N., Locker, J. K., 2008. The vaccinia virus F11L gene product facilitates cell detachment and promotes migration. *Traffic* 9, 1283-1298.
- Moss, B., 2006. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology.* 344, 48-54.
- Moss, B., 2007. *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*. In: D. M. Knipe, P. M. Howley (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2905-2946.

- Murphy, D.J., Hardy, S., Engel, D. A., 1999. Human SWI-SNF component BRG1 represses transcription of the c-fos gene. *Mol.Cell Biol.* 19, 2724-2733.
- Najera, J.L., Gomez, C. E., Domingo-Gil, E., Gherardi, M. M., Esteban, M., 2006. Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J.Virol.* 80, 6033-6047.
- Ng, L.F., Chan, M., Chan, S. H., Cheng, P. C., Leung, E. H., Chen, W. N., Ren, E. C., 2005. Host heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) as a potential target to suppress hepatitis B virus replication. *PLoS.Med.* 2, e163.
- Nichols, R.J., Stanitsa, E., Unger, B., Traktman, P., 2008. The vaccinia virus gene I2L encodes a membrane protein with an essential role in virion entry. *J.Virol.* 82, 10247-10261.
- Oguiura, N., Spehner, D., Drillien, R., 1993. Detection of a protein encoded by the vaccinia virus C7L open reading frame and study of its effect on virus multiplication in different cell lines. *J.Gen.Virol.* 74 ( Pt 7), 1409-1413.
- Oie, K.L., Pickup, D. J., 2001. Cowpox virus and other members of the orthopoxvirus genus interfere with the regulation of NF-kappaB activation. *Virology* 288, 175-187.
- Ojeda, S., Domi, A., Moss, B., 2006. Vaccinia virus G9 protein is an essential component of the poxvirus entry-fusion complex. *J.Virol.* 80, 9822-9830.
- Okeke, M.I., Nilssen, O., Traavik, T., 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.* 87, 21-27.
- Osman, F., Jarrous, N., Ben Asouli, Y., Kaempfer, R., 1999. A cis-acting element in the 3'-untranslated region of human TNF-alpha mRNA renders splicing dependent on the activation of protein kinase PKR. *Genes Dev.* 13, 3280-3293.
- Pataer, A., Vorburger, S. A., Barber, G. N., Chada, S., Mhashilkar, A. M., Zou-Yang, H., Stewart, A. L., Balachandran, S., Roth, J. A., Hunt, K. K., Swisher, S. G., 2002. Adenoviral transfer of the melanoma differentiation-associated gene 7 (mda7) induces apoptosis of lung cancer cells via up-regulation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR). *Cancer Res.* 62, 2239-2243.
- Patel, R.C., Sen, G. C., 1998. PACT, a protein activator of the interferon-induced protein kinase, PKR. *EMBO J.* 17, 4379-4390.
- Perissi, V., Jepsen, K., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G., 2010. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat.Rev.Genet.* 11, 109-123.
- Perkus, M.E., Goebel, S. J., Davis, S. W., Johnson, G. P., Limbach, K., Norton, E. K., Paoletti, E., 1990. Vaccinia virus host range genes. *Virology* 179, 276-286.
- Ramsey-Ewing, A., Moss, B., 1995. Restriction of vaccinia virus replication in CHO cells occurs at the stage of viral intermediate protein synthesis. *Virology* 206, 984-993.
- Rivas, C., Gil, J., Melkova, Z., Esteban, M., Diaz-Guerra, M., 1998. Vaccinia virus E3L protein is an inhibitor of the interferon (i.f.n.)-induced 2-5A synthetase enzyme. *Virology* 243, 406-414.

- Rosales, R., Sutter, G., Moss, B., 1994. A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 3794-8.
- Sadler, A.J., Williams, B. R., 2007. Structure and function of the protein kinase R. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 316, 253-292.
- Saelens, X., Kalai, M., Vandenabeele, P., 2001. Translation inhibition in apoptosis: caspase-dependent PKR activation and eIF2-alpha phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 276, 41620-41628.
- Sanderson, C.M., Hollinshead, M., Smith, G. L., 2000. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J.Gen.Virol.* 81, 47-58.
- Sarioglu, H., Lottspeich, F., Walk, T., Jung, G., Eckerskorn, C., 2000. Deamidation as a widespread phenomenon in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of human blood plasma proteins. *Electrophoresis* 21, 2209-2218.
- Satheshkumar, P.S., Anton, L. C., Sanz, P., Moss, B., 2009. Inhibition of the Ubiquitin-Proteasome System Prevents Vaccinia Virus DNA Replication and Expression of Intermediate and Late Genes. *J.Virol.*
- Saurin, A.J., Borden, K. L., Boddy, M. N., Freemont, P. S., 1996. Does this have a familiar RING? *Trends Biochem.Sci.* 21, 208-214.
- Schmidt, T., Striebinger, H., Haas, J., Bailer, S. M., 2010. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is important for Herpes simplex virus-1 propagation. *FEBS Lett.* 584, 4361-4365.
- Schroder, K., Muruve, D. A., Tschopp, J., 2009. Innate immunity: cytoplasmic DNA sensing by the AIM2 inflammasome. *Curr.Biol.* 19, R262-R265.
- Sedgwick, S.G., Smerdon, S. J., 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends Biochem.Sci.* 24, 311-316.
- Senkevich, T.G., Moss, B., 2005. Vaccinia virus H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion. *J.Virol.* 79, 4744-4754.
- Senkevich, T.G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E., Moss, B., 2005. Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 102, 18572-18577.
- Senkevich, T.G., Ward, B. M., Moss, B., 2004. Vaccinia virus A28L gene encodes an essential protein component of the virion membrane with intramolecular disulfide bonds formed by the viral cytoplasmic redox pathway. *J.Virol.* 78, 2348-2356.
- Shisler, J.L., Jin, X. L., 2004. The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. *J.Virol.* 78, 3553-3560.
- Smith, G.L., Law, M., 2004. The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res.* 106, 189-197.
- Smith, G.L., Vanderplassen, A., Law, M., 2002. The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J.Gen.Virol.* 83, 2915-2931.

- Sodeik, B., Krijnse-Locker, J., 2002. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol.* 10, 15-24.
- Spehner, D., Gillard, S., Drillien, R., Kirn, A., 1988. A cowpox virus gene required for multiplication in Chinese hamster ovary cells. *J.Virol.* 62, 1297-1304.
- Sperling, K.M., Schwantes, A., Schnierle, B. S., Sutter, G., 2008. The highly conserved orthopoxvirus 68k ankyrin-like protein is part of a cellular SCF ubiquitin ligase complex. *Virology* 374, 234-239.
- Staib, C., Kisling, S., Erfle, V., Sutter, G., 2005. Inactivation of the viral interleukin 1beta receptor improves CD8+ T-cell memory responses elicited upon immunization with modified vaccinia virus Ankara. *J.Gen.Virol.* 86, 1997-2006.
- Staib, C., Lowel, M., Erfle, V., Sutter, G., 2003. Improved host range selection for recombinant modified vaccinia virus Ankara. *Biotechniques* 34, 694-6.
- Stickl, H.A., 1974. Smallpox vaccination and its consequences: first experiences with the highly attenuated smallpox vaccine "MVA". *Prev.Med.* 3, 97-101.
- Sutter, G., Moss, B., 1992. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10847-51.
- Sutter, G., Ramsey-Ewing, A., Rosales, R., Moss, B., 1994. Stable expression of the vaccinia virus K1L gene in rabbit cells complements the host range defect of a vaccinia virus mutant. *J Virol* 68, 4109-16.
- Sutter, G., Staib, C., 2003. Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr Drug Targets Infect Disord* 3, 263-71.
- Takaoka, A., Wang, Z., Choi, M. K., Yanai, H., Negishi, H., Ban, T., Lu, Y., Miyagishi, M., Kodama, T., Honda, K., Ohba, Y., Taniguchi, T., 2007. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response. *Nature* 448, 501-505.
- Tiefenbach, J., Novac, N., Ducasse, M., Eck, M., Melchior, F., Heinzl, T., 2006. SUMOylation of the corepressor N-CoR modulates its capacity to repress transcription. *Mol.Biol.Cell* 17, 1643-1651.
- Townsley, A.C., Senkevich, T. G., Moss, B., 2005. The product of the vaccinia virus L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all poxviruses that is required for cell entry and cell-cell fusion. *J.Virol.* 79, 10988-10998.
- Treiman, M., Caspersen, C., Christensen, S. B., 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases. *Trends Pharmacol.Sci.* 19, 131-135.
- Valderrama, F., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Frischknecht, F., Way, M., 2006. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* 311, 377-381.
- Varga-Weisz, P., 2001. ATP-dependent chromatin remodeling factors: nucleosome shufflers with many missions. *Oncogene* 20, 3076-3085.



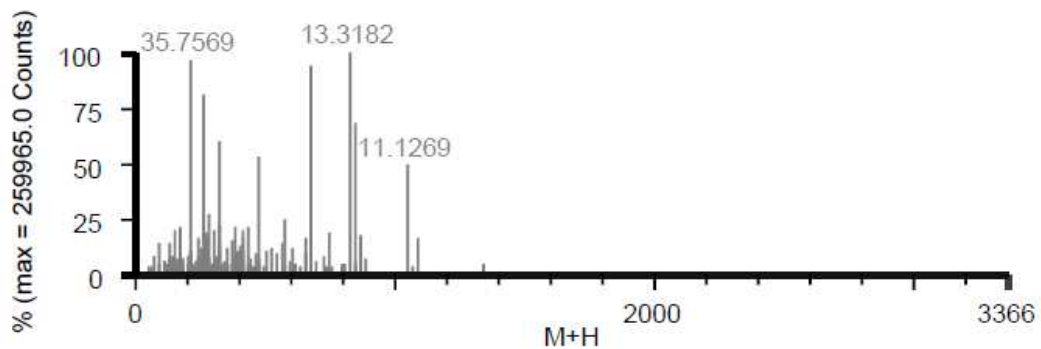
- Waragai, M., Nagamitsu, S., Xu, W., Li, Y. J., Lin, X., Ashizawa, T., 2006. Ataxin 10 induces neuritogenesis via interaction with G-protein beta2 subunit. *J.Neurosci.Res.* 83, 1170-1178.
- Ward, B.M., Moss, B., 2001. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J.Virol.* 75, 11651-11663.
- Werden, S. J., Rahman, M. M., McFadden, G., 2008. Poxvirus host range genes. In: *Adv Virus Res.* pp. 135-171.
- Wilcoxon, F., 1946. Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J.Econ.Entomol.* 39, 269.
- Willis, K.L., Patel, S., Xiang, Y., Shisler, J. L., 2009. The effect of the vaccinia K1 protein on the PKR-eIF2alpha pathway in RK13 and HeLa cells. *Virology* 394, 73-81.
- Wolf, D., Witte, V., Clark, P., Blume, K., Lichtenheld, M. G., Baur, A. S., 2008. HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex. *Cell Host.Microbe* 4, 398-408.
- Wyatt, L.S., Carroll, M. W., Czerny, C. P., Merchlinsky, M., Sisler, J. R., Moss, B., 1998. Marker rescue of the host range restriction defects of modified vaccinia virus Ankara. *Virology* 251, 334-342.
- Zhang, L., Villa, N. Y., McFadden, G., 2009. Interplay between poxviruses and the cellular ubiquitin/ubiquitin-like pathways. *FEBS Lett.* 583, 607-614.
- Zhang, W., Zhang, X., Tian, C., Wang, T., Sarkis, P. T., Fang, Y., Zheng, S., Yu, X. F., Xu, R., 2008. Cytidine deaminase APOBEC3B interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and suppresses hepatitis B virus expression. *Cell Microbiol.* 10, 112-121.
- Zwilling, J., Sliva, K., Schwantes, A., Schnierle, B., Sutter, G., 2010. Functional F11L and K1L genes in modified vaccinia virus Ankara restore virus-induced cell motility but not growth in human and murine cells. *Virology* 404, 231-239.

## 7 Anhang

### 7.1 Ergebnis der massenspektrometrischen Analyse

#### Protein Match Details

**Accession:** *HNRPK\_MOUSE*  
**Description:** *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS Mus musculus*  
**Coverage:** 8.6393  
**Matches:** 3  
**Score:** 250.6225  
**MSScore:** N/A  
**MSE Value:** N/A



#### HNRPK\_MOUSE Coverage Map

1	METEQPEETF	PNTETNGEPG	KRPAEDMEEE	QAFKRSRNTD	EMVELRILLQ
51	SKNAGAVIGK	GGKNIKALR <b>T</b>	<b>DYNASVSPD</b>	<b>SSGPER</b> ILSI	SADIETIGEI
101	LKKIIP <del>T</del> LEE	GLQLPSPTAT	SQLPLESDAV	ECLNYQH <del>Y</del> KG	SDFDCELRL
151	IHQSLAGGII	GVKGAKIKEL	RENTQTTIKL	FQECCPHSTD	RVVLIGGKPD
201	RVVECIR <b>I</b> L	<b>DLI SESPI K</b> S	RAQPYDPNFY	DETYDYG <del>G</del> FT	MMFDDRRGR
251	VGFPMRGRGG	FDRMP <del>P</del> GRGG	RPMP <del>P</del> SRRDY	DDMS <del>P</del> RRGPP	PPPPGRGGRG
301	GSRARNLPLP	PPPP <del>P</del> RGDL	MAYDRRGRPG	DRYDGMVGF <del>S</del>	ADETWD <del>S</del> AID
351	TWSPSEWQMA	YEPQGGSGYD	YSYAGGRGSY	GDLGGPIIT <del>T</del>	QVTIPKDLAG
401	SIIGKGGQRI	KQIRHESGAS	<b>IKI DEPLEGS</b>	<b>EDR</b> IITITGT	QDQIQNAQYL
451	LQNSVKQYSG	KFF			

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 7.1 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung/Übersetzung
$\alpha$	anti (griechisch: gegen)
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu$	Mikro-
2',5'-OAS	2',5'-Oligoadenylsynthetase
A	Ampère
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CEF	Hühnerembryofibroblasten (engl.: <i>chicken embryo fibroblasts</i> )
CEV	Zell-assoziiertes behülltes Virion (engl.: <i>cell-associated enveloped virion</i> )
CVA	Chorioallantois Vacciniavirus Ankara
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEV	extrazelluläres behülltes Virion (engl.: <i>extracellular enveloped virion</i> )
eIF2 $\alpha$	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 2 $\alpha$ (engl.: <i>eukaryotic translation initiation factor-2<math>\alpha</math></i> )
FCS	fötales Kälberserumalbumin (engl.: <i>fetal calf serum</i> )
for	vorwärts (engl.: <i>forward</i> )
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h p.i.	Stunden nach Infektion (engl.: <i>hours post infection</i> )
IEF	isoelektrische Fokussierung
IEV	intrazelluläres behülltes Virion (engl.: <i>Intracellular enveloped virion</i> )
I $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor von $\kappa$ B $\alpha$ (engl.: <i>inhibitor of <math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></i> )
IMV	intrazelluläres reifes Virion (engl.: <i>intracellular mature virion</i> )
IV	unreifes Virion (engl.: <i>immature virion</i> )
KBp	Kilobasenpaare
KDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
M	molar, Mol/Liter
MEF	murine embryonische Fibroblasten
min	Minute
m	Milli-
moi	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
MVA	modifiziertes Vacciniavirus Ankara
NEA	nicht-essentielle Aminosäuren (engl.: <i>non-essential amino acids</i> )
NF $\kappa$ B	<i>Nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
ORF	offener Leserahmen (engl.: <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

---

PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pfu	Plaque-bildende Einheiten (engl.: <i>plaque forming units</i> )
p.i.	nach Infektion (lateinisch: <i>post infectionem</i> )
PKR	Proteinkinase R
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rev	rückwärts (engl.: <i>reverse</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
V	Volt
VACV	Vacciniavirus
WR	<i>Western Reserve</i>

---

### 7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Aufbau der Pockenviren.....	4
Abb. 2.2 Pockenviraler Replikationszyklus.....	6
Abb. 2.3 Entstehung von MVA.....	8
Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Einflusses von E3 und K3 auf den anti-viralen PKR-eIF2 $\alpha$ - und den 2'5'-OAS-RNaseL-Signalweg.....	11
Abb. 2.5 Einfluss des K1-Proteins auf den NF $\kappa$ B-Signalweg.....	13
Abb. 3.1: Aufbau eines <i>semi-dry</i> Western Blot von der Kathode zur Anode.....	44
Abb. 3.2 Aufbau eines <i>wet</i> Western Blot von der Kathode zur Anode.....	45
Abb. 4.1 Schematische Darstellung des Genoms der rekombinanten MVA.....	60
Abb. 4.2 Western Blot-Analyse der Expression der viralen Proteine C7, K1 und E3. ....	61
Abb. 4.3 Western Blot-Analyse der späten B5 Expression.....	63
Abb. 4.4 C7 und K1 inhibieren die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung.....	65
Abb. 4.5 Schematische Darstellung der Kinasen, die eIF2 $\alpha$ phosphorylieren können, und der Stresstimuli, die zu ihrer Aktivierung führen.....	66
Abb. 4.6 eIF2 $\alpha$ wird nach MVA $\Delta$ C7L-Infektion durch die PKR phosphoryliert.....	68
Abb. 4.7 Die E3L-Expression ist während der MVA $\Delta$ C7L-Infektion reduziert.....	69
Abb. 4.8 Die reduzierte E3L-Expression während der MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist nicht verantwortlich für die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung.....	70
Abb. 4.9 Die späte Genexpression von MVA $\Delta$ C7L wird in PKR <sup>-/-</sup> -MEF oder PKR <sup>-/-</sup> - RNaseL <sup>-/-</sup> -MEF nicht wiederhergestellt.....	72
Abb. 4.10 MVA $\Delta$ C7L induziert einen stärkeren I $\kappa$ B $\alpha$ -Abbau als MVA.....	75
Abb. 4.11 Analyse der Translokation von NF $\kappa$ B p65 in den Nukleus.....	76
Abb. 4.12 Die stärkere NF $\kappa$ B-Aktivierung durch MVA $\Delta$ C7L-Infektion ist unabhängig von dem Fehlen der späten Genexpression.....	78
Abb. 4.13 In PKR <sup>-/-</sup> -MEF wird die MVA $\Delta$ C7L-induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung nur zum Teil aufgehoben.....	80
Abb. 4.14 Schematische Darstellung der Klonierung des Insertionsplasmids für K1L- HA.....	83

---

Abb. 4.15 Schematische Darstellung der Klonierung des Insertionsplasmids für C7L-V5 .....	84
Abb. 4.16 Schematische Darstellung der Generierung von MVA-K1L-HA und MVA-C7L-V5. ....	86
Abb. 4.17 Charakterisierung von MVA-K1L-HA.....	87
Abb. 4.18 Charakterisierung von MVA-C7L-V5.....	89
Abb. 4.19 Lokalisationsstudien zu K1 und C7. ....	91
Abb. 4.20 Klonierungen der Expressionsplasmide pRab3il1mycHIS und pAtaxin10mycHIS.....	92
Abb. 4.21 Klonierung des Expressionsplasmids pRPC8-Flag. ....	93
Abb. 4.22 Co-Immunpräzipitierungen (Co-IP) von K1-HA mit den potentiellen zellulären Interaktionspartnern. ....	95
Abb. 4.23 Co-Immunpräzipitierungen (Co-IP) von C7-V5 mit den potentiellen zellulären Interaktionspartnern. ....	96
Abb. 4.24 Vergleichende Analyse der Co-Immunpräzipitierung von K1-HA und ACAP2-Flag mittels Proteinfärbung und Western Blot-Analyse.....	97
Abb. 4.25 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit K1-HA co-immunpräzipitierten Proteinen. ....	98
Abb. 4.26 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit C7-V5 co-immunpräzipitierten Proteinen. ....	99
Abb. 4.27 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit K1-HA co-immunpräzipitierten Proteinen bei gleichzeitiger Inhibition des proteasomalen Abbaus zur Stabilisierung möglicher Interaktionspartner.....	100
Abb. 4.28 2D-gelelektrophoretische Analyse von mit C7-V5 co-immunpräzipitierten Proteinen bei gleichzeitiger Inhibition des proteasomalen Abbaus zur Stabilisierung möglicher Interaktionspartner.....	101
Abb. 4.29 Generierung von MVA $\Delta$ F11L, MVA-F11L und MVA-F11L-K1L. ....	104
Abb. 4.30 Charakterisierung von MVA $\Delta$ F11L, MVA-F11L und MVA-F11L-K1L.....	105
Abb. 4.31 Analyse der F11-Funktion mittels Wundheilungs- <i>assays</i> und Immunfluoreszenzfärbungen des Aktinzytoskeletts.....	108
Abb. 4.32 Untersuchung des Einflusses von F11L und K1L auf die Virusausbreitung <i>in vitro</i> .....	110

Abb. 4.33 Untersuchung des Einflusses von F11L und K1L auf die Virusvermehrung mittels Mehrstufen-Wachstumsanalysen.....	111
Abb. 4.34 Elektronenmikroskopische Analyse des Einflusses von F11L auf die Virionenmorphogenese.....	112
Abb. 5.1 Modell der Funktion von K1 und C7 in humanen oder murinen Zellen.....	120

## 7.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der bekannten VACV <i>host-range</i> -Gene .....	10
Tabelle 3.1 Chemikalien, Reagenzien und deren Hersteller.....	16
Tabelle 3.2 Gebrauchslösungen und deren Zusammensetzung.....	17
Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller .....	20
Tabelle 3.4 Geräte und deren Hersteller.....	21
Tabelle 3.5 Zellkulturmedien und –reagenzien und deren Hersteller .....	23
Tabelle 3.6 Zusammensetzung der Zellkulturmedien.....	23
Tabelle 3.7 Eukaryotische Zelllinien .....	24
Tabelle 3.8 Kommerziell erhältliche Systeme und deren Hersteller.....	25
Tabelle 3.9 Plasmide und deren Beschreibung .....	26
Tabelle 3.10 Viren und deren Beschreibung .....	28
Tabelle 3.11 Oligonukleotide und deren Beschreibung.....	29
Tabelle 3.12 Primär-Antikörper und deren Beschreibung .....	30
Tabelle 3.13 Sekundär-Antikörper und deren Beschreibung.....	31
Tabelle 3.14 Schritte der isoelektrischen Fokussierung.....	51
Tabelle 4.1 Präsenz von K1L und C7L in den rekombinanten MVA.....	60
Tabelle 4.2 Übersicht über die untersuchten Zelllinien hinsichtlich der viralen späten Expression des viralen Faktors B5. ....	62
Tabelle 4.3 Übersicht der wahrscheinlichsten Hefe-2-Hybrid Interaktionspartner von K1 und C7.....	81
Tabelle 7.1 Abkürzungen .....	143

## 8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Anna Starzinski-Powitz bedanken für die Bereitschaft, diese Dissertation extern zu betreuen und zu begutachten.

Weiterhin möchte ich besonders Herrn Prof. Dr. Gerd Sutter danken für die Überlassung des interessanten Themas sowie der intensiven Arbeitsanleitung und Diskussionsbereitschaft, welche auch nach seinem Weggang vom Paul-Ehrlich-Institut nicht abbrach.

Frau Dr. Astrid Schwantes und Frau Dr. Katja Sliva danke ich für die Betreuung meiner Arbeit. Insbesondere gilt dieser Dank auch für die wertvolle Unterstützung bei dem Anfertigen der Manuskripte sowie meiner Dissertation.

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Barbara Schnierle für ihre fortwährende Unterstützung, Diskussionsbereitschaft und ihrem fachlichen Rat.

Herrn Dr. Andreas Reuter danke ich für seine Kooperationsbereitschaft und Hilfestellung bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Klaus Boller für die große Hilfe bei der Anfertigung der elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen.

Meinen Kollegen des Paul-Ehrlich-Institutes, namentlich Dr. Melanie Albrecht, Dr. Yasmin Süzer, Dr. Melanie Kremer, Dr. Markus Lantermann, Dr. Thomas Preuß, Dr. Karin Sperling, Dr. Ulrike Mettler, Dr. Matthias Hamdorf, Dr. Michael Lehmann, Meike Gratz, Stefan Zimmerling, Alexandra Pinczolics, Timo Schippers, Robert Merget, Christine Wrede, Yolanda Martinez-Fernandez, Sandra Krause, Christine von Rhein, Daniela Müller, Madeln Dildey, Angela Zeiler, Regina Eberle, Anna-Maria Engin, Kristin Petschik, Sabrina Botur, Brigitte Gatzki, Olga Pedi, Dagmar Fecht-Schwarz und Jasminka Geise danke ich für die fachliche und moralische Unterstützung.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Eltern, Verwandten, Freunden und Bekannten für deren Liebe und Unterstützung.



## 9 Publikationen

### Publikationen in Fachzeitschriften

---

**Backes S\*, Sperling KM\*, Zwilling J\*, Gasteiger G, Ludwig H, Kremmer E, Schwantes A, Staib C and Sutter G.** Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha. **J Gen Virol.** 2010 Feb;91(Pt 2): 470-82.

\* Geteilte Erstautorenschaft

**Zwilling J, Sliva K, Schwantes A, Schnierle B and Sutter G.** Functional F11L and K1L genes in modified vaccinia virus Ankara restore virus induced cell motility but not growth in human and murine cells. **Virology.** 2010 Sep 1;404(2): 231-9.

**Zwilling J, Lehmann MH, Schwantes A and Sutter G.** Vaccinia virus host-range factor C7 prevents NF- $\kappa$ B activation in human and murine cells. Manuskript in Vorbereitung.

**Zwilling J\*, Schwantes A\*, Sammons SA\*, Suezter Y, Sliva K, Pinczolits A, Boller K, Schnierle B, Damon IK, Esposito JJ and Sutter G.** Genomic sequencing and phenotypical characterization of precursor isolates of the modified vaccinia virus Ankara predict gene profiles responsible for its replication deficiency and attenuation. Manuskript in Vorbereitung.

\* Geteilte Erstautorenschaft

### Vorträge

---

GfV-Arbeitskreis "Immunobiology of viral infections":

6<sup>th</sup> Workshop "Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger" 10/2007: The attenuation of the modified Vaccinia virus Ankara (MVA) - characterization of the genetic basis.

GfV-Arbeitskreis "Immunobiology of viral infections":

8<sup>th</sup> Workshop "Pathogenitätsmechanismen und Immunkontrolle viraler Erreger" 10/2009: Viral host range factors C7 or K1 are essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells irrespective of their capacity to inhibit PKR-mediated eIF2- $\alpha$  phosphorylation.

4<sup>th</sup> Retreat on biomedical research des Paul-Ehrlich-Instituts 10/2009: The proteins K1 and C7 of the modified vaccinia virus Ankara prevent PKR-mediated eIF2 $\alpha$  phosphorylation and support the molecular viral replication cycle in murine cells.

18<sup>th</sup> International poxvirus, asfivirus and iridovirus symposium 06/2010: Viral host range factors C7 or K1 are essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells irrespective of their capacity to inhibit PKR-mediated eIF2- $\alpha$  phosphorylation

### **Posterpräsentationen**

---

2<sup>nd</sup> Retreat on biomedical research des Paul-Ehrlich-Instituts 09/2007: Role of the vaccinia virus encoded RhoA-inhibitor F11 for vaccinia virus replication.

3<sup>rd</sup> Retreat on biomedical research des Paul-Ehrlich Instituts 08/2008: Role of recovered F11L with or without K1L for modified vaccinia virus Ankara (MVA).

19<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Virology 03/2009: Restoration of the vaccinia virus RhoA-signaling inhibitor F11 in modified vaccinia virus Ankara re-establishes virus induced cell motility but has no impact on the virus host-range.

19<sup>th</sup> Annual meeting of the Society for Virology 03/2009: Genomic mapping of the vaccinia virus MVA host range restriction.

4<sup>th</sup> European Congress of Virology 04/2010: Viral host-range factor C7 or K1 is essential for modified vaccinia virus Ankara late gene expression in human and murine cells, irrespective of their capacity to inhibit protein kinase R-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$ .

18<sup>th</sup> International poxvirus, asfivirus and iridovirus symposium 06/2010: Repair of the F11L gene in modified vaccinia virus Ankara restores virus induced cell motility but not growth in mammalian cells