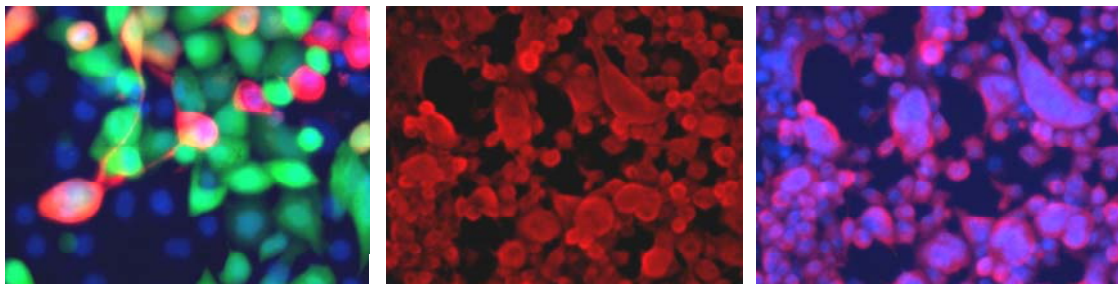




Diplomarbeit

Zur Erlangung des akademischen Grades Diplom-Ingenieurin

Etablierung eines siRNA-basierten Systems zur Untersuchung pockenviraler *host-range*-Effekte



vorgelegt von

Sarah-Verena Korup (Matr.-Nr. 230 747)

September 2010

Unter Betreuung von Livia Schünadel

Gutachter: Prof. Roland Lauster

Dr. Andreas Nitsche

Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden weltweit vermehrt humane Infektionen mit Orthopockenviren (OPV) beobachtet. Hierbei handelte es sich in allen Fällen um Zoonosen, bei denen tierpathogene OPV beim Menschen Erkrankungen hervorriefen. Die molekularen Mechanismen, die für einen solchen Spezieswechsel der OPV verantwortlich sind, sind bisher weitgehend unverstanden.

Für die orthopockenviralen Gene C7L, K1L und CP77 wurde ein Einfluss auf den sogenannten *host-range* der OPV beschrieben. Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung der Methode der RNA-Interferenz ein *in vitro* Modell zur Untersuchung von *host-range*-Effekten durch einen *knockdown* dieser Gene zu generieren. Die Zelllinien HEK293T, RK13 und CHO-K1 wurden hierfür mit *short hairpin* RNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert, wobei die *short hairpin* RNAs intrazellulär zu aktiven *small interfering* RNAs (siRNAs) prozessiert werden. Nach Infektion der transfizierten Zellen mit Kamelpockenvirus (CMLV) CP-19, Vacciniavirus (VACV) *Western Reserve* und Kuhpockenvirus (CPXV) *Brighton Red* erfolgte die Untersuchung des *knockdowns* der *host-range*-Gene auf RNA-Ebene mittels Reverser Transkriptase *Real-Time*-PCR. Der indirekte Immunfluoreszenzassay (IFA), Plaque-Titrationstest und Impedanzmessung wurden eingesetzt, um eine siRNA-vermittelte Inhibition der Virusreplikation nachzuweisen.

In HEK293T-Zellen konnte durch Einsatz von siRNAs eine relative C7L-Genexpression von $20\% \pm 10\%$ erzielt werden. In RK13-Zellen wurde die K1L-Genexpression auf 20% reduziert. Die siRNA-vermittelte Inhibition der Replikation von CMLV CP-19 und VACV WR konnte mittels IFA, im Plaque-Titrationstest und in der Impedanzanalyse nachgewiesen werden. Die Genexpression von CP77 in CHO-K1-Zellen wurde durch Einsatz von siRNAs auf $13\% \pm 2\%$ reduziert. Die Effekte der siRNA auf die Replikation des CPXV BR konnten nicht vollständig geklärt werden.

Die etablierten siRNA-basierten Systeme wurden weiterhin auf ihre Validität in Kamel- und Nagetierzellen untersucht. Die Transfektionsbedingungen wurden optimiert und eine permissive Infektion der drei Virusstämme in beiden Zelllinien nachgewiesen.

Die etablierten siRNA-basierten Systeme bieten eine effiziente Alternative zur Erzeugung von Deletionsmutanten und können in weiterführenden Transkriptom- und Proteomanalysen einen Beitrag zur Aufklärung von molekularen Mechanismen des Wirtstropismus der Pockenviren liefern.

Abstract

During the last years, there has been an increasing number of zoonotic infections in humans caused by Orthopoxviruses (OPV). Until today, the molecular mechanisms that enable OPV to overcome species barriers are still not completely understood.

The orthopoxviral genes C7L, K1L and CP77 are known to play an important role in the mediation of OPV host range. The aim of this project was to generate an *in vitro* model for the investigation of host range effects by introducing a knockdown of these host range genes using RNA interference. The eukaryotic cell lines HEK293T, RK13 and CHO-K1 were transfected with short hairpin RNA-expressing vectors, being processed to active siRNAs via intracellular mechanisms. The cells were infected with Camelpoxvirus (CMLV) CP-19, Vacciniavirus (VACV) Western Reserve and Cowpoxvirus (CPXV) Brighton Red. Reverse transcriptase real-time PCR was used to investigate the knockdown at RNA level. Indirect immunofluorescence assay (IFA), plaque assay and impedance measurement were applied for detection of siRNA-mediated inhibition of poxviral replication.

In HEK293T cells, a relative gene expression of C7L of $20\% \pm 10\%$ was achieved. The relative gene expression of K1L in RK13 cells was reduced to 20%. siRNA-mediated inhibition of CMLV CP-19 and VACV WR replication was shown via IFA, plaque titration assay and impedance measurement. The relative gene expression of CP77 in CHO-K1 cells was reduced to $13\% \pm 2\%$. The effect of the used siRNA on CPXV BR replication could not be entirely elucidated.

The established siRNA-based systems were additionally analysed on a camel and a rodent cell line. Transfection conditions were optimised and viral replication of the three poxvirus strains CMLV CP-19, VACV WR and CPXV BR was shown to be permissive in both cell lines.

The established siRNA-based systems are an efficient alternative to the generation of deletion mutants and can be analysed in subsequent transcriptome and proteome analysis. This is useful for further investigation of the molecular mechanisms determining poxvirus host tropism.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Sarah Korup

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	Pockenviren.....	4
1.1.1	Taxonomie.....	5
1.1.2	Aufbau von Orthopockenviren.....	6
1.1.3	Pockenvirale Replikation	8
1.2	Wirtstropismus von OPV	10
1.2.1	C7L.....	12
1.2.2	K1L.....	12
1.2.3	CP77	14
1.3	RNA-Interferenz.....	15
1.4	Zielsetzung der Arbeit	18
2	MATERIAL	20
2.1	Chemikalien und Reagenzien.....	20
2.2	Verbrauchsmaterialien	21
2.3	Molekularbiologische Kits.....	21
2.4	Geräte	21
2.5	Eukaryotische Zelllinien	22
2.6	Viren	22
2.7	Bakterien.....	22
2.8	Nährmedien.....	23
2.9	Puffer und Lösungen.....	23
2.10	Enzyme	24
2.11	Nukleinsäuren.....	24
2.12	Antikörper.....	25
2.13	Software.....	25
3	METHODEN	26
3.1	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.1.1	Klonierung.....	26
3.1.2	Transformation der Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	27
3.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
3.1.4	Restriktionsanalyse mit PstI	28

3.1.5	Agarose-Gelelektrophorese	29
3.1.6	Sequenzierung	30
3.1.7	RNA-Extraktion und DNase-Verdau	30
3.1.8	cDNA-Synthese	31
3.1.9	<i>Real-Time-PCR</i>	31
3.2	Zytologische Methoden	34
3.2.1	Kultivierung von adhärennten Zellen	34
3.2.2	Passagieren von Zellen	34
3.2.3	Einfrieren von Zellen	35
3.2.4	Auftauen von Zellen	35
3.2.5	Bestimmung der Zellzahl	35
3.2.6	Transfektion	36
3.2.7	Infektion	37
3.2.8	Indirekter Immunfluoreszenzassay	38
3.2.9	Plaque-Titrationstest	39
3.2.10	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung	40
3.2.11	Impedanzmessung	42
4	ERGEBNISSE	45
4.1	siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von C7L in HEK293T-Zellen	46
4.1.1	Transfektion von HEK293T-Zellen	46
4.1.2	<i>knockdown</i> von C7L auf RNA-Ebene	46
4.1.3	Inhibition der Replikation des Kamelpockenvirus CP-19	47
4.1.4	Impedanzmessung	50
4.1.5	Zusammenfassung	51
4.2	siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von K1L in RK13-Zellen	51
4.2.1	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung transfizierter RK13-Zellen	51
4.2.2	<i>knockdown</i> von K1L auf RNA-Ebene	55
4.2.3	Inhibition der Replikation des Vacciniavirus <i>Western Reserve</i>	56
4.2.4	Impedanzmessung	59
4.2.5	Zusammenfassung	60
4.3	siRNA-vermittelter <i>knockdown</i> von CP77 in CHO-K1-Zellen	61
4.3.1	Transfektion von CHO-K1-Zellen	61
4.3.2	<i>knockdown</i> von CP77 auf RNA-Ebene	61
4.3.3	Inhibition der Replikation des Kuhpockenvirus <i>Brighton Red</i>	62
4.3.4	Zusammenfassung	64
4.4	<i>host-range</i>-Effekte in Dubca-Zellen	65
4.4.1	Permissivität von Dubca-Zellen	65
4.4.2	Effizienz der siRNAs in Dubca-Zellen	66
4.4.3	Zusammenfassung	68
4.5	<i>host-range</i>-Effekte in NIH/3T3-Zellen	68
4.5.1	Permissivität von NIH/3T3-Zellen	68
4.5.2	Effizienz der siRNAs in NIH/3T3-Zellen	69
4.5.3	Inhibition der Virusreplikation in NIH/3T3-Zellen	70
4.5.4	Zusammenfassung	70

5	DISKUSSION	72
5.1	siRNA-basierte Systeme zur Analyse von <i>host-range</i>-Faktoren	72
5.2	Übertragung der siRNA-basierten Systeme auf Dubca- und NIH/3T3-Zellen	74
5.3	Impedanzmessung von transfizierten und infizierten Zellen.....	75
5.4	Ausblick.....	77
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	80
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	82
	LITERATURVERZEICHNIS	83
	DANKSAGUNG	89

1 Einleitung

1.1 Pockenviren

Die Familie der Pockenviren (*Poxviridae*) umfasst eine Vielzahl an tier- und humanpathogenen Vertretern. Besondere Bedeutung wird dem Variolavirus (VARV), dem Erreger der Menschenpocken beigemessen. Die Pockenepidemien des 17. und 18. Jahrhunderts waren von unvergleichbarer Morbidität und Mortalität (Barquet & Domingo 1997, Diven *et al.* 2001). So waren die Pockenviren im 18. Jahrhundert in Europa der Auslöser von Epidemien mit bis zu 400.000 Toten pro Jahr.

Eine Infektion mit VARV war charakterisiert durch ein abruptes Einsetzen von Fieber nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von 10 bis 14 Tagen. Dieses wurde meist von Kopf-, Muskel- und Rückenschmerzen begleitet. Es folgte nach wenigen Tagen das Auftreten der charakteristischen Papeln mit rötlichem Randsaum im Gesicht und an den Extremitäten der Betroffenen, die sich dann zu eitergefüllten Blasen und schließlich zu verkrusteten Pusteln entwickelten. Übertragen wurde das VARV von Mensch zu Mensch über eine Tröpfcheninfektion oder im späteren Verlauf der Erkrankung auch über Haut-zu-Haut-Kontakte (Moore *et al.* 2006).

Eingedämmt werden konnten die Menschenpocken erst spät. 1796 machte Edward Jenner die ersten Impfversuche und setzte ein von der Kuh stammendes Pockenvirus als Impfstoff gegen die humane Pockenerkrankung ein. Nach einer weltweiten Impfkampagne wurden Variolaviren 1980 von der WHO als ausgerottet erklärt (Diven *et al.* 2001). Die letzte humane Pockeninfektion mit VARV in Deutschland wurde 1972 in Hannover registriert. Der letzte natürliche Pockenfall weltweit trat 1977 in Somalia auf (Deria *et al.* 1980). 1979 wurde die Pockenimpfung wegen der auftretenden Nebenwirkungen eingestellt.

Trotz der einzigartigen erfolgreichen Ausrottung einer Infektionskrankheit in der Geschichte der Menschheit rücken die Pockenviren wieder in das Interesse der Wissenschaft, der Gesellschaft und der Medien.

Die Verwendung von Pathogenen für die biologische Kriegsführung stellte eine ständige Bedrohung dar. Das VARV existiert offiziell nur noch in zwei Laboratorien in den *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) in Atlanta, Georgia, USA und

in dem Russischen Forschungszentrum für Virologie und Biotechnologie in Kolzowo, Nowosibirsk, Russland (Diven *et al.* 2001, Breman & Henderson 2002). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass das VARV als potentielle Waffe für terroristische Gruppen zugänglich ist.

Zur Familie der Pockenviren gehören neben dem VARV weitere pathogene Vertreter mit erheblichem zoonotischen Potential. Hierzu gehören zum Beispiel das Affenpockenvirus (MPXV) und das Kuhpockenvirus (CPXV). Infektionen mit diesen Pockenviren zeigen zu VARV-Erkrankungen vergleichsweise schwache Symptome.

Diese häufiger auftretenden zoonotischen Fälle zeigen, dass der Mensch weiterhin anfällig für Pockenerkrankungen ist. Dies gilt insbesondere aufgrund der zunehmend immunologisch naiven Bevölkerung.

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der *Poxviridae* gliedert sich in die zwei Subfamilien *Chordopoxvirinae* und *Entomopoxvirinae*. Die *Chordopoxvirinae* lösen Infektionen bei Wirbeltieren aus, *Entomopoxvirinae* hingegen infizieren nur Insekten. Die Subfamilie der *Chordopoxvirinae* umfasst die acht Genera Ortho-, Para-, Mollusci-, Yata-, Avi-, Capri-, Lepori- und Suipockenvirus. Humanpathogene Vertreter der *Chordopoxvirinae* werden jedoch nur den Spezies der Ortho-, Para-, Mollusci- und Yatapockenviren zugeordnet. Das Orthopockenvirus VARV ist neben dem Molluscum Contagiosum Virus (MOCV) des Genus Molluscipoxvirus der einzige obligat humanpathogene Vertreter (Moss *et al.* 2006).

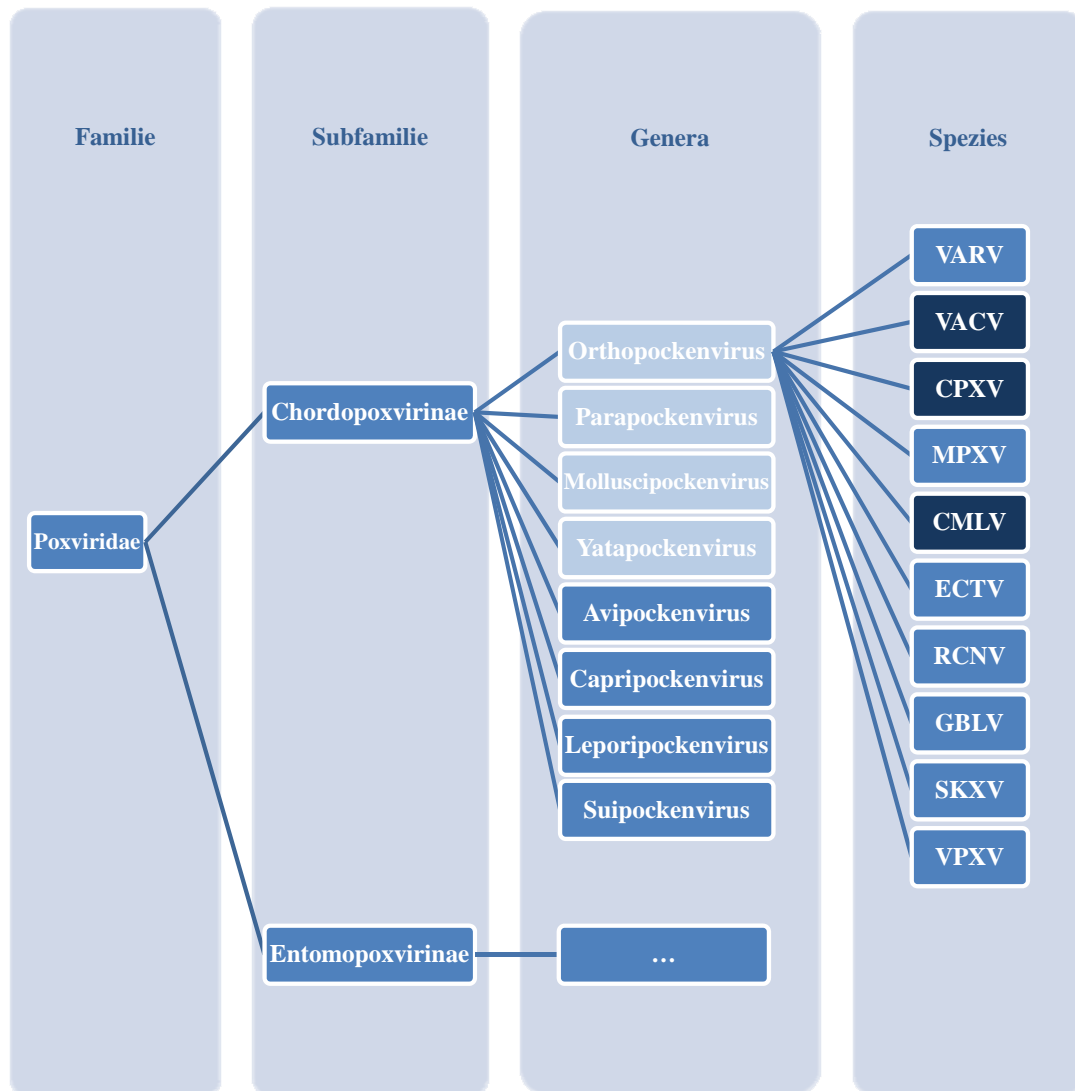


Abbildung 1-1: Klassifizierung der Pockenviren

Die humanpathogenen Genera der *Chordopoxvirinae* sind hellblau gekennzeichnet, die in dieser Diplomarbeit untersuchten Spezies dunkel unterlegt. Die Genera der *Entomopoxvirinae* sind nicht weiter ausgeführt. Modifiziert nach Essbauer *et al.* 2004.

1.1.2 Aufbau von Orthopockenviren

Aufgrund ihrer Maße von ca. 360 nm x 270 nm x 250 nm sind die Orthopockenviren (OPV) die größten bekannten Viren und sogar lichtmikroskopisch sichtbar (Fenner *et al.* 1989).

Im Elektronenmikroskop erscheinen sie als charakteristische backsteinförmige Partikel („brick shape“) mit strukturierter Oberfläche (Abbildung 1-2 A). Diese Struktur wird durch unregelmäßig hervorstehende Bereiche von 3 - 5 nm der äußeren Hülle erzeugt

(Moss 2007), die auch als kanalähnlich und filamentös beschrieben werden (Tschannen & Schafer 1980). Im Inneren der Viruspartikel ist ein hantelförmiges Viruscore lokalisiert. Es ist von zwei Lateralkörpern umgeben (Abbildung 1-2 B), deren Funktion bisher ungeklärt ist (Modrow *et al.* 2010). Das Viruscore enthält neben einigen Enzymen und Transkriptionsfaktoren die lineare doppelsträngige DNA (Moss *et al.* 2007). In S-Form gefaltet und je nach OPV 160 bis 200 kb groß (Esposito *et al.* 1985), kodiert die DNA für ca. 150 bis 200 Proteine (Modrow *et al.* 2010).

An den Enden der doppelsträngigen DNA befinden sich die sogenannten ITR-Elemente (*Inverted Terminal Repeats*), die durch ihre tandemartige Anordnung Haarnadelstrukturen ausbilden und so die beiden Stränge der DNA miteinander verbinden. Die terminalen Regionen bilden den variablen Teil des Pockenvirengenoms und enthalten Gene für Proteine, die an der Interaktion mit der Wirtszelle beteiligt sind. Der zentrale Bereich des Genoms hingegen ist eine hoch-konservierte, etwa 100 kb umfassende Region, welche für die Replikation wichtige Proteine kodiert (Essbauer *et al.* 2004).

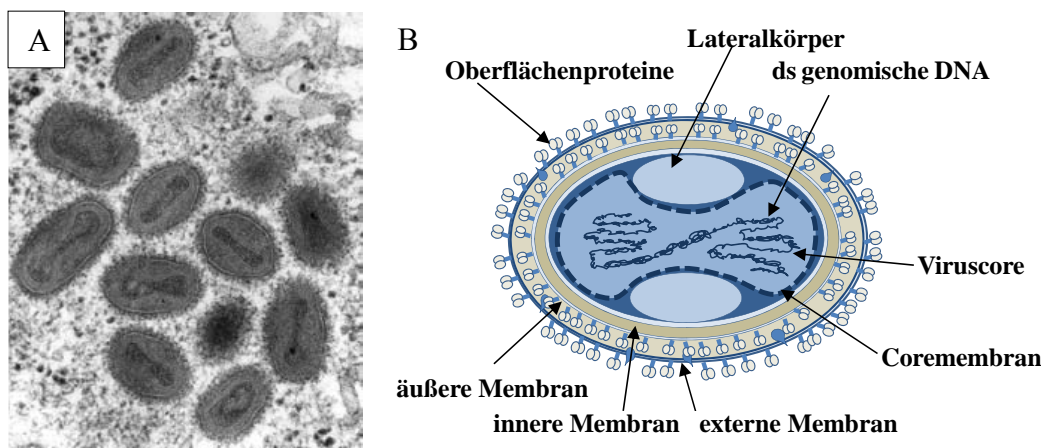


Abbildung 1-2: Struktur von OPV

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Variolaviren (H. R. Gelderblom, Robert-Koch-Institut Berlin) und (B) Schematische Darstellung eines Pockenvirus: Im Inneren des Viruspartikels befindet sich das Viruscore mit der dsDNA, einigen Enzymen für die Expression der frühen Gene und Transkriptionsfaktoren (nicht abgebildet). Das Viruscore wird von zwei Lateralkörpern flankiert. Modifiziert nach Illustration des Swiss Institute of Bioinformatics, 2008, Stand: 27. August 2010, URL: <http://www.expasy.ch>.

1.1.3 Pockenvirale Replikation

Die Replikation der Pockenviren findet im Zytoplasma der Wirtszellen in sogenannten Virusfabriken statt (Moss 2007). Die Pockenviren bringen hierfür ihre eigene Replikations- und Transkriptionsmaschinerie mit.

Zunächst bindet das Pockenviruspartikel an ubiquitär exprimierte Glycosaminoglycane auf der Oberfläche der Wirtszellmembran oder an Bestandteile der extrazellulären Matrix (Hsiao *et al.* 1998). Anschließend fusionieren die Viruspartikel- und die Wirtsmembran und das Viruscore wird in das Zytoplasma transportiert (Senkevich *et al.* 2004). Der genaue Mechanismus des Eintritts der Pockenviren in die Wirtszelle ist noch ungeklärt. Für VACV wird zum Beispiel diskutiert, dass die Viruspartikel während eines sogenannten *Blebbing* der Wirtszellmembran makropinozytisch aufgenommen werden (Mercer & Helenius 2008). VACV enthält in seiner Membran u. a. Phosphatidylserin und gelangt durch Mimikry apoptotischer Körper in die Wirtszelle.

Die vollständige Virusreplikation im Zytoplasma der Wirtszelle wird in drei Phasen unterteilt: früh, intermediär und spät. Direkt nach Eintritt in die Wirtszelle beginnt die frühe Transkription. Das Virus bringt die beteiligten Transkriptionsfaktoren selbst in die Zelle ein. Ein Großteil der frühen Gene codiert für Virulenzfaktoren und moduliert die Vorgänge in der Zelle (Rosales *et al.* 1994 a/b, Vos *et al.* 1991 a/b). Anschließend findet das sogenannte *Uncoating* des Viruscores statt und die virale DNA wird in das Zytoplasma freigesetzt (McFadden 2005). Es folgen die Replikation der DNA und die intermediäre und die späte Transkription. Diese Genprodukte werden unter anderem für die Morphogenese und Struktur neuer Virionen oder für die Synthese der frühen Transkriptionsfaktoren innerhalb des Viruscores benötigt (Broyles & Fesler 1990, Gershon & Moss 1990). Durch Assemblierung und Morphogenese entstehen neue Viruspartikel (siehe Abb. 1-3). Zunächst entstehen IMV (*Intracellular Mature Virus*) mit einer Lipiddoppelmembran, welche durch Zelllyse freigesetzt werden können oder durch Prozessierung im *trans*-Golgi-Netzwerk eine weitere Membran erhalten. Die entstehenden IEV (*Intracellular Enveloped Virus*) werden von Mikrotubuli an die Zelloberfläche transportiert, so dass die äußere Viruspartikelmembran mit der Zytoplasmamembran verschmelzen kann. Die entstehende Form wird als membran-assoziiertes extrazelluläres Partikel CEV (*Cell-associated Enveloped Virus*) bezeichnet.

Die CEV können mittels wachsender Actinfilamente zu Nachbarzellen der infizierten Zelle gelangen oder als freie EEV für die Ausbreitung des Virus innerhalb des Wirtes sorgen (McFadden 2005). Sowohl die IMV mit einer Lipiddoppemembran als auch die IEV, CEV und EEV mit zwei Lipiddoppelmembranen sind infektiöse Partikel.

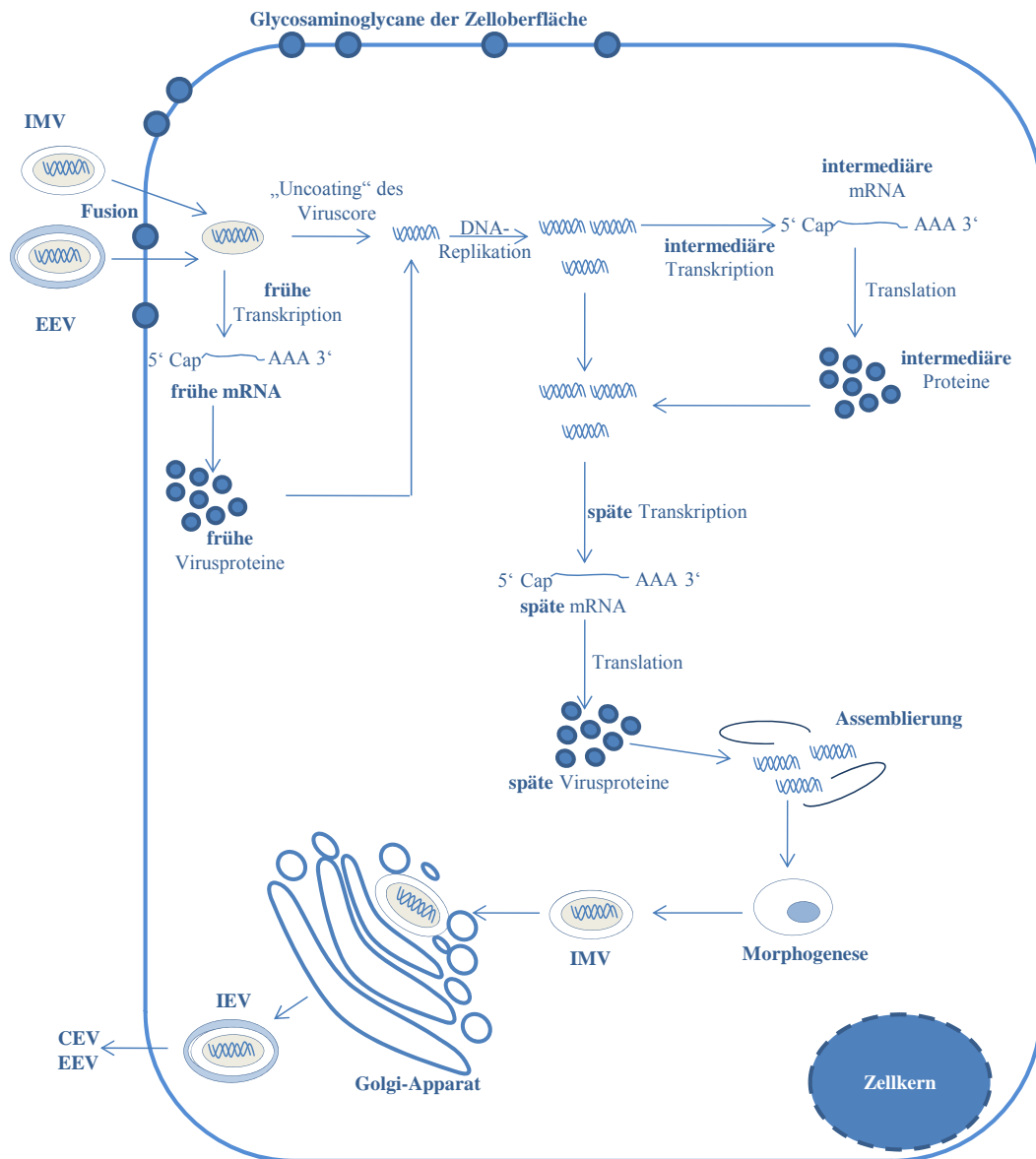


Abbildung 1-3: Der pockenvirale Replikationszyklus

IMV (*Intracellular Mature Virus*) oder EEV (*Extracellular Enveloped Virus*) fusionieren mit der Wirtsmembran. Das Viruscore gelangt in das Zytoplasma. Es finden die frühe virale Transkription, das *Uncoating* des Viruscore und die Replikation der Virus-DNA statt. Nach intermediärer und später Transkription entstehen IMV, welche zu IEV (*Intracellular Enveloped Virus*) prozessiert werden. IEV werden zu CEV (*Cell-associated Enveloped Virus*) oder als EEV freigesetzt. Modifiziert nach McFadden 2005.

1.2 Wirtstropismus von OPV

Der Begriff Wirtstropismus eines Pockenvirus wird verwendet, um dessen Fähigkeit, in Zellen unterschiedlicher Spezies zu replizieren, zu beschreiben. OPV sind in der Lage, ein breites Spektrum an Wirten zu infizieren. Jedes Genus besitzt jedoch seine eigene Wirtsspezifität. *In vivo* und *in vitro* kann sich deren Wirtsspezifität zudem deutlich unterscheiden (McFadden 2005).

Kuhpockenviren (CPXV) besitzen zum Beispiel ein breites Wirtsspektrum und sind in der Lage, u. a. Nagetiere und Katzen oder den Menschen zu infizieren.

Nagetiere gelten hierbei als Reservoir für CPXV. Katzen nehmen eine wichtige Rolle als Überträger des CPXV ein, da sie Jagd auf Nagetiere machen, welche infiziert sein können (Steinborn *et al.* 2003). Bei Kontakten mit infizierten Katzen oder Wildnagetieren kam es auch zu humanen CPXV-Infektionen (Chantrey *et al.* 1999). Zudem traten im Jahr 2008 in Deutschland 6 Fälle von Infektionen mit einem identischen Kuhpockenvirusstamm auf, die durch Kontakt mit weißen Farbratten übertragen wurden (Becker *et al.* 2009). Bei Kuhpockeninfektionen zeigten die betroffenen Patienten die charakteristischen Hautläsionen begleitet von allgemeinem Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen und Fieber. Bei immunsupprimierten Patienten können CPXV-Infektionen jedoch schwerere Symptome aufweisen und letale Folgen haben (Eis-Hubinger *et al.* 1990).

Das Kamelpockenvirus (CMLV) hingegen weist einen engen Wirtstropismus auf. CMLV-Infektionen treten endemisch in Kamelen auf und es gibt keine bestätigte humane Erkrankung (Jezek *et al.* 1983). Dennoch ist die Sequenz des CMLV der des VARV am ähnlichsten (Gubser & Smith 2002). Es gibt zwischen dem CMLV- und dem VARV-Genom nur einige wenige Sequenzunterschiede, die festlegen, dass CMLV nur Kamele und VARV nur Menschen infizieren kann. Das CMLV weist daher ein großes zoonotisches Potential auf. Beide OPV zeigen hohe Morbidität und Mortalität in ihren einzelnen Wirtsspezies. Die Immunisierung von Kamelen mit VARV schützte diese vor einer Infektion mit CMLV (Baxby *et al.* 1975).

Pockenviren dringen nicht über spezifische Rezeptoren, sondern über ubiquitär vorkommende Membranbestandteile in ihre Wirtszellen ein. Es entscheidet sich erst anschließend, ob die Infektion permissiv oder abortiv verläuft (McFadden 2005). Eine

permissive Infektion bedeutet eine vollständige, die frühe, intermediäre und späte Phase umfassende Virusreplikation.

Die den Wirtstropismus eines Pockenvirus bestimmenden Faktoren sind größtenteils ungeklärt. Man unterscheidet jedoch drei Ebenen, die einen Einfluss auf das jeweilige Wirtsspektrum haben. Der zelluläre Tropismus beschreibt, dass die Virusreplikation in kultivierten Zellen unterschiedlicher Abstammung und Spezies permissiv, semi-permissiv oder abortiv sein kann. Durch gewebe-spezifische antivirale Immunantworten kann die Replikationseffizienz organ- oder gewebeabhängig variieren. Zudem unterliegt der Tropismus eines Pockenvirus der im gesamten Wirt hervorgerufenen Immunantwort und den inflammatorischen Reaktionen. Dies führt zu unterschiedlichen Merkmalen in der Pathogenese der Pockenvirusinfektion (McFadden 2005).

Auf zellulärer Ebene ist die Fähigkeit des Pockenvirus, die Signaltransduktion der antiviralen Immunantwort der infizierten Zelle zu manipulieren, maßgeblich für eine erfolgreiche Replikation. Diese immunmodulatorischen Eigenschaften werden durch die sogenannten *host-range*-Faktoren des Pockenvirus determiniert. Die zahlreichen *host-range*-Gene nehmen ca. 50 % des Pockenvirusgenoms ein und sind in den beiden terminalen Bereichen des Genoms lokalisiert (Gubser *et al.* 2004, Lefkowitz *et al.* 2006, Upton *et al.* 2003). Sie greifen in Vorgänge der Apoptose, der Antigen-Präsentation und -Erkennung, der Funktion von Interferonen und der Immunsignalgebung der Zelle ein (Barry *et al.* 2004; Moss & Shisler 2001; Seet *et al.* 2003).

Bisher bekannte *host-range*-Faktoren der Orthopockenviren sind SPI-1 (Senkevich *et al.* 1994), CrmA/SPI-2 (Pickup *et al.* 1986, Silverman *et al.* 2001), F1L (Stewart *et al.* 2005, Wasilenko *et al.* 2005), p28 (Senkevich *et al.* 1994), vGAAP (Gubser *et al.* 2007), E3L und K3L (Langland & Jacobs 2002). Im Speziellen werden hier die *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 beschrieben, über deren Funktion und Interaktionspartner in der Wirtszelle noch wenig bekannt ist. C7L, K1L und CP77 verfügen über eine große Ähnlichkeit bezüglich ihrer Funktion, weisen jedoch keinerlei Sequenz-Homologie auf. Als strukturelle Gemeinsamkeit ist lediglich das Vorhandensein von Ankyrin (ANK)-Repeats in K1L und CP77 zu nennen. ANK-Bereiche unterstützen vermutlich das Ausbilden von Protein-Protein-Interaktionen (Turner & Moyer 1998).

1.2.1 C7L

Das *host-range*-Gen C7L wurde 1990 von Perkus *et al.* in VACV entdeckt. Der C7L-*Open Reading Frame* (ORF) kodiert für ein 18-19 kDa großes Protein. C7L wird in der frühen Phase der Virusreplikation exprimiert (Oguiura *et al.* 1993) und ist in allen Orthopockengenomen hoch konserviert (Gubser *et al.* 2004). Auch das CPXV (Gubser *et al.* 2004) und das CMLV besitzen ein C7L - Homolog (Afonso *et al.* 2002).

C7L ist funktional äquivalent zu dem *host-range*-Faktor K1L (siehe 1.2.2) und ermöglicht trotz Deletion von K1L eine Replikation des VACV in humanen, nicht jedoch in Kaninchen (*Rabbit Kidney* RK13)-Zellen (Perkus *et al.* 1990). In Hamster-(Dede)-Zellen ist C7L hingegen der essentielle *host-range*-Faktor, der eine permissive Infektion vermittelt (Oguiura *et al.* 1993).

Die genaue molekulare Funktion des C7L ist bisher noch unbekannt. Es wird vermutet, dass es eine wichtige Rolle bei der Inhibition der Apoptose als Antwort auf eine virale Infektion einnimmt (Najera *et al.* 2006).

C7L hat außerdem Einfluss auf den PKR-eIF2 α -Signalweg (Meng *et al.* 2008). PKR (Proteinkinase R) wird durch Phosphorylierung aktiviert und phosphoryliert wiederum den eukaryotischen Initiationsfaktor 2 α (eIF2 α). In dieser aktiven Form verhindert eIF2 α die Initiation der Translation und sorgt somit für eine negative Regulation der Proteinsynthese (Proud 2005). C7L verhindert die Phosphorylierung von PKR und nachfolgend auch die Aktivierung von eIF2 α , so dass die antivirale Antwort der Wirtszelle inhibiert wird (Najera *et al.* 2006, Backes *et al.* 2010).

1.2.2 K1L

Der *host-range*-Faktor K1L wurde erstmals beschrieben, als bei einer VACV-Mutante mit einer Deletion von 18 kB am linken Terminus des Genoms keine Replikation in einigen humanen Zelllinien mehr möglich war (Gillard *et al.* 1985). Weiter eingegrenzt wurde dieser *host-range*-Effekt dann auf einen Bereich von 855 Bp, welche ein einziges ORF enthält (Gillard *et al.* 1986). Der K1L-ORF liegt genau am Übergang von hochkonserviertem Zentralteil zu variablem Terminalteil des VACV-Genoms (Gillard *et al.* 1989). Das *host-range*-Gen K1L kodiert für ein 32,5 kDa großes Protein, welches über 6 Ankyrin-*Repeats* verfügt und zur Ankyrin-Superfamilie gehört.

Das K1L-Gen von VACV ist in der Familie der Pockenviren hoch konserviert mit Ausnahme von CMLV und VARV, die im K1L-ORF ein Stop-Codon besitzen und somit für ein nicht funktionales Genprodukt kodieren (Cowley & Greenaway, 1990, Gubser & Smith 2002).

Der *host-range*-Faktor C7L (siehe 1.2.1) kann ein deletiertes K1L in humanen Zellen ersetzen. Hierbei wurde für einige Zelllinien eine geringere Replikationseffizienz mit C7L als mit dem ursprünglichen *host-range*-Faktor K1L nachgewiesen (Oguiura *et al.* 1993). In RK13-Zellen ist K1L jedoch essentiell für eine permissive Replikation (Perkus *et al.* 1990, Oguiura *et al.* 1993).

Bei Deletion von K1L kann das *host-range*-Gen CP77 (siehe 1.2.3) die VACV-Replikation in RK13-Zellen ermöglichen (Ramsey-Ewing & Moss 1996).

Weitere Studien mit der Infektion von nicht-permissiven CHO-Zellen mit VACV WR zeigten, dass die Restriktion der Virusreplikation während der intermediären Phase der viralen Proteinsynthese erfolgt (Ramsey-Ewing & Moss 1995). Die Synthese früher viraler mRNA und Proteine, viraler DNA und intermediärer mRNAs fand statt. Virale intermediäre Proteine, späte mRNA oder Proteine konnten nicht nachgewiesen werden. Bei einer Infektion von RK13-Zellen mit einer VACV WR-Mutante, bei der das K1L-Gen deletiert war, war das Niveau der viralen und zellulären Proteinsynthese stark reduziert und nur virale frühe mRNAs wurden nachgewiesen (Ramsey-Ewing & Moss, 1996). Bei Abwesenheit des K1L-Gens tritt die Restriktion der Virusreplikation demnach zu einem frühen Zeitpunkt auf.

Auf molekularer Ebene ist das K1L ein Inhibitor von NF- κ B (*nuclear factor- κ B*) (Shisler & Jin 2004, Guerra *et al.* 2006). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, welcher an Immunantworten, Entzündungsvorgängen, der Apoptose und der Proliferation beteiligt ist (Karin & Ben-Neriah 2000). Es ist im Zytoplasma der Zellen lokalisiert und wird bei Bedarf in den Zellkern transportiert. Im Zytoplasma liegt das inaktive NF- κ B an inhibitorische Proteine I κ B (*Inhibitor κ B*) gebunden vor. Bei Einwirken von extrazellulären Stimuli auf die Zellen, wird I κ B phosphoryliert, ubiquitiniert und anschließend proteolytisch gespalten. Das freie aktive NF- κ B kann in den Zellkern transloziert werden. K1L verhindert den Abbau des NF- κ B-inhibitorischen Proteins I κ B α in RK13-Zellen (Shisler & Jin 2004). I κ B α verfügt ebenso wie das K1L über

ANK-*Repeats* und interagiert über diese mit NF κ B. Dies lässt vermuten, dass es sich bei K1L um ein I κ B α -Homolog handelt (Shisler & Jin 2004).

Die gleiche Arbeitsgruppe zeigte in einer aktuellen Publikation, dass K1L Einfluss auf den PKR-eIF2 α -Stoffwechselweg nimmt (Willis *et al.* 2009). Der K1L- *host-range*-Faktor wirkt hierbei über seine ANK2-Region als PKR-Inhibitor (Meng & Xiang 2006, Willis *et al.* 2009).

ACAP2 ist vermutlich ein zelluläres Zielprotein für den *host-range*-Faktor K1L (Bradley & Terajima 2005, Meng & Xiang 2006). Bei ACAP2 handelt es sich um ein GTPase-aktivierendes Protein mit ANK-*Repeats*. Die ANK-*Repeats* scheinen eine wichtige Rolle bei der *host-range*-Funktion zu spielen, genauere Details dieser Interaktion wurden jedoch bisher nicht geklärt.

1.2.3 CP77

Das Genom von CPXV kodiert für mehr *host-range*-Faktoren als jedes andere Chordopockenvirus. Von besonderem Interesse ist der *host-range*-Faktor CP77 (auch CHOhr), denn er ist essentiell für die Replikation von CPXV in CHO-Zellen und wurde 1988 von Spohner *et al.* entdeckt. CP77 wird in der frühen Phase der Virusreplikation exprimiert. Es handelt sich hierbei um ein 77 kDa großes Protein der ANK-Superfamilie.

In vielen Orthopockenviren liegt das CP77-Gen als modifizierte Variante vor. Bei VACV WR ist das CP77-Gen beispielsweise durch multiple Substitutionen und Mutationen, die eine Verschiebung des Leserahmens erzeugen, inaktiviert (Kotwal & Moss 1988).

Die Anwesenheit des CP77-Gens ermöglicht auch eine Replikation von VACV in CHO-Zellen (Ramsey-Ewing & Moss 1995, Spohner *et al.* 1988), mit den *host-range*-Faktoren K1L oder C7L erfolgt keine VACV-Replikation in CHO-Zellen.

Das CP77-Gen ermöglicht zudem bei Deletion von K1L und C7L in VACV eine Replikation des Virus in humanen Zellen, in Nierenzellen des Schweins und auch in RK13-Zellen (Chung *et al.* 1997, Perkus *et al.* 1990, Ramsey-Ewing & Moss 1996). Die Replikationseffizienz von VACV war jedoch geringer, wenn ein deletiertes K1L durch CP77 ersetzt wurde (Ramsey-Ewing & Moss 1996).

Vermutlich verhindert das CP77 die nach einer Infektion auftretende Inhibition der Proteinsynthese in der Wirtszelle (Spehner *et al.* 1988). Es inhibiert ebenso wie C7L und K1L die Phosphorylierung der PRK und des eIF2 α (Hsiao *et al.* 2004). Ausserdem inhibiert CP77 die Aktivierung von NF- κ B und dessen Translokation in den Zellkern (Chang *et al.* 2009). Über sechs N-terminale ANK bindet das CP77 an die p65-Untereinheit des NF- κ B. Zusätzlich interagiert die F-Box-ähnliche Sequenz am C-Terminus des CP77 mit dem Cullin-1 und dem Skp1 des Skp1-Cul1-FBP (SCF)-Komplex und unterbindet vermutlich die Trennung des I κ B von NF- κ B (Chang *et al.* 2009).

Als weiterer zellulärer Interaktionspartner von CP77 wurde das HMG20A-Protein identifiziert, welches bei einer Infektion an Virusfabriken bindet. HMG20A ist ein Protein der DNA-bindenden *High Mobility Group* (HMG)-Box-Familie. CP77 trennt das HMG20A-Protein von den Virusfabriken (Hsiao *et al.* 2006). Die genaue Funktion und Bedeutung der Interaktion von CP77 mit HMG20A ist noch ungeklärt. Bei Einsatz von VACV-Mutanten mit CP77 ohne HMG20A-Bindedomäne (Deletion der Aminosäuren 277 bis 668 bzw. des ANK-Repeat 5) blieb das HMG20A an die virale DNA gebunden und es fand keine VACV-Replikation statt (Hsiao *et al.* 2006).

Als weiteres zelluläres Zielprotein von CP77 wurde die Untereinheit des zellulären Exosoms Rpr42 identifiziert (Hsiao *et al.* 2010). Die Interaktion findet über die ANK-*Repeats* 2 und 3 statt und scheint eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der viralen RNA zu spielen.

Des Weiteren reduziert CP77 die Caspase-Aktivierung in infizierten Zellen und beeinflusst so die apoptotische Kaskade (Hsiao *et al.* 2004).

1.3 RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz (RNAi) wird ein gezielter *knockdown* einzelner Gene herbeigeführt. Es handelt sich um einen zellulären Prozess, bei dem kurze dsRNA zur Inhibition der Expression homologer Gene in Eukaryoten eingesetzt wird.

RNAi fand erstmals 1998 Beschreibung in einer Veröffentlichung von Andrew Fire und Craig Mello (Fire *et al.* 1998), welche 2006 hierfür den Nobelpreis erhielten.

Der Mechanismus der RNAi funktioniert sowohl, wenn dsRNA experimentell in die Zellen eingeführt wird, als auch, wenn sie natürlichen Ursprungs ist. Man geht davon aus, dass RNAi ein natürliches regulatorisches System der Zellen zum Beispiel zur Kontrolle der Expression fremder Gene und demnach ein Schutzmechanismus gegen virale Angriffe ist (Martinez *et al.* 2003; Tuschl & Borkhardt 2002). In letzter Zeit wurden vermehrt weitere Klassen kurzer regulatorischer RNAs in der Zelle gefunden, die durch RNAi an der post-transkriptionellen Regulation von Genen beteiligt sind. Hierzu gehören micro-RNA (Filipowicz *et al.* 2008), *Piwi-Interacting* RNA (Aravin *et al.* 2007) und endogene siRNA (Tam *et al.* 2008, Watanabe *et al.* 2008).

RNAi beginnt mit der Aktivierung des sogenannten *Dicer*-Enzyms durch dsRNA. *Dicer* enthält eine N-terminale RNA-Helikase-Domäne, eine Piwi, Argonaute- und Zwillie/Pinhead (PAZ)-Domäne, zwei RNase III-Domänen und eine C-terminale dsRNA-bindende Domäne (Tuschl & Borkhardt 2002). Das RNase III-Enzym *Dicer* spaltet die dsRNA in kurze RNA-Fragmente von 20-25 bp, die siRNAs (*small interfering* RNAs) genannt werden. An diesem Prozess sind vermutlich noch weitere dsRNA-bindende Faktoren beteiligt.

Die vom *Dicer* erzeugten siRNAs tragen am 5'-Ende Phosphatreste und verfügen über freie 3'-Hydroxyl-Gruppen. Die in der Mitte gelegene Region mit den Basenpaarungen wird durch Überhänge von 2-3 Nukleotiden am 3'-Ende flankiert (Elbashir *et al.* 2001). Die Endonuklease AGO2 (Argonaute 2) und weitere noch zu identifizierende Proteine werden für die Bildung des *RNA-induced silencing complex* (RISC) benötigt. Der *RISC-loading complex* (RLC) belädt den RISC (*RNA-induced silencing complex*) mit den siRNAs. Hier verbleibt nur der *antisense strand* im RISC. Der *sense strand* der siRNA wird abgebaut. Der RISC erkennt die homologe Ziel-RNA und spaltet diese. AGO2 ist hierbei die katalytische Komponente des RISC. Sie spaltet das Phosphodiester-Rückgrat der Ziel-mRNA an spezifischen Spaltstellen ausgehend vom 5'-Ende des *antisense strand* (Rand *et al.* 2005).

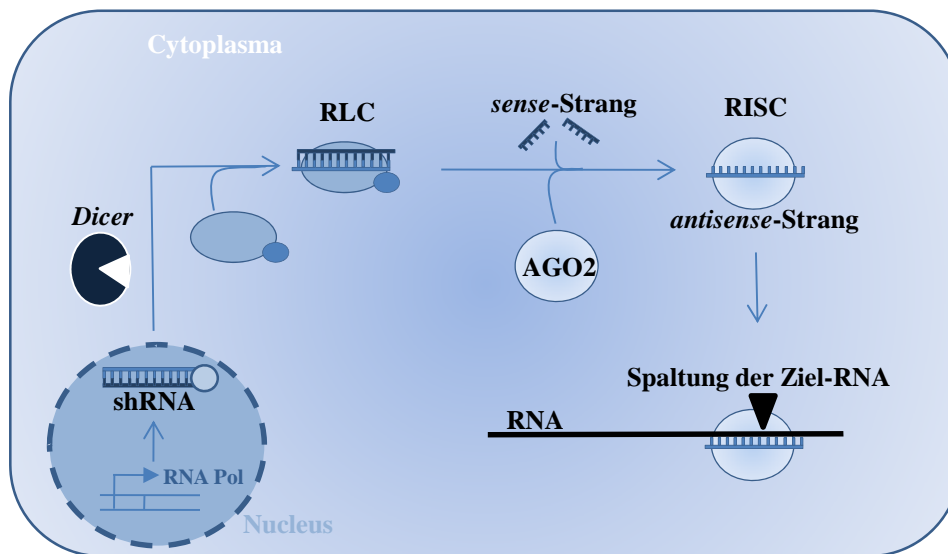


Abbildung 1-4: Vereinfachtes Schema der shRNA-vermittelten RNA-Interferenz

Die intrazellulär exprimierte shRNA wird von der Endonuklease *Dicer* zu siRNAs prozessiert. Der RLC (RISC-loading complex) belädt den RISC (RNA-induced silencing complex) mit der siRNA. Der *sense*-Strang der siRNA wird gespalten und nur der *antisense*-Strang verbleibt im RISC. Der *antisense*-Strang leitet den RISC zur komplementären Ziel-RNA. Die katalytische Komponente des RISC (Argonaute AGO2) spaltet die Ziel-RNA. Modifiziert nach Kurreck 2009.

Um einen gezielten *knockdown* eines Gens in Eukaryoten zu erreichen, bietet sich der Einsatz von *short hairpin* RNA (shRNA)-exprimierenden Plasmiden an. Im Gegensatz zu chemisch synthetisierten siRNAs wird diese in den Zellen kontinuierlich exprimiert und bleibt somit über einen langen Zeitraum in der Zellpopulation erhalten. Weiterhin ermöglicht diese Technologie eine stabile Transfektion durch Plasmid-kodierte Antibiotikaresistenzgene oder die Überwachung der Transfektion durch Plasmid-kodierte Fluoreszenzgene. Eine shRNA besteht aus einem *sense*-Strang, einem *Loop*-codierenden Bereich und einem *antisense*-Strang und wird vom *Dicer* in die funktionale siRNA prozessiert (Kurreck 2009).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es gibt bisher kaum Erkenntnisse darüber, wie Infektionen von OPV bei Vertebraten ablaufen und wie sich die enge Wirtsspezifität bei einigen Vertretern im Vergleich zum breiten Wirtsspektrum anderer OPV erklären lässt. Ebenso wenig ist bekannt, wie OPV diese Barriere gelegentlich überwinden und neue Wirtsspezies befallen können.

Um zoonotische Erkrankungen vermeiden bzw. schnell auf humane Pockenviruserkrankungen reagieren zu können, ist es nötig, die Vorgänge bei Pockenvirusinfektion und insbesondere beim Überschreiten der Speziesbarriere zu verstehen.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen einiger den Wirtstropismus der Pockenviren vermittelnden *host-range*-Faktoren sollte unter Verwendung der Methode der RNAi ein gezielter *knockdown* einzelner *host-range*-Gene herbeigeführt werden.

CMLV codiert für das *host-range*-Protein C7L. *Host-Range*-Gene des VACV hingegen kodieren für C7L und K1L. CPXV verfügt zusätzlich über CP77. Diese Variation im Repertoire der drei Viren gibt eine Möglichkeit zur Untersuchung der genannten *host-range*-Faktoren. C7L ist der essentielle *host-range*-Faktor für die Replikation von Orthopockenviren in humanen Zellen. Gleiches gilt für K1L in RK13-Zellen und CP77 in CHO-Zellen.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten folgende Systeme etabliert werden:

- ein siRNA-vermittelter *knockdown* von C7L aus CMLV in HEK293T-Zellen.
- ein siRNA-vermittelter *knockdown* von K1L aus VACV in RK13-Zellen.
- ein siRNA-vermittelter *knockdown* von CP77 aus CPXV in CHO-Zellen.

Nach Einsatz der siRNAs sollte die Expression der *host-range*-Gene mittels Reverser Transkriptase *Real-Time*-PCR bestimmt werden. Der siRNA-vermittelte Effekt auf die Replikation der eingesetzten Virusstämme sollte per Immunfluoreszenzassay und Plaque-Titrationstest untersucht werden. Bei allen Experimenten sollten die durch die siRNA erzeugten Effekte auf eine sogenannte *Scrambled* (SC)-Kontrolle bezogen werden.

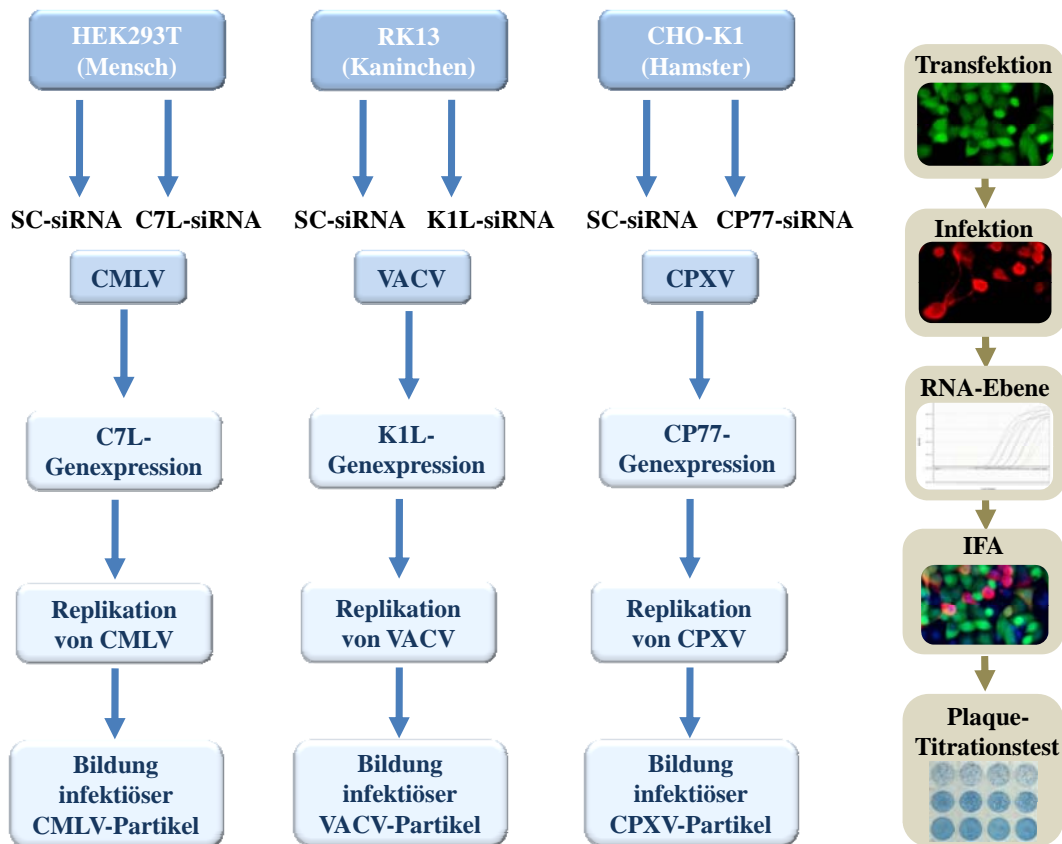


Abbildung 1-5: Überblick über den Experimentaufbau

Vereinfacht dargestellt sind die einzelnen Teilschritte zur Etablierung der drei *in vitro* Systeme zur Untersuchung der *host-range*-Effekte von C7L, K1L und CP77. Die SC-siRNA ist die in der Vergleichspopulation eingesetzte *non-sense*-siRNA.

Des Weiteren sollte eine Übertragbarkeit der siRNA-basierten Systeme auf folgende Zellen getestet werden:

- die Kamel-Zelllinie Dubca (*Dubai Camel*) als Beispiel für Wirtszellen des CMLV mit seiner engen Wirtsspezifität und Relevanz durch die nahe Verwandtschaft zum VARV
- die Maus-Zelllinie NIH/3T3 als Repräsentant für Nagetiere, das tierischen Reservoir des CPXV mit seinem breiten Wirtsspektrum.

Zusätzlich wurden die verwendeten Zelllinien in einer Impedanzmessung analysiert und die Validität der etablierten Systeme geprüft.

2 Material

2.1 Chemikalien und Reagenzien

1 kb DNA LadderGeneRuler™	Fermentas, St. Leon-Rot, D
100 bp DNA LadderGeneRuler™	Fermenta, St. Leon-Rot, D
6 x DNA loading dye	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Agarose	peQlab, Erlangen, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Buchs, D
BigDye®	ABI, Foster City, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, D
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg, D
Carboxymethylcellulose (CMC)	Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
dNTP-Mix	Pharmacia, GE Healthcare, München, D
EDTA	Serva, Heidelberg, D
Eisessig	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Sigma-Aldrich, Buchs, D
Ethanol, technisch	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt, D
Ficoll 400	Pharmacia Biotech, Uppsala, S
Formaldehyd (16 %, methanolfrei)	Polysciences, Eppelheim, D
Formaldehyd (37 %)	BDH, Poole, GB
Fötales Kälberserum (FKS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
FuGene® HD Transfection Reagent	Roche Applied Science, Mannheim, D
Glycerin (UltraPure™)	Invitrogen, Karlsruhe, D
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Buchs, D
L-Glutamin	PAA, Pasching, A
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, D
Naphthol Blue Black	Sigma-Aldrich, Buchs, D
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, D
Natriumazid	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Oligo(dT) ₁₆ -Primer	Roche Applied Science, Mannheim, D
OptiMEM®	Invitrogen/Gibco®, Paisley, GB
Penicillin	PAA, Pasching, A
Streptomycin	PAA, Pasching, A
TritonX-100	Merck, Darmstadt, D

Trypsin	PAA, Pasching, A
Wasser, RNase-frei	Sigma-Aldrich, Buchs, D
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Buchs, D

2.2 Verbrauchsmaterialien

30 μ m-Filter, CellTrics®	Partec, Münster, D
Cryo Pure Tubes 1,6 ml	Sarstedt, Nümbrecht, D
Eppendorf Gefäße	Eppendorf, Hamburg, D
FACS-Röhrchen	VWR Falcon, Darmstadt, D
Kryoröhrchen Zellkultur	nunc™, Roskilde, DK
Zellkulturflaschen mit Filter	nunc™, Roskilde, DK
Zellkulturplatten	nunc™, Roskilde, DK
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	TPP, Trasadingen, CH

2.3 Molekularbiologische Kits

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ABI, Foster City, USA
GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System	Promega, Mannheim, D
NucleoSpin® Plasmid QuickPure: Isolation of high-copy plasmid DNA from <i>E. coli</i>	Machery & Nagel, Düren, D
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
Total RNA Isolation Kit	Machery & Nagel, Düren, D
Turbo DNA-free™	Ambion, Austin, USA

2.4 Geräte

Die zur üblichen Laborausstattung gehörigen Geräte sind nicht gesondert aufgelistet.

ABI Prism 7500 <i>Real-Time</i> PCR System	ABI, Foster City, USA
FACSAria II	BD Biosciences, Heidelberg, D
Inverses Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M	Zeiss, Oberkochen, D
Gelelektrophorese-Kammer Horizon® 58	Gibco, BRL, USA
NanoDrop™ ND1000	Peqlab, Erlangen, D
xCELLigence System	Roche/ACEA Biosciences Inc., Mannheim, D
Gefrierbehälter Nalgene™ Cryo 1 °C	Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK
Freezing Container „Mr. Frosty“	

2.5 Eukaryotische Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
CHO-K1	Ovarienzellen des adulten Chinesischen Hamsters (<i>Cricetulus griseus</i>) Subklon K1	ECACC # 85051005
Dubca (<i>Dubai Camel</i>)	Haut-Fibroblasten-Zelllinie des Kamels (<i>Camelus dromedarius</i>)	Priv. Dozent Dr. Dr. habil. Ulrich Wernery, Central Veterinary Research Laboratory, Dubai, UAE
HEK293T	Humane, mit Adenovirus Typ 5 transformierte, SV 40 T-Antigen exprimierende embryonale Nierenepithelzellen	ATCC # CRL-11268™
NIH/3T3	Embryonale Fibroblasten der Maus (<i>Mus musculus</i>)	ATCC # CRL-1658™
RK13	Nierenepithelzellen eines 5 Wochen alten Kaninchens	ECACC # 0021715
Vero C1008	Nierenzellen der Grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	ECACC # 85020206

2.6 Viren

<u>Virus</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Quelle</u>
CMLV CP-19	Kampelpockenvirus CP-19	Prof. Dr. Meyer, IMB, München, D
VACV WR	Vacciniavirus Western Reserve	ATCC # VR-1354™
CPXV BR	Kuhpockenvirus Brighton Red	ATCC # VR-302™

2.7 Bakterien

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Quelle</u>
<i>E. coli</i> One Shot® Top 10	F- <i>mcr</i> A Δ(<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lac</i> X74 <i>rec</i> A1 <i>ara</i> D139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>gal</i> U <i>gal</i> K <i>rps</i> L (Str ^R) <i>end</i> A1 <i>nup</i> G	Invitrogen, Karlsruhe, D
<i>E. coli</i> JM109	<i>end</i> A1, <i>rec</i> A1, <i>gyr</i> A96, <i>thi</i> , <i>hsd</i> R17 (<i>r</i> _k ⁻ , <i>m</i> _k ⁺), <i>rel</i> A1, <i>sup</i> E44, Δ(<i>lac-proAB</i>), [F' <i>tra</i> D36, <i>proAB</i> , <i>laq</i> I ^q ΔM15]	Promega, Mannheim, D

2.8 Nährmedien

DMEM	Invitrogen/Gibco [®] , Paisley, GB
EMEM	Invitrogen/Gibco [®] , Paisley, GB
Ham's F12	Sigma-Aldrich, Buchs, D
LB-Agar	300 ml LB-Agar (Eigenherstellung RKI), 150 µl IPTG (1 M), 300 µl X-Gal (40 mg/ml), 300 µl Ampicillin (100 mg/ml)
LB-Medium	172 mM NaCl, 1 % Bakto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.9 Puffer und Lösungen

<u>Bezeichnung</u>	<u>Zusammensetzung</u>
10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml H ₂ O bidest.
Antikörper-Puffer IFA	2 % BSA 0,2 % NaN ₃ in 1 x PBS
Formaldehyd (3,7 %)	100 ml Formaldehyd (37%) 100 ml 1 x PBS 800 ml bidest. Wasser
Formaldehyd (4 %, methanolfrei)	1 ml Formaldehyd (16 %, methanolfrei) 3 ml 1 x PBS
Naphthol Blue Black-Färbelösung	1 g Naphtholblauschwarz 13,6 g Natriumacetat 60 ml Eisessig ad 1000 ml bidest. Wasser
Overlaymedium Plaque-Test	1,6 % CMC 10 % FKS 2 mM L-Gln in DMEM
TAE-Puffer (1 x)	40 mM Tris/Eisigsäure (pH 8,0) 2 mM EDTA

2.10 Enzyme

Platinum [®] Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe, D
SuperSCipt [®] II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe, D
PstI	Fermentas, St. Leon-Rot, D

2.11 Nukleinsäuren

siRNAs

C7L_1	gACACgTTCTATTACgTAATATA	Invitrogen, Karlsruhe, D
C7L_2	gTCAAaggATTAACCgTATTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
C7L_3	gTTAATCCCgTATAgAgATT	Invitrogen, Karlsruhe, D
K1L_1	ggACATAgTgCCTTgTATTAT	Invitrogen, Karlsruhe, D
K1L_2	gTCATgCTTAATgATgTAAgTAT	Invitrogen, Karlsruhe, D
K1L_3	ggCTCTgTTCAAATACgACATTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
CP77_1	gATCCTgTTCCTgAAATTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
CP77_2	gTACAgCTCTTCAATATTA	Invitrogen, Karlsruhe, D
CP77_3	gTCCTCCAACATATACTAATT	Invitrogen, Karlsruhe, D
SC	ggTCCTTATTgCggATATTAA	Invitrogen, Karlsruhe, D

Assays für TaqMan[®] Real-Time PCR

cMyc for	gCCAgAggAggAACgAgCT	Invitrogen, Karlsruhe, D
cMyc rev	gggCCTTTTCATTgTTTTCCA	Invitrogen, Karlsruhe, D
cMyc-Sonde	F-TgCCCTgCgTgACCAgATCC	ABI, Foster City, USA
C7L for	gCAAATACggTTAATCCTTTgAC	Invitrogen, Karlsruhe, D
C7L rev	ggggATAACTACggATgCAAACATA	Invitrogen, Karlsruhe, D
C7L TMGB	F-TCCgACCAATCTgg	ABI, Foster City, USA
K1L for	gTACgTTRTTgAAyDCTggAgCATT	Invitrogen, Karlsruhe, D
K1L rev	TTTRCTATTTTRgTATCTTCYAATgTggCT	Invitrogen, Karlsruhe, D
K1L TMGB	F-CCTgATgTAATggAAATT	ABI, Foster City, USA
CP77 for	CCgCACgRAATAATgTgTAGTATTgT	TIB MOLBIOL, Berlin, D
CP77 rev	AATTAgTATATgTTggAggACATYcAg	TIB MOLBIOL, Berlin, D
CP77 TMGB	F-CCACTATggAgAAATg	ABI, Foster City, USA

Sequenzierungsprimer

M13 for	CTggCCgTCgTTTTAC	Invitrogen, Karlsruhe, D
M13 rev	CAGgAAACAgCTATgAC	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.12 Antikörper

Primärantikörper anti-VACV-LE-IgG (polyklonal)	Acris, Herford, D
Sekundärantikörper Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Cy3-gekoppelt)	Dianova, Hamburg, D

2.13 Software

ABI 7500 Sequence Detection Software 1.4	Applied Bioscience, Foster City, USA
AxioVision LE 4.5	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, D
E.A.S.Y. RH-3	Herolab, Wiesloch, D
GraphPad Prism [®]	GraphPad Software Inc., LaJolla, USA
Lasergene 8.1.5, SeqMan Pro	DNASTAR [®] , Inc., Madison, USA
RTCA Software 1.2	Roche Applied Science, Mannheim, D

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Klonierung

Die Klonierung der shRNA-exprimierenden Plasmide erfolgte mit dem GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System von Promega. Der verwendete Vektor pGeneClip™ hMGFP (siehe 2.3 und Abb. 3-1) verfügt über einen RNA-Polymerase-Promoter welcher die Transkription der shRNA durch die RNA-Polymerase II ermöglicht (U1-Promoter). Mithilfe des hMGFP („humanized“ *Monster Green*® *Fluorescent Protein*) lassen sich transfizierte Zellen im Fluoreszenzmikroskop identifizieren und so die Transfektionseffizienz einschätzen. Die Ampicillin-Resistenz dient als positiver Selektionsmarker.

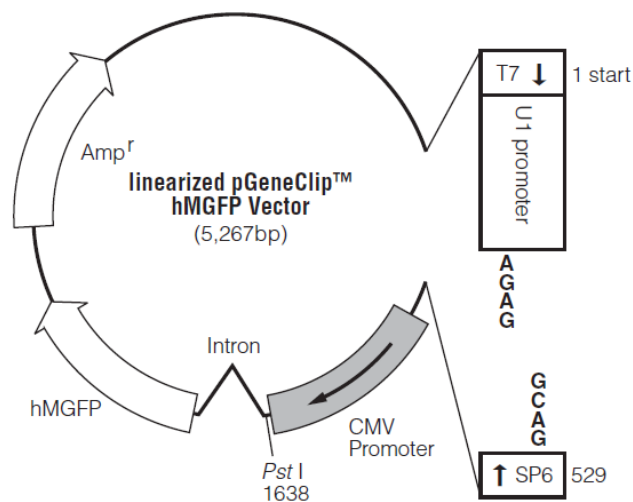


Abbildung 3-1: pGeneClip™ hMGFP (Promega)

Für jeden *host-range*-Faktor wurden drei siRNAs (siehe 2.11) designed, von denen später diejenige mit der besten Funktionalität ausgewählt wurde. Zusätzlich kam eine *non-sense* siRNA zum Einsatz, die im Folgenden *Scrambled* (SC)-Kontrolle genannt wird und vergleichbare Eigenschaften zu denen der siRNAs besitzt.

Die shRNA-codierenden Oligonukleotide wurden von Livia Schünadel nach den Angaben des Herstellers zum GeneClip™ U1 Hairpin Cloning System von Promega designed.

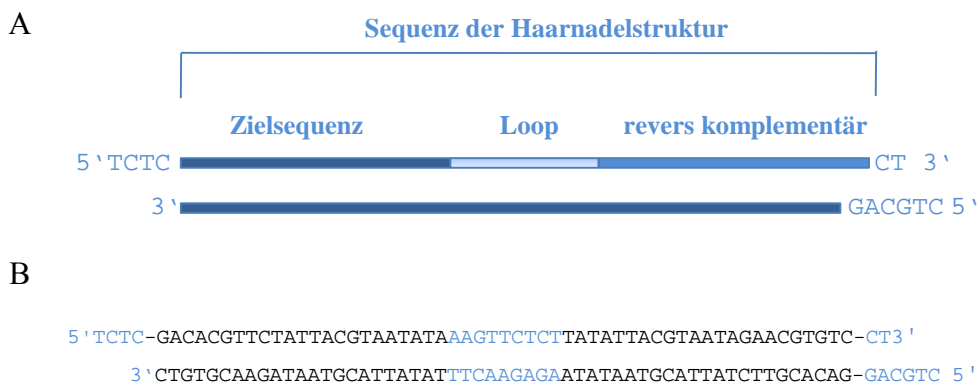


Abbildung 3-2: Struktur der *hairpin*-Oligonukleotide (Promega)

(A) Die eingesetzten Oligonukleotide wurden jeweils nach dem hier abgebildeten Schema designed. Durch einen Annealingschritt wurde aus den zwei Oligonukleotiden ein doppelsträngiges Insert. (B) Exemplarisch die Struktur eines *hairpin*-Oligonukleotids bestehend aus der siRNA gegen C7L, der *Loop*-Sequenz und den entsprechenden Überhängen.

Ein shRNA-codierendes Oligonukleotid setzt sich aus der siRNA-Zielsequenz und der Sequenz für die *Loop*-Struktur zusammen und besitzt zu den Enden des Vektors komplementäre Überhänge für eine sogenannte *sticky end*-Ligation (Abb. 3-2). Ein zweites Oligonukleotid ist revers komplementär zum ersten Oligonukleotid mit anderen Überhängen. Beide Oligonukleotide werden in einem der Klonierung vorgeschalteten Annealingschritt zu einem doppelsträngigen Insert zusammengefügt.

Die Klonierung der siRNAs wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt, die Ligation der *hairpin*-Inserts mit dem Vektor pGeneClip™hMGFP erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT).

3.1.2 Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli*

Die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* JM109 (siehe 2.7) mit den klonierten shRNA-exprimierenden Plasmiden (3.1.1) erfolgte nach Angaben des Transformationsprotokolls von Promega.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

Mini-Plasmidpräparation

Je Ansatz wurden mit 5 der über Nacht gewachsenen Bakterienkolonien 3 ml LB-Medium (siehe 2.9) mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Diese Kulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm über Nacht inkubiert und die Plasmide nach 16 h mit dem Plasmid DNA-Purification Kit (NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure: Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*, Machery & Nagel) aufgereinigt. Die Elution erfolgte für 10 min bei RT und 1 min bei 11000 x g in 50 µl Elutions-Puffer. Von den im PstI-Verdau (3.1.2) als positiv identifizierten Klonen wurden Glycerinstocks aus 750 µl Kultur und 250 µl 80 % Glycerin angesetzt, die bis zur weiteren Verwendung bei -70 °C gelagert wurden.

Maxi-Plasmidpräparation

Nach Kontrolle der Sequenzen (3.1.4) wurden ausgehend von den gelagerten Glycerinstocks erneut 3 ml LB-Medium (siehe 2.9) mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Nach 16 h wurden 200 ml frisches LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit den Über-Nacht-Kulturen angeimpft (1:4000) und erneut über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Diese Kulturen wurden dann für eine Plasmid-Präparation unter Anwendung des PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Purification Kits von Invitrogen verwendet. Die Elution erfolgte in 15 ml Elutions-Puffer. Bei der anschließenden Isopropanol- bzw. Ethanol-Fällung der DNA betragen die Zentrifugationsschritte abweichend von den Herstellerangaben 90 min bzw. 30 min. Das luftgetrocknetete Pellet wurde in 350 µl H₂O gelöst.

Es folgten eine Sequenzierung der shRNA-codierenden Bereiche der in der Maxipräparation isolierten Plasmide und eine qualitative Agarose-Gelelektrophorese (3.1.5). Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop[™] ND1000 bei 260 nm bestimmt.

3.1.4 Restriktionsanalyse mit PstI

Ein Restriktionsverdau mit PstI wurde zur Analyse der korrekten Insertion der *hairpin*-Oligonukleotide in den pGeneClip[™] hMGFP-Vektor (3.1.1) eingesetzt. Bei Ligation

des Inserts in den Vektor entsteht eine zweite PstI-Schnittstelle und nach der Restriktion ergeben sich zwei Fragmente, die in einem Agarose-Gel als zwei Banden bei 4120 bp und 1197 bp zu erkennen sind. Klone ohne Einbau des *Hairpin*-Oligonukleotids führen bei einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease PstI lediglich zu einem linearisierten Vektor und demnach zu einer Bande bei 5267 bp.

Restriktion mit PstI



Die Analyse der Inserts mit dem Restriktionsenzym PstI wurde in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt. Eingesetzt wurden 2 µl 10 x *Restriction Enzyme Reaction Buffer* H (Promega), 1 µl PstI (10 U/µl) und 0,5 –1 µg der Plasmid-DNA in einem Volumen von 3 µl und 14 µl H₂O. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und die Fragmente anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden die in der Probe enthaltenen DNA-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Verwendet wurden Gele mit 1-2 % Agarose in TAE-Puffer (2.9), als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. Dem Agarose-Gel und dem Laufpuffer wurden Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) zugegeben, welches in die DNA interkaliert und sie unter UV-Licht sichtbar macht (Sambrook *et al.* 1989). Die angelegte Spannung betrug 90 V.

Eingesetzt wurden für die Gelelektrophorese je 5 µl der Probe und 1 µl 6 x Ladepuffer. Die verwendeten Größenstandards waren die „*GeneRuler* 100 bp“ oder „1 kb *DNA-Ladder*“ von Fermentas. Die Auswertung der Gele erfolgte mit dem Geldokumentationssystem E.A.S.Y. RH-3 von Herolab.

3.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger durchgeführt (Sanger *et al.* 1977). Verwendet wurde hierfür das BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosciences. Eingesetzt wurden jeweils 150-300 ng Plasmid-DNA. Als Sequenzierungsprimer konnten für den Vektor pGeneClip[™] hMGFP (2.3) die M13 *Forward* und *Reverse* Primer (2.11) verwendet werden.

Tabelle 3-1: Ansatz und Zyklus-Bedingungen der Sequenzierungsreaktion

<u>10µl Ansatz:</u>		<u>Zyklus-Bedingungen</u>		
M13 Forward Primer (10µM)	0,5 µl			
M13 Reverse Primer (10µM)	0,5 µl	96 °C	2 min	
BigDye v3.1 Terminator Reagenz	1 µl	96 °C	10 s	} 25 x
ABI Terminator Puffer (5x)	1,5 µl	55 °C	5 s	
DNA (150-300 ng)	x µl	60 °C	4 min	
H ₂ O	ad 10 µl	4 °C	hold	

Die Auswertung der mittels der ABI-Software *Sequence-Analysis* erzeugten Sequenzen erfolgte im Programm *SeqMan Pro* (DNASTAR[®], Inc., Lasergene Softwarepaket Version 8.1.5).

3.1.7 RNA-Extraktion und DNase-Verdau

Die Isolation der RNA erfolgte mit dem Total RNA Isolation Kit von Machery & Nagel nach Angaben des Herstellers. Die Elution erfolgte zweimal in jeweils 25 µl RNase-freiem Wasser, wobei dieses für 5 Minuten auf den Säulen inkubiert wurde und dann eine Zentrifugation für 1 min bei 11000 x g folgte. Anschließend wurde das Turbo DNA-free[™] Kit von Ambion für einen zusätzlichen DNase-Verdau angewendet. Hier wurden auf je 50 µl Probe 5 µl 10 x TURBO DNase-Puffer und 1 µl TURBO DNase (2 Units/µl) eingesetzt. Nach einer Inkubation für 25 Minuten im Wasserbad bei 37 °C wurde die Reaktion durch Inkubation mit 5,6 µl Inaktivierungsreagenz für 2 Minuten bei RT gestoppt. Durch Zentrifugation für 2 min bei 10000 x g wurden DNase und Inaktivierungsreagenz herunterzentrifugiert und die RNA konnte als 50 µl klarer Überstand abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt werden.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop™ ND1000 bei 260 nm bestimmt. Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.1.8 cDNA-Synthese

Bei diesem Schritt wird mithilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (in diesem Fall der SuperSCript® II Reversen Transkriptase von Invitrogen) die vorliegende RNA in *complementary* oder *copy* DNA, cDNA, umgeschrieben. Es wurden Oligo(dT)-Primer eingesetzt, die an die Poly-A-Bereiche am 3'-Ende der mRNA binden.

Während der cDNA-Synthese wurde stets zum Ausschließen einer DNA-Kontamination eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt. Das Pipettieren der Syntheseansätze erfolgte auf Eis, eingesetzt wurden jeweils 500 ng RNA. Die Zusammensetzung des cDNA-Syntheseansatzes und die Zyklus-Bedingungen sind Tabelle 3-2 zu entnehmen. cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3-2: Ansatz und Zyklus-Bedingungen der cDNA-Synthese

<u>20 µl Ansatz:</u>		<u>Zyklus-Bedingungen:</u>	
Oligo(dT)16-Primer (50 µM)	1 µl	65 °C	5 min
dNTPs (2,5 mM)	0,4 µl	37 °C	2 min
5 x First Strand Puffer	4 µl	42 °C	50 min
DTT (100 mM)	2 µl	70 °C	15 min
Reverse Transkriptase		4 °C	10 min
SuperSCript® II (2U/µl)	0,5 µl		
H ₂ O	2,1 µl		
RNA (50ng/µl)	10 µl		

3.1.9 Real-Time-PCR

Die *Real-Time*-PCR wurde als TaqMan®-PCR durchgeführt, bei der eine sequenzspezifische Sonde flankiert von zwei Primern zum Einsatz kommt. Bei den verwendeten Sonden für C7L, K1L und CP77 handelte es sich um MGB-Sonden (*Minor-Groove-Binder*). Der *Reporter*-Farbstoff dieser Sonden (6-Carboxy-fluorescein) kann über den FAM™-Detektor des verwendeten *Real-Time*-PCR-Gerätes ABI 7500 (Applied Biosystems) detektiert werden. Bei den verwendeten *Quenchern* handelt es

sich um sogenannte *Dark Quencher*, die die Emission des *Reporter*-Fluorophores bei räumlicher Nähe komplett absorbieren und diese als Wärmeenergie abgeben. Dies ermöglicht die Verwendung eines breiteren Spektrums an Fluoreszenzfarbstoffen, da die *Quencher*-Farbstoffe kein zusätzliches Signal liefern und keine weiteren Kanäle bei der Detektion belegen.

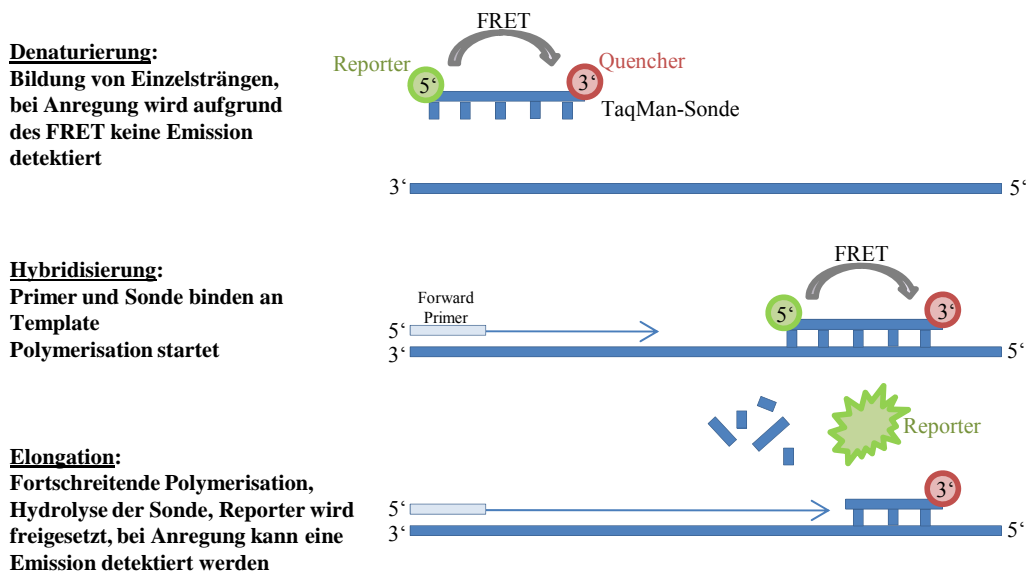


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der *Real-Time-PCR* im TaqMan[®]-Format

Tabelle 3-3 gibt den Ansatz und die Zyklus-Bedingungen für die *Real-Time-PCR* an. Das Fluoreszenzsignal wird am Ende der 60 °C-Extensionsphase gemessen.

Tabelle 3-3: Ansatz und Zyklus-Bedingungen für die *Real-Time-PCR*

<u>25 µl-Ansatz:</u>		<u>Zyklus-Bedingungen:</u>	
H ₂ O	16,60 µl	95 °C	10 min
10 x PCR Puffer ohne Mg	2,5 µl	95 °C	15 s
MgCl ₂ (50 mM)	2,0 µl	60 °C	34 s
dNTPs (2,5 mM)	1 µl	} 45 x	
Forward-Primer* (10 µM)	0,75 µl		
Reverse-Primer* (10 µM)	0,75 µl		
MGB Sonde* (10 µM)	0,25 µl		
Platinum [®] Taq-DNA-Polymerase (0,5 Units/µl)	0,15 µl		
Template	1 µl		

*Primer/Sonden der *Host-range*- und Referenzgen-Assays s. 2.11

Die Auswertung der quantitativen *Real-Time-PCR* erfolgte über eine relative Quantifizierung mit der ddC_T -Methode (Livak & Schmittgen 2001). Hiermit ist die Berechnung einer zur *SC*-Kontrolle relativen Genexpression möglich. Es werden die C_T - (*threshold cycle*) Werte für die Proben mit dem Referenzgen *cMyc* und dem jeweiligen Assay (2.11) für den entsprechenden *Host-Range*-Faktor ermittelt.

Für die Berechnung des *Knockdowns* erfolgt zunächst eine Normalisierung des C_T -Wertes für die gemessene Probe gegen den erhaltenen Wert im Referenzgen-Assay (Formel (1) und (2)).

$$(1) dC_T(\text{siRNA}) = C_T(\text{siRNA im siRNA-Assay}) - C_T(\text{siRNA im cMyc-Assay})$$

$$(2) dC_T(\text{SC}) = C_T(\text{SC im siRNA-Assay}) - C_T(\text{SC im cMyc-Assay})$$

Anschließend werden die so errechneten Werte für die verschiedenen Proben (siRNA, SC) zueinander ins Verhältnis gesetzt (Formel (3)).

$$(3) ddC_T = dC_T(\text{siRNA}) - dC_T(\text{SC})$$

Dies geschieht jeweils durch Bilden zweier Differenzen, der erhaltene Wert geht in Formel (4) ein und liefert einen Wert für die relative Genexpression des entsprechenden Gens in der siRNA-Probe im Vergleich zur SC-Probe.

$$(4) \text{relative Genexpression} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.2 Zytologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Es wurden folgende adhärenente Zelllinien verwendet: HEK293T (*Human Embryonic Kidney*), RK13 (*Rabbit Kidney*), CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*), Dubca (*Dubai Camel*) und NIH/3T3 (embryonale Mausfibroblasten). Eine genaue Beschreibung der Zelllinien ist unter 2.5 zu finden.

Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und mit 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Je nach Größe der Flasche (25 cm², 75 cm² und 175 cm²) wurden die Zellen in 8 ml, 18 ml und 40 ml Zellkulturmedium kultiviert. Für jede Zelllinie wurde das Medium mit den entsprechenden Zusätzen für ein optimales Wachstum verwendet (Tab. 3-4). Das fötale Kälberserum (FKS) wurde vor Zugabe zu den Nährmedien für 30 Minuten bei 56 °C inaktiviert.

Tabelle 3-4: Verwendete Zelllinien und Medien mit Zusätzen

<u>Zelllinie</u>	<u>Medium</u>	<u>Zusätze</u>	
HEK293T	DMEM	5 % FKS	L-Gln (2 mM)
RK13	DMEM	10 % FKS	L-Gln (2 mM)
CHO-K1	Ham's F12	10 % FKS	L-Gln (2 mM)
Dubca	EMEM	10 % FKS	L-Gln (2 mM)
NIH/3T3	DMEM	5 % FKS	L-Gln (2 mM)
VeroE6	DMEM	10 % FKS	L-Gln (2 mM)

3.2.2 Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zellen erfolgte je nach Zelllinie zwei bis drei Mal pro Woche in einem Verhältnis von 1:8 bis 1:12. Die Zellen wurden hierfür nach Abnahme des verbrauchten Kulturmediums mit 3-7 ml 1 x PBS (2.9) gewaschen und der Zellrasen anschließend durch Zugabe von Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Die Menge an zugegebenem Trypsin/EDTA wurde je nach Fläche der Zellkulturflasche angepasst (25 cm² 0,5 ml; 75 cm² 0,75 ml; 175 cm² 1 ml). Nach Zugabe des Trypsins erfolgt eine Inkubation für 5-15 min bei 37 °C im Brutschrank bis

sich die Zellen komplett vom Flaschenboden gelöst hatten. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Der gewünschte Anteil der Zellen wurde zur Weiterkultivierung in neue Kulturflaschen mit bereits vorgelegtem Nährmedium überführt.

3.2.3 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden nach Abnahme des verbrauchten Kulturmediums mit 1 x PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin/EDTA und Inkubation bei 37 °C im Brutschrank vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und in frischem Zellkulturmedium aufgenommen. Durch Zentrifugation bei 300 x g für 8 min wurden die Zellen pelletiert und anschließend das Kulturmedium dekantiert. Das Zellpellet wurde in 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) in FKS resuspendiert und 1 ml Aliquots auf Kryoröhrchen verteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte unter Zuhilfenahme des *Mr. Frosty* (2.4). Dieser ermöglicht eine langsame Temperaturabsenkung der Zellen von 1 °C/min und ist dementsprechend besonders schonend. Die Zellen wurden mit dem *Mr. Frosty* zunächst über Nacht bei -70 °C gekühlt und anschließend bis zur weiteren Verwendung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

3.2.4 Auftauen von Zellen

Für den Auftauprozess der Zellen wurden die Kryoröhrchen nach Entnahme aus dem Stickstofftank in handwarmem Wasser aufgetaut und in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit bereits vorgelegtem Kulturmedium überführt. Durch Zentrifugation bei 300 x g für 8 min wurde das DMSO entfernt. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Zellkulturflasche mit vorgelegtem Nährmedium überführt.

3.2.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit der Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden unter beide Seiten des aufgelegten Deckglases 10 µl der Zellsuspension pipettiert und unter dem Lichtmikroskop die Zellzahl in vier Großquadraten gezählt und hieraus der

Mittelwert gebildet ($Zellen_{gez\ddot{a}hlt}$). Die Anzahl der Zellen pro Milliliter ergibt sich aus Formel (5):

$$(5) \frac{Zellzahl}{ml} = Zellen_{gez\ddot{a}hlt} \cdot 10^4 .$$

3.2.6 Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit dem FuGENE[®] HD Transfektionsreagenz von Roche. Durchgeföhrt wurde die Prozedur nach Angaben des Herstellers.

Bei FuGENE[®] handelt es sich um ein Gemisch aus Lipiden und weiteren Komponenten in 80 % Ethanol, welches mit der zu transfizierenden DNA Komplexe bildet und diese in die Zellen transportiert. Das Verhöltnis an eingesetzter DNA zu Transfektionsreagenz und die Menge an zugegebenem Transfektionskomplex wurde für jede verwendete Zelllinie individuell optimiert (siehe Tabelle 3-5). Nötige Verdünnungen der Plasmid-DNA wurden in OptiMEM[®] vorgenommen, die entsprechende Menge Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz FuGENE[®] in 100 μ l OptiMEM[®] bei RT für 30 min inkubiert, anschließend zu den Zellen gegeben und mit dem vorhandenen Kulturmedium vermischt.

Tabelle 3-5: Transfektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Ausgesäte Zellzahl pro 96-/24-Kavität</u>	<u>Transfektion</u>		<u>Zugegebenes</u>
		<u>x h nach Aussäen</u>	<u>Verhöltnis DNA[μg]:FuGENE[®][μl]</u>	<u>Volumen pro 96-/24-Kavität</u>
RK13	$2 \times 10^4/1 \times 10^5$	16 h	2:5	5 μ l/15 μ l
HEK293T	$3 \times 10^4/1 \times 10^5$	10 h	2:5	5 μ l/15 μ l
CHO	$2 \times 10^4/1 \times 10^5$	16 h	2:5	5 μ l/15 μ l
Dubca	$2 \times 10^4/1 \times 10^5$	16 h	2:5	15 μ l/75 μ l
NIH/3T3	$1,5 \times 10^4/7,5 \times 10^4$	16 h	2:6	5 μ l/15 μ l

Für die Transfektion von RK13-Zellen in 75 cm²-Flaschen wurden 18 μ g Plasmid-DNA, 45 μ l FuGENE[®] HD Transfektionsreagenz und 900 μ l Opti-MEM angesetzt und nach Inkubation von 30 min bei RT 900 μ l in den Kulturüberstand pipettiert.

3.2.7 Infektion

Verwendet wurden die Virusstämme Kamelpockenvirus CP-19 (CMLV CP-19), Vacciniavirus *Western Reserve* (VACV WR) und Kuhpockenvirus *Brighton Red* (CPXV BR) (siehe 2.6).

Der Zeitpunkt der Infektion nach der Transfektion, die MOI (*multiplicity of infection*) und der Erntezeitpunkt p. i. (*post infection*) wurden für jede Zelllinie optimiert und sind Tabelle 3-6 zu entnehmen. In die 96-Kavitäten-Zellkulturplatte wurden pro Kavität 50 µl der Virusverdünnungen (bei Infektion mit CPXV BR und VACV WR siehe 2.6) bzw. 16,7µl unverdünnter CMLV CP-19 Virusstock zugegeben und mit dem Zellkulturmedium gemischt. In der 24-Kavitäten-Zellkulturplatte erfolgte die Infektion durch Zugabe von jeweils 100 µl Virusverdünnung von CPXV BR bzw. VACV WR und 83 µl unverdünntes CMLV CP-19. Nach einer Inkubation von einer Stunde im Brutschrank bei 37 °C wurde der Überstand entfernt, ein Waschschrift mit 200 µl frischem Kulturmedium vorgenommen und 100 µl frisches Kulturmedium für die weitere Kultivierung zugegeben.

Tabelle 3-6: Infektionsbedingungen für die verwendeten Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Infektion x h</u>		<u>MOI</u>	<u>Volumen</u>	
	<u>nach Transfektion</u>	<u>Virus</u>		<u>Virusverdünnung</u>	<u>Ernte</u>
RK13	52 – 64 h	VACV WR	0,1	50 µl/100 µl*	48 h p. i.
HEK293T	48 h	CMLV CP-19	1	16,7 µl/83 µl*	48 h p. i.
CHO	36 h	CPXV BR	0,1	50 µl/100 µl*	24 h p. i.
Dubca	24 h	CMLV CP-19	1	16,7 µl/83 µl*	96 h p. i.
		VACV WR	0,01	50 µl/100 µl*	96 h p. i.
		CPXV BR	0,01	50 µl/100 µl*	96 h p. i.
NIH/3T3	24 h	VACV WR, CPXV	0,1	50 µl/100 µl*	36 h p. i.
		BR, CMLV CP-19			36 h p. i.

* 96-Kavitäten-/24-Kavitäten-Zellkulturplatte

Nach der Infektion erfolgte die Auswertung der Experimente auf verschiedenen Ebenen. Für einen indirekten Immunfluoreszenzassay (3.2.8) wurden zunächst die Kulturüberstände der Zellen entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen (200 µl in der 96-Kavitäten-Zellkulturplatte, 500 µl in der 96-Kavitäten-Zellkulturplatte). Das zur Fixierung eingesetzte methanolfreie Formaldehyd (4 % in PBS) wurde für 5 min bei

65 °C im Wasserbad erhitzt, um Polymere zu entfernen. Die Zellen wurden mit 200 µl bzw. 500 µl Formaldehyd je Kavität für 20 min bei RT inkubiert.

In einen Plaque-Titrationstest (3.2.9) wurden bei den RK13-Zellen die Kulturüberstände und bei den restlichen Zelllinien aufgeschlossene Zellen eingesetzt. Kulturüberstände wurden bei -80 °C gelagert. Zum Aufschließen der Zellen für den Plaque-Titrationstest wurden die Zellen mit jeweils 200 µl Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturplatten gelöst. Es folgte ein Waschschriff durch Zentrifugieren von 6 min bei 1000 rpm und 4 °C. Das Zellpellet wurde in 500 µl Kulturmedium resuspendiert. In einer Abfolge von dreimaligem Einfrieren bei -20 °C und Auftauen bei RT wurden die Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch eine Zentrifugation von 10 min bei 1000 rpm und 4 °C pelletiert. Der die Viruspartikel enthaltende Überstand wurde bei -20 °C gelagert.

3.2.8 Indirekter Immunfluoreszenzassay

Bei einem indirekten Immunfluoreszenzassay (IFA) kommen ein Primär- und ein Sekundärantikörper zum Einsatz. Der IFA wurde sowohl in der 96-Kavitäten-Zellkulturplatte als auch auf großem Maßstab (24-Kavitäten-Zellkulturplatte) eingesetzt. Nach Fixieren der Zellen (3.2.7) wurden diese mit 0,2 % TritonX-100 in 1 x PBS (70 µl bzw. 175 µl je Kavität) für 15 min bei RT permeabilisiert und dann mit 200 µl bzw. 500 µl 1 x PBS je Kavität gewaschen.

Der Primärantikörper anti-VACV-LE-IgG (Acris) war ein polyklonal gegen Pockenviren gerichteter Antikörper und wurde in einer Verdünnung von 1:500 in Antikörper-Puffer (2.9) eingesetzt. Die Inkubation der Zellen mit der Antikörperverdünnung (50 µl bzw. 150 µl je Kavität) erfolgte für eine Stunde bei 37 °C. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit 200 µl bzw. 500 µl 1 x PBS je Kavität, wobei der letzte Waschschriff für 10 min bei RT inkubiert wurde. An den Sekundärantikörper Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Dianova) war ein synthetischer Cyaninfarbstoff (Cy3) mit einem Emissionsmaximum bei 570 nm gekoppelt. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:200 in Antikörper-Puffer (2.9) eingesetzt und die Zellen mit 50 µl bzw. 150 µl Verdünnung je Kavität für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für eine Zellkernfärbung wurden 0,2 ng/µl DAPI zugegeben. DAPI

(4'-6-Diamidin-2-phenylindol) interkaliert in doppelsträngige DNA lebendiger Zellen, wodurch seine Fluoreszenz um ein Vielfaches verstärkt wird.

Nach der Abnahme des Sekundärantikörpers und einem dreifachen Waschvorgang mit 200 µl bzw. 500 µl 1 x PBS je Kavität konnte die Auswertung des IFA am Fluoreszenzmikroskop erfolgen.

3.2.9 Plaque-Titrationstest

Der Plaque-Titrationstest wurde verwendet, um die Inhibition der Virusreplikation bei einem erfolgreichen *knockdown* nachzuweisen. Replikationsfähige Viruspartikel führen zur Bildung von Plaques, die bei dem abschließenden Färbeschritt mit Naphthol-Blauschwarz farblos bleiben. Der intakte Zellrasen wird hingegen blau angefärbt.

Für den Plaque-Titrationstest wurden Vero-Zellen (2.5) in 24-Kavitäten-Zellkulturplatten in einer Dichte von $2,4 \times 10^5$ Zellen/Kavität in 200 µl Kulturmedium ausgesät. Von den aufgeschlossenen Zellen (3.2.7) bzw. dem Kulturüberstand der RK13-Zellen wurde eine dekadische Verdünnung angesetzt und 200 µl je Kavität zu den Vero-Zellen pipettiert. Der Ansatz erfolgte als Vierfachbestimmung.

Nach einer Inkubation bei 37 °C für vier bis fünf Stunden wurden die Zellen mit 400 µl 1,6 % iger Carboxymethylcellulose (CMC) zur Vermeidung von Sekundärinfektionen überschichtet. Die Platten wurden dann für vier (VACV WR, CPXV BR) beziehungsweise fünf Tage (CMLV CP-19) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zum Anfärben wurde zunächst der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen mit 2 ml 3,7 % Formaldehyd in 1 x PBS je Kavität für 20 Minuten bei RT fixiert. Anschließend wurden die Zellen je Kavität mit 500 µl Naphthol-Blauschwarz-Färbelösung (0,1 %) für 15 Minuten gefärbt, mit 2 ml Leitungswasser gewaschen und getrocknet. Die Anzahl der ungefärbten Plaques wurde bestimmt und in Formel (6) zur Berechnung des Virustiters in PFU/ml eingesetzt:

$$(6) \text{ Titer [PFU/ml]} = \frac{\Sigma \text{ Plaques} \times \text{niedrigste auszählbare Verdünnungsstufe}}{\Sigma \text{ eingesetztes Volumen}}$$

3.2.10 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung

Bei den RK13-Zellen ließ sich durch das herkömmliche Transfektionsverfahren mit FuGENE[®] (3.2.6) nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz erzielen. Dies war für das Erzeugen eines detektierbaren *knockdowns* nicht ausreichend. Um den Anteil transfizierter Zellen zu erhöhen, wurden die RK13-Zellen einer fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (*Fluorescence-activated Cell Sorting*, FACS) mit dem FACS Aria II von BD Biosciences (2.4) unterzogen.

Bei einer fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung handelt es sich um ein durchflusszytometrisches Verfahren, bei dem die Zellen jedoch nicht nur charakterisiert, sondern ihren Eigenschaften entsprechend sortiert und die Fraktionen wieder aufgefangen werden.

Bei der Durchflusszytometrie werden die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom durch eine Düse gepresst und so vereinzelt. In diesem Flüssigkeitsstrom passieren sie einen Laserstrahl und liefern durch Streuung des Laserlichtes Signale, die durch spezielle Detektoren registriert werden können. Ein FACS-Gerät liefert durch Messung des Vorwärtsstreulichtes (sog. *Forward Scatter*, FSC) und des Seitwärtsstreulichtes (sog. *Side Scatters*, SSC) bereits Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen in der Probe. Tote Zellen und Zelltrümmer können so von lebendigen Zellen abgegrenzt werden. Zusätzlich können durch Einsatz eines weiteren Detektors die fluoreszierenden Eigenschaften der Zellen registriert und diese entsprechend über Ablenkplatten sortiert werden. Abbildung 3-4 erläutert das Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung.

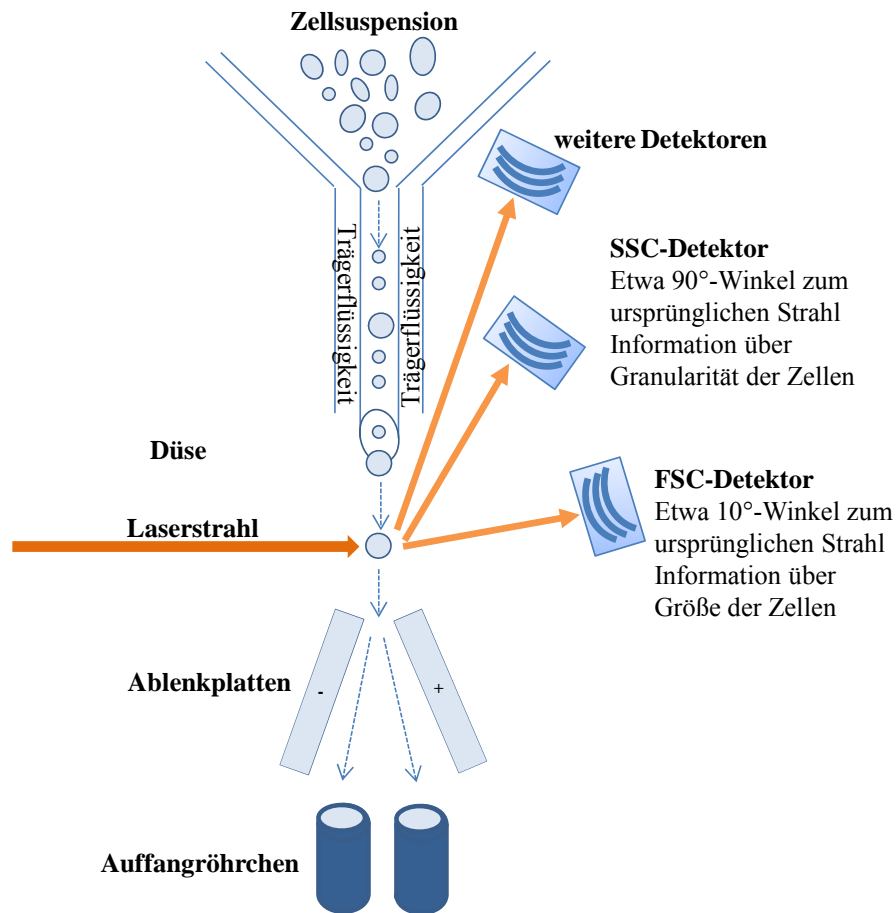


Abbildung 3-4: Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung

Die Zellsuspension wird durch eine Düse gepresst. Tropfen mit einer einzelnen Zelle treffen dann auf einen Laserstrahl. Die Ablenkung des Laserstrahls wird vom FSC (*Forward Scatter*) und vom SSC (*Side Scatter*) und weiteren Detektoren registriert. Je nach Eigenschaften der Zelle wird diese durch Ablenkplatten in das entsprechende Auffanggefäß sortiert. Modifiziert nach Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, David Baltimore & James Darnell, *Molecular Cell Biology*, 4. Ausgabe, 2000.

Für die Sortierung wurden 4×10^6 Zellen in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und nach 10 h mit FuGene[®] transfiziert (3.2.6). Nach 36 h wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst. Die Zellzahl wurde durch eine Zählung in der Neubauer-Kammer (3.2.5) ermittelt und die Zellen für 8 min bei 4 °C und 300 x g zentrifugiert. Bei allen weiteren Schritten wurde ebenfalls bei 4 °C gearbeitet. Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer (PBS mit 0,5 % BSA) gelöst und filtriert (30 µm-Filter). Für eine Lebend-Tot-Färbung wurde die Probe kurz vor dem Sortiervorgang 1:20 mit 25 µM DAPI versetzt. Das Sortieren der Zellen erfolgte mit einer 85 µm Düse.

15 ml-Zentrifugenröhrchen wurden über Nacht mit FACS-Puffer (2.9) gecoatet und zum Auffangen der sortierten Fraktionen mit 100 µl 10 % BSA in 1 x PBS (2.9) vorbereitet.

Die erhaltenen Positiv- (GFP⁺-sortierte Zellen) und Negativfraktionen (GFP⁻-sortierte Zellen) wurden nach der Sortierung auf ihre Reinheit kontrolliert. Hierfür wurden 25 µl der sortierten Fraktionen in 200 µl PBS aufgenommen, mit 3 µl 25 µM DAPI versetzt und im FACS-Gerät analysiert.

Da es sich bei der Zellsortierung um einen semi-sterilen Prozess handelt, wurde das nach dem Sortiervorgang verwendete Medium 1:100 mit Penicillin/Streptomycin (PAA) versetzt.

Der FACS-Puffer in den sortierten Fraktionen wurde nach dem Sortiervorgang durch Zentrifugation bei 300 x g für 8 min entfernt und die Pellets in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Zählung in der Neubauer-Kammer bestimmt (3.2.5) und in einer 96-Kavitäten-Zellkulturplatte 5×10^4 RK13-Zellen in einem Volumen von 100 µl pro Kavität ausgesät. Nach 16 – 20 h erfolgte die Infektion (3.2.7).

3.2.11 Impedanzmessung

Der Effekt des siRNA-vermittelten *knockdowns* der *Host-Range*-Gene in den verwendeten Zelllinien wurde zusätzlich per Impedanzmessung unter Verwendung des xCELLigence™-Systems von Roche analysiert. Das xCELLigence™-System bietet eine nicht-invasive *Real-Time*-Aufzeichnung des biologischen Status der analysierten Zellen. Es setzt sich aus einem Analyse-Gerät und einer im Inkubator lokalisierten SP-Station mit einer speziellen 96-Kavitäten-Zellkulturplatte (*E-Plate*) zusammen. Die *E-Plate* verfügt über mikroelektronische Biosensoren im Boden der Platte, welche durch Messung der Impedanz Änderungen im Zellwachstum aufzeichnen. Diese Änderungen werden als dimensionsloser *Cell Index* CI ausgegeben. Der CI repräsentiert die Zellzahl, die Morphologie der Zellen und den Grad der Zelladhäsion. Der cytopathische Effekt bei einer Virusinfektion der Zellen führt somit zu einer deutlichen Änderung des CI. Abbildung 3-5 veranschaulicht, wie die Impedanz und somit der CI durch Änderungen im Zellwachstum beeinflusst werden.

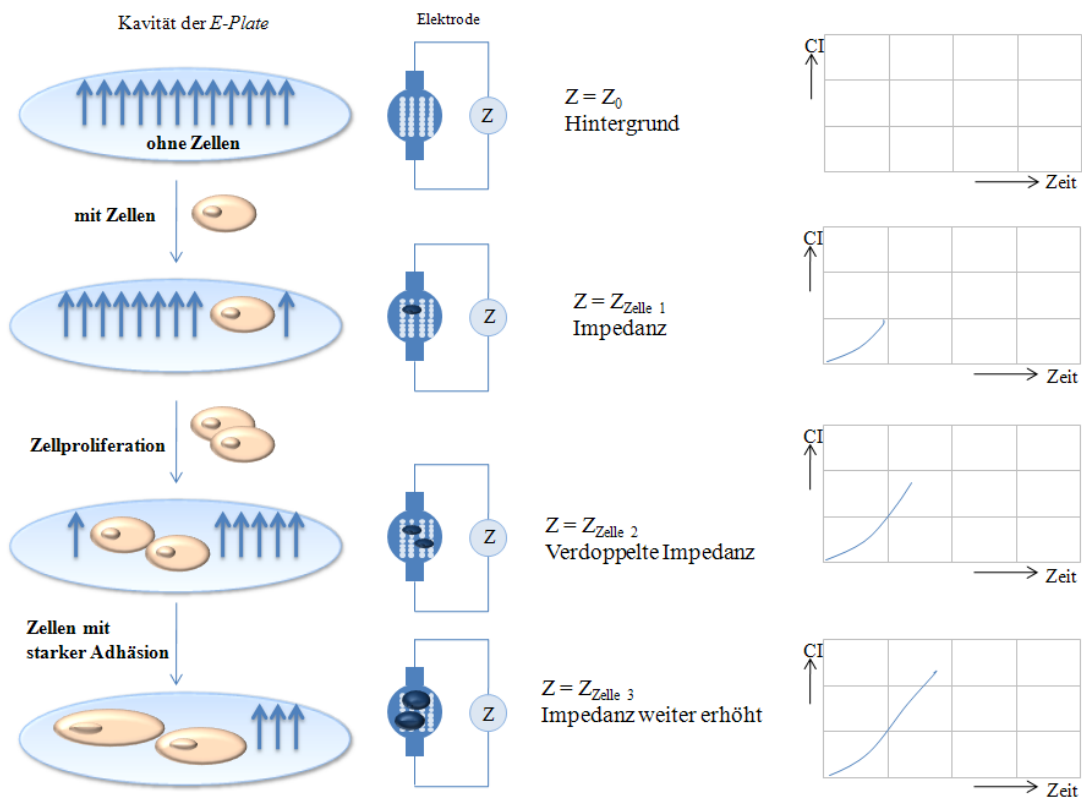


Abbildung 3-5: Impedanzmessung von Zellen

In einer Kavität ohne Zellen ist der *Cell Index* (CI) gleich Null, bei Anwesenheit einer Zelle wird ein CI gemessen, welcher sich für zwei Zellen verdoppelt. Bei starker Adhärenz der Zellen steigt der aufgezeichnete CI weiter an. Modifiziert nach Illustration von Roche, Stand: 30. August 2010, URL: <https://www.roche-applied-science.com>.

In einer Kavität ohne Zellen oder mit nicht anwachsenden Zellen ist der CI gleich Null, denn die Impedanz der Elektroden wird hauptsächlich durch die Ionen an der Grenzfläche zwischen Elektrode und Lösung und in dem Medium bestimmt. Werden adhärenente Zellen in die Kavitäten der *E-Plate* eingesät, setzen sich diese an den Oberflächen der Sensorelektroden ab und wirken als Isolatoren. Die Ionen-Situation an der Grenzfläche von Elektrode und Medium ändert sich und führt zu einem Ansteigen der Impedanz. Je mehr Bereiche der Elektroden durch Zellen abgedeckt werden, desto größer ist die Impedanz-Änderung und desto höher wird der CI.

In die Zwischenräume der Kavitäten der *E-Plate* wurde 1 x PBS pipettiert. Die erste Messung erfolgte mit 50 μl Zellkulturmedium pro Kavität für eine Hintergrund-Bestimmung. Anschließend wurden die für die verschiedenen Zelllinien optimierten Zellzahlen für 96-Kavitäten-Zellkulturplatten (siehe Tabelle 3-5) in 100 μl Medium

ausgesät und das Experiment gestartet. Die Transfektion (3.2.6) und die Infektion (3.2.7) der Zellen erfolgten jeweils mit den gleichen Volumina wie in der konventionellen 96-Kavitäten-Zellkulturplatte.

Alternativ wurde die Impedanzmessung zur Analyse von aufgeschlossenen Zellen und Zellkulturüberständen eingesetzt. Hierfür wurden 1×10^4 Vero-Zellen (2.5) in 100 μl Zellkulturmedium pro Kavität in der *E-Plate* ausgesät. Nach 16 - 20 h wurden je 50 μl der zu analysierenden Proben hinzugegeben.

Der CI wurde über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen alle 10 min aufgezeichnet.

Die Auswertung der Impedanzmessung erfolgte mit der RTCA-Software 1.2 von Roche. Verwendet wurde für die Auswertung der normalisierte CI (NCI). Der NCI ergibt sich durch Division des CI zu einem bestimmten Punkt durch den CI zum Zeitpunkt der Normalisierung. Hierfür wurde der Zeitpunkt der Infektion gewählt. Die Darstellung des NCI ermöglicht einen besseren Vergleich zwischen Kavitäten mit verschiedenen Zellproliferationsraten.

4 Ergebnisse

Die *Poxviridae* verfügen aufgrund ihres breiten Wirtsspektrums über ein erhebliches zoonotisches und bioterroristisches Potential. Viele tierpathogene Pockenviren lösen beim Menschen Erkrankungen aus. In welchen Spezies die Virusreplikation permissiv ist, wird neben anderen zellulären Faktoren von der Anwesenheit der *host-range*-Gene im Pockenvirengenom bestimmt. Um ein Modell zur Charakterisierung von *host-range*-Effekten zu erhalten, wurde die Expression der *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 durch Einsatz von siRNAs herunterreguliert.

Die siRNAs wurden als shRNA-exprimierende Plasmide in die Zellen transfiziert und dort zu ihrer aktiven Form prozessiert. Im Nachfolgenden werden diese als C7L-, K1L- und CP77-siRNA bezeichnet. Die Bedingungen für die Transfektion und die Infektion der jeweiligen Zelllinie wurden in Vorexperimenten optimiert und sind im Methodenteil unter 3.2.6 und 3.2.7 zu finden.

Neben der *Scrambled* (SC)-siRNA wurden für jedes der *host-range*-Gene drei siRNAs designed (2.11, 3.1.1) und deren Effizienz auf RNA-Ebene untersucht. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase *Real-Time* PCR (3.1.9) wurde die Genexpression des *host-range*-Faktors relativ zur SC-Kontrolle ermittelt.

Für die jeweils effizienteste siRNA wurde der Effekt auf die Virusreplikation untersucht. Hierfür wurden der Anteil infizierter Zellen in der Population durch Anfärben in einem indirekten Immunfluoreszenzassay (3.2.8) bestimmt und aufgeschlossene Zellen bzw. Zellkulturüberstände in den Plaque-Titrationstest (3.2.9) eingesetzt, um den Einfluss der siRNA auf die Bildung infektiöser Partikel zu untersuchen.

Zusätzlich wurde der Einfluss der siRNAs auf den Infektionsverlauf mittels Impedanzmessung (3.2.11) analysiert.

4.1 siRNA-vermittelter *knockdown* von C7L in HEK293T-Zellen

4.1.1 Transfektion von HEK293T-Zellen

Die Transfektion (3.2.6) der HEK293T-Zellen mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden erfolgte mit dem Transfektionsreagenz FuGENE[®] HD von Roche.

Die Transfektionsrate konnte über ein Plasmid-kodiertes GFP kontrolliert werden (3.1.1). Transfizierte HEK293T-Zellen erscheinen bei Betrachtung im Floureszenzmikroskop grün. Nach Optimierung der Transfektion konnte in den HEK293T-Zellen eine geschätzte Transfektionseffizienz von ca. 85 % erreicht werden (Abbildung 4-1).

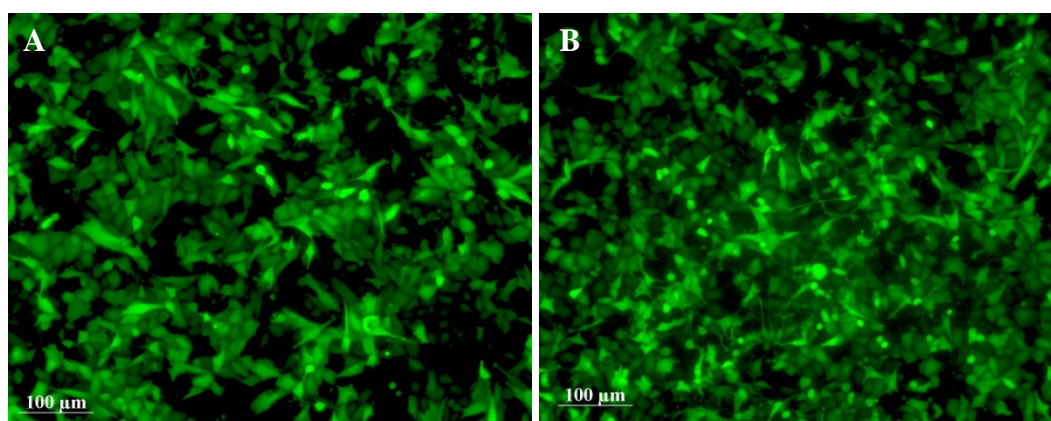


Abbildung 4-1: Transfektionseffizienz von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit der (A) C7L-siRNA und der (B) SC-siRNA für 48 h transfiziert. Transfizierte Zellen exprimieren ein Plasmid-kodiertes GFP.

Die Transfektionseffizienz der C7L-siRNA war vergleichbar mit der der SC-siRNA. Der Einsatz des Transfektionsreagenz hatte keinen sichtbaren cytotoxischen Effekt in HEK293T-Zellen.

4.1.2 *knockdown* von C7L auf RNA-Ebene

Zur Auswahl der effizientesten siRNA zum *knockdown* des *host-range*-Gens C7L wurden HEK293T-Zellen mit shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert (3.2.6), nach 48 h mit CMLV CP-19 (MOI 1) infiziert und 48 h p. i. lysiert (3.2.7). Die RNA wurde extrahiert (3.1.7) und in cDNA umgeschrieben (3.1.8). Die cDNA wurde in die *Real-Time*-PCR (3.1.9) eingesetzt und mit Hilfe der ddC_T-Methode die Genexpression

von C7L relativ zur SC-Kontrolle bestimmt. Die relative Genexpression von C7L betrug bei Einsatz der C7L_2-siRNA noch $20\% \pm 10\%$ (Dreifachbestimmung). Die C7L_1- und C7L_3-siRNAs erzeugten eine relative C7L-Genexpression von 60 % bzw. 64 % (Abbildung 4-2).

Die C7L_2-siRNA wurde zur weiteren Etablierung des siRNA-basierten Systems ausgewählt.

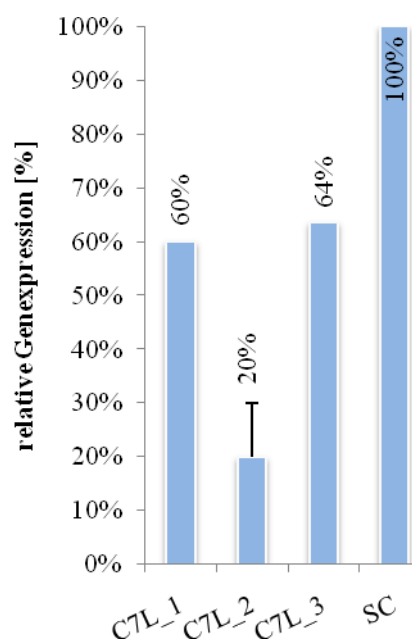


Abbildung 4-2: knockdown von C7L in HEK293T-Zellen auf RNA-Ebene

Die Abbildung zeigt die Genexpression von C7L in den mit den C7L-siRNAs transfizierten Zellen relativ zur SC-Kontrolle nach 48-stündiger Infektion mit CMLV CP-19 (MOI 1). Die Transfektion mit der C7L_2- und der SC-siRNA erfolgte als Dreifachbestimmung.

4.1.3 Inhibition der Replikation des Kamelpockenvirus CP-19

Das Kamelpockenvirus (CMLV) CP-19 kodiert für das *host-range*-Gen C7L, welches eine permissive Replikation des CMLV CP-19 in HEK293T-Zellen vermittelt. Der Einfluss der C7L-siRNA auf die Virusreplikation wurde mittels IFA, Plaque-Titrationstest und Impedanzanalyse untersucht.

Indirekter IFA

HEK293T-Zellen wurden für 48 h mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert. Anschließend erfolgte die Infektion mit CMLV CP-19 (MOI 1). 48 h p. i. wurden die HEK293T-Zellen fixiert und infizierte Zellen in einem IFA (3.2.8) mit einem anti-VACV-Primärantikörper detektiert und mittels eines Cy3-gekoppelten Sekundärantikörpers rot angefärbt. Abbildung 4-3 zeigt die Virusreplikation von CMLV CP-19 in der mit der C7L-siRNA transfizierten Population (Abbildung 4-3 A) relativ zur SC-Kontrolle (Abbildung 4-3 B).

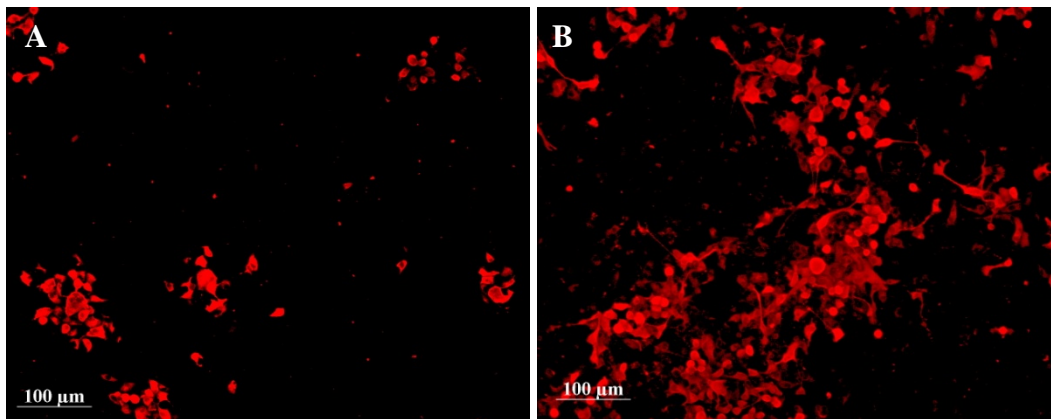


Abbildung 4-3: Indirekter IFA infizierter HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden mit shRNA-exprimierenden Plasmiden für die (A) C7L_2-siRNA und die (B) SC-siRNA transfiziert. Nach 48 h erfolgte die Infektion mit dem CMLV CP-19 (MOI 1) und 48 h p. i. der IFA. Rot: infizierte Zellen.

In der mit der C7L-siRNA transfizierten HEK293T-Population (Abbildung 4-3 A) war der Anteil der mit CMLV CP-19 infizierten HEK293T-Zellen deutlich geringer als in der SC-Kontrolle (Abbildung 4-3 B). Es konnte somit im IFA eine C7L-siRNA-vermittelte Inhibition der Virusreplikation von CMLV CP-19 nachgewiesen werden.

Plaque-Titrationstest

HEK293T-Zellen wurden für den Plaque-Titrationstest (3.2.9) mit der C7L-siRNA und der SC-siRNA transfiziert und mit CMLV CP-19 (MOI 1) infiziert. 48 h, 72 h und 96 h p. i. wurden die Zellen aufgeschlossen und via Zentrifugation die Zelltrümmer pelletiert. Der Überstand hiervon wurde in den Plaque-Titrationstest auf Vero-Zellen

eingesetzt. Abbildung 4-4 zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Ergebnisse des Plaque-Titrationstests bei den HEK293T-Zellen.

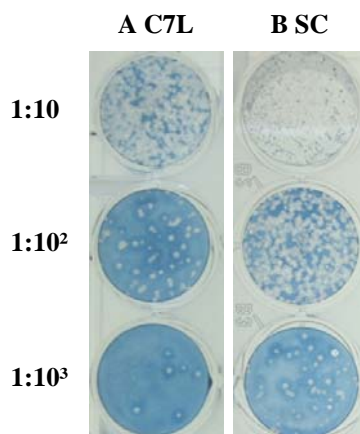


Abbildung 4-4: Aufgeschlossenen HEK293T-Zellen im Plaque-Titrationstest

HEK293T-Zellen wurden mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert und nach 48 h mit CMLV CP-19 (MOI 1) infiziert. 96 h p. i. wurden die Zellen aufgeschossen. Der Überstand nach anschließender Zentrifugation wurde in den Plaque-Titrationstest auf Vero-Zellen eingesetzt. Gezeigt sind die ersten drei Verdünnungsstufen. Transfektion mit der (A) C7L-siRNA und der (B) SC-siRNA.

In den mit der C7L-siRNA transfizierten HEK293T-Zellen (Abbildung 4-4 A) konnte ein geringerer Virustiter bestimmt werden als in mit der SC-siRNA transfizierten Zellen (Abbildung 4-4 B). Der berechnete Titer von CMLV CP-19 für die mit C7L-siRNA transfizierten HEK293T-Zellen wurde zu dem in der mit SC-siRNA transfizierten Population ins Verhältnis gesetzt, wobei letzterer den 100 %-Wert repräsentierte. Die relative Virusreplikation von CMLV CP-19 wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten ermittelt und in Abbildung 4-5 dargestellt. Bei längerer Inkubationszeit nahm die Inhibition der Virusreplikation durch den Einsatz der siRNA gegen C7L weiter zu. 48 h und 72 h p. i. konnte die Bildung infektiöser Partikel relativ zur SC-Kontrolle auf 62 % bzw. 50 % und nach 96 h auf 18 % reduziert werden.

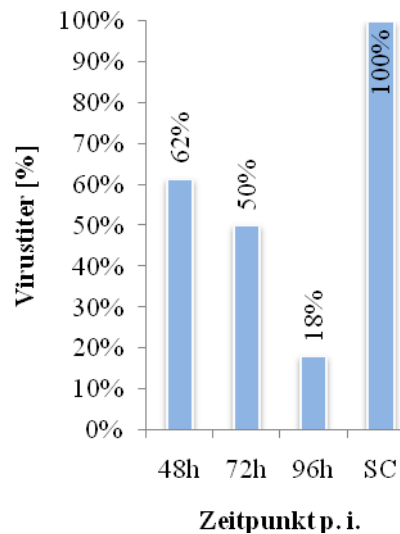


Abbildung 4-5: Inhibition der Replikation von CMLV CP-19

Dargestellt sind die Verhältnisse der Virustiter der aufgeschlossenen HEK293T-Zellen nach Transfektion mit der C7L-siRNA bezogen auf die jeweilige SC-Kontrolle zu den drei Erntezeitpunkten 48 h p. i., 72 h p. i. und 96 h p. i.

4.1.4 Impedanzmessung

Der Einfluss der infektiösen Partikel in den bereits im Plaque-Titrationstest eingesetzten aufgeschlossenen HEK293T-Zellen (4.1.3) auf das Wachstum von Vero-Zellen wurde in einer Impedanzmessung untersucht (3.2.11). 22 h nach Aussäen der Vero-Zellen erfolgte die Infektion mit den aufgeschlossenen HEK293T-Zellen. In Abbildung 4-6 wurde der normalisierte CI über die Zeit aufgetragen.

Der höhere CMLV CP-19 Virustiter in den mit der SC-siRNA transfizierten HEK293T-Zellen erzeugt einen starken CPE, was sich in dem Abfallen des CI der Vero-Zellen nach ca. 50 h bemerkbar macht. Der CI der Vero-Zellen wurde durch den Virustiter in den HEK293T-Zellen, die mit der C7L-siRNA transfiziert wurden, hingegen weniger beeinflusst.

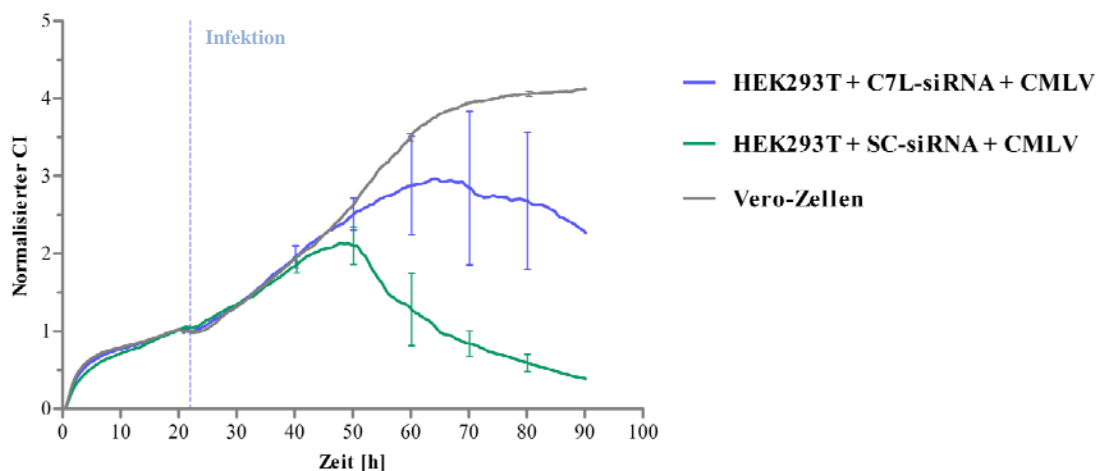


Abbildung 4-6: Impedanzanalyse der aufgeschlossenen HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit der C7L- und der SC-siRNA transfiziert und mit CMLV CP-19 (MOI 1) infiziert. Nach 48 h wurden die HEK293T-Zellen aufgeschlossen. Die Impedanzanalyse dieser Proben erfolgte durch Zugabe auf Vero-Zellen 22 h nach deren Aussaat in der *E-Plate*.

4.1.5 Zusammenfassung

Auf RNA-Ebene reduzierte die C7L-siRNA die Expression des *host-range*-Gens C7L auf $20\% \pm 10\%$. Die siRNA-vermittelte Inhibition der Virusreplikation von CMLV CP-19 wurde im indirekten IFA gezeigt. Der Plaque-Titrationstest lieferte hierfür nach 96 h eine relativ zur SC-Kontrolle auf 18 % reduzierte Virusreplikation. In einer Impedanzmessung wurde die Inhibition der Virusreplikation durch Einsatz der C7L-siRNA reproduziert.

4.2 siRNA-vermittelter *knockdown* von K1L in RK13-Zellen

4.2.1 Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung transfizierter RK13-Zellen

Auch nach Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte in den RK13-Zellen lediglich eine Transfektionsrate von geschätzten 30 % erreicht werden. Daher mussten die GFP-positiven Zellen durch eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (3.2.10) angereichert werden. Während der Prozedur des Sortierens waren die Zellen großen Belastungen ausgesetzt, so dass ein Großteil der eingesetzten Zellen verloren ging und der Vorgang eine geringe Ausbeute aufwies.

Für den Sortiervorgang wurde zunächst eine Wildtyp-RK13-Zellpopulation im FACS-Gerät analysiert. Anhand der Lage der Population im FSC/SSC-Plot wurde ein *Gate* gesetzt, um den Anteil vitaler Zellen von unerwünschten toten Zellen und Zelltrümmern abzugrenzen. Die Transfektionsrate der RK13-Zellen konnte dann vor dem Sortieren im FITC/FSC-Plot ermittelt werden (siehe Abbildung 4-7 exemplarisch für die K1L-siRNA). Nach der Sortierung wurde zudem die Reinheit der erhaltenen Positiv- und Negativfraktionen bestimmt (siehe Abbildung 4-8 exemplarisch für die K1L-siRNA). Die Abbildungen 4-7 und 4-8 sind exemplarisch und repräsentativ für den Sortiervorgang der RK13-Zellen.

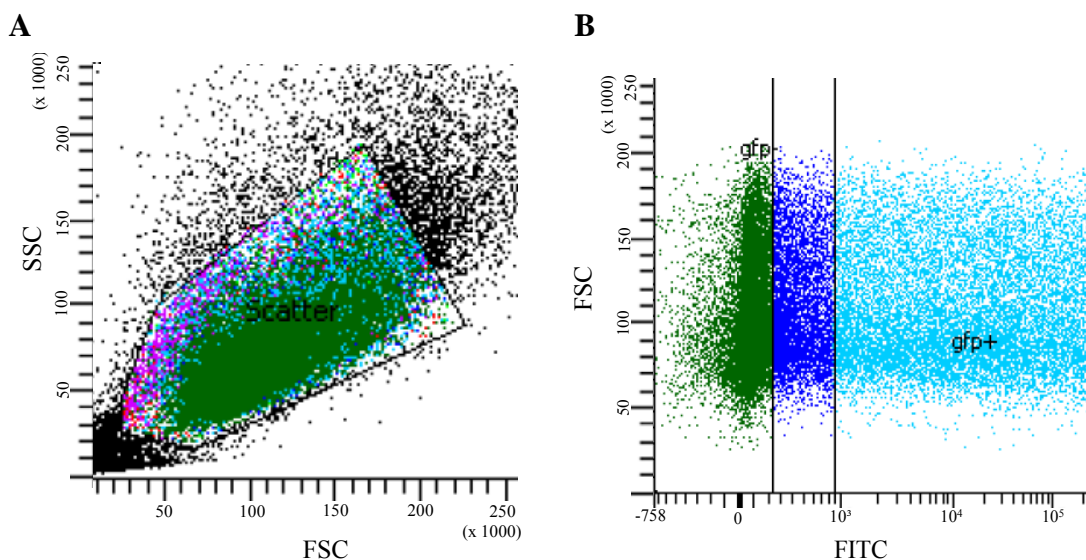


Abbildung 4-7: Die transfizierte RK13-Population vor der Sortierung

Im FSC/SSC-Plot (A) ist die Lage der gesamten Population und des gesetzten *Gates* zu erkennen. Das *Gate* wurde zuvor anhand der Wildtyp-Population gesetzt. Im FITC/FSC-Plot (B) ist der Anteil der mit der K1L-siRNA transfizierten RK13-Zellen (GFP⁺) ersichtlich.

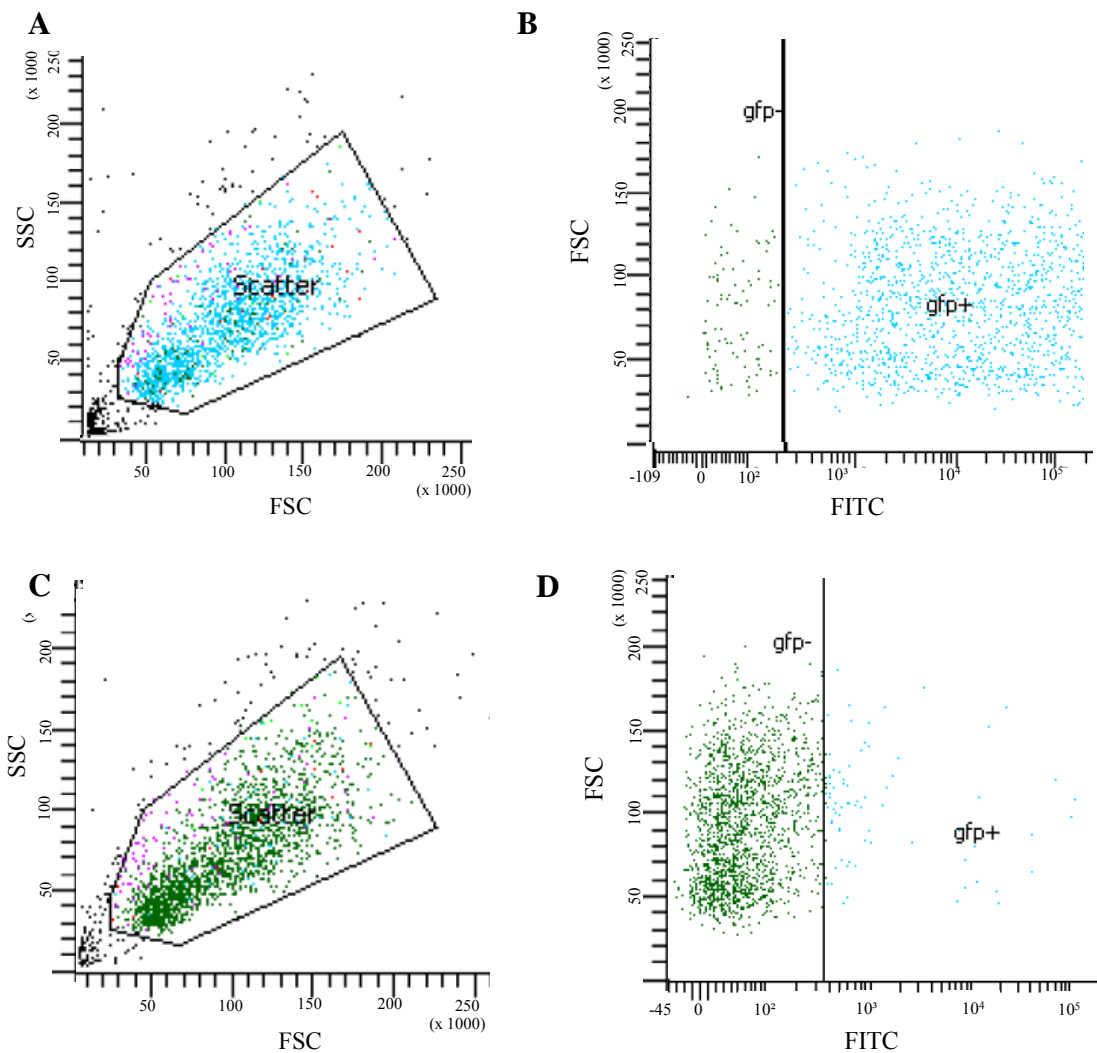


Abbildung 4-8: Verteilung der transfizierten RK13-Population nach der Sortierung

RK13-Zellen wurden mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden für die K1L-siRNA transfiziert und mittels des Plasmid-kodierten GFP sortiert. Dargestellt sind Messungen der (A, B) Positiv- und der (C, D) Negativfraktion. In den FSC/SSC-Plots ist die Lage der sortierten RK13-Zellen zu sehen. In den FITC/FSC-Plots ist der Anteil GFP⁺-RK13-Zellen in der jeweiligen Population zu erkennen.

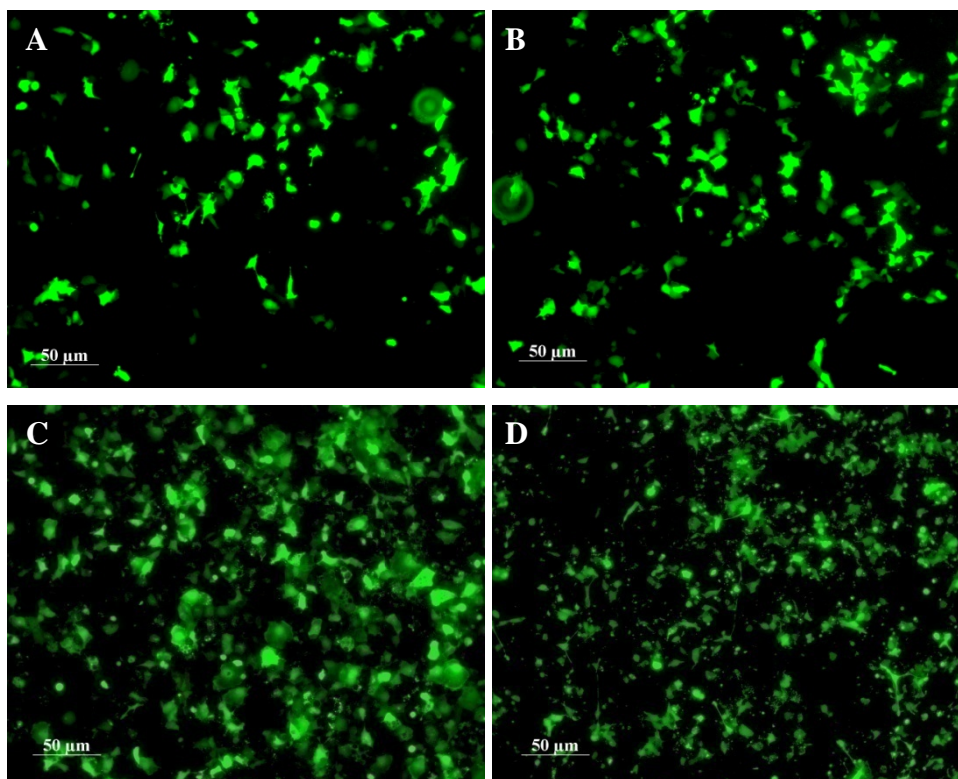
Die erhaltenen positiven Populationen enthielten durchschnittlich 94 % transfizierte RK13-Zellen und der Anteil toter Zellen betrug ungefähr 20-30 %. Insgesamt konnte durch den Sortiervorgang der Anteil transfizierter RK13-Zellen von 28 % bzw. 37 % auf 94 % erhöht werden. Nur 3 % an GFP-positiven Zellen wurden fälschlicherweise in die Negativfraktion sortiert. Tabelle 4-1 gibt einen Überblick über die Transfektionseffizienzen vor und nach dem Sortiervorgang.

Tabelle 4-1: Effizienz der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung

	<u>Vor Sortieren</u>	<u>Nach Sortieren</u>		
	GFP ⁺	Positivfraktion GFP ⁺	Negativfraktion GFP ⁺	Vitalität der Positivfraktion
SC	28 %	94 %	3 %	71 %
K1L	37 %	94 %	3 %	81 %

Die mit der K1L-siRNA transfizierten Zellen waren durchschnittlich besser transfiziert als die mit der SC-siRNA. Nach der Sortierung waren die Transfektionsraten in beiden Populationen vergleichbar (94 %). Abbildung 4-9 zeigt die Transfektionsrate der RK13-Zellen vor und nach der Sortierung. Des Weiteren wiesen die mit der K1L-siRNA transfizierten Zellen eine bessere Vitalität (81 %) auf als die mit der SC-siRNA transfizierten (71 %).

Der Sortiervorgang wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

**Abbildung 4-9: Transfektionseffizienz von RK13-Zellen**

RK13-Zellen wurden mit shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert und einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung unterzogen. Transfektion mit der K1L-siRNA (A) vor und (C) nach der

Sortierung und mit der SC-siRNA (B) vor und (D) nach der Sortierung. Transfizierte Zellen exprimieren ein Plasmid-kodiertes GFP.

4.2.2 *knockdown* von K1L auf RNA-Ebene

Die Auswahl der effizientesten siRNA zum *knockdown* von K1L wurde zunächst auf HEK293T-Zellen durchgeführt, da ohne einen Sortiervorgang (3.2.10) keine ausreichende Transfektionseffizienz der RK13-Zellen erreicht werden konnte. VACV WR besitzt die Host-Range-Gene C7L und K1L (siehe 1.2). Bei einer Replikation in humanen Zellen sind diese beiden *host-range*-Faktoren funktionell äquivalent. Ein siRNA-vermittelter *knockdown* von K1L erzeugt keine Inhibition der Virusreplikation des VACV WR in den HEK293T-Zellen, denn C7L vermittelt weiterhin eine permissive Replikation. Wurde die Genexpression des K1L durch Einsatz der siRNA herunterreguliert, ist dies dennoch auf RNA-Ebene nachweisbar.

Die HEK293T-Zellen wurden wie unter 3.2.6 beschrieben mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden gegen K1L transfiziert und mit VACV WR (MOI 0,1) 48 h später infiziert (3.2.7). Die HEK293T-Zellen wurde 48 h p. i. lysiert und die RNA extrahiert (3.1.7). Es folgte die cDNA-Synthese (3.1.8) und mittels *Real-Time-PCR* (3.1.9) und ddC_T-Methode die Genexpression von K1L relativ zur SC-Kontrolle bestimmt.

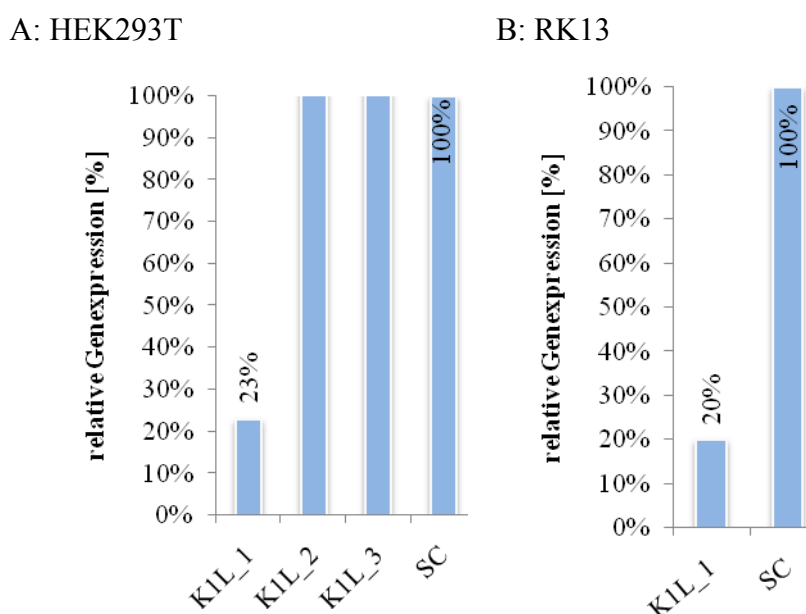


Abbildung 4-10: knockdown von K1L in HEK293T- bzw. RK13-Zellen auf RNA-Ebene

(A) Die Genexpression von K1L nach Transfektion von HEK293T-Zellen mit den drei siRNAs K1L_1, K1L_2, K1L_3 relativ zur SC-Kontrolle. Die Infektion der HEK293T mit VACV WR (MOI 0,1) erfolgte 48 h nach der Transfektion für weitere 48 h. (B) Die Genexpression von K1L in den mit der K1L_1-siRNA transfizierten RK13-Zellen relativ zur SC-Kontrolle. Nach der Sortierung erfolgte die Infektion mit VACV WR (MOI 0,01) für 48 h.

Die K1L_2- und die K1L_3-siRNA erzeugten keinen *knockdown* der K1L-Genexpression. Bei Einsatz der K1L_1-siRNA hingegen war die Genexpression von K1L relativ zur SC-Kontrolle auf 23 % reduziert (Abb. 4-10 A). Das siRNA-basierte System wurde daher mit der K1L_1-siRNA etabliert.

Für die K1L-siRNA wurde die relative Genexpression zusätzlich auf RK13-Zellen untersucht. Nach Transfektion der Zellen mit der K1L_1- bzw. SC-siRNA und dem anschließenden Sortiervorgang konnte eine relative Genexpression von K1L im Vergleich zur SC-Kontrolle von 20 % erreicht werden (Abb. 4-10 B). Die K1L_1-siRNA führte somit in den HEK293T- und den RK13-Zellen zu einer vergleichbaren Reduktion der Genexpression von K1L.

4.2.3 Inhibition der Replikation des Vacciniavirus *Western Reserve*

Der *host-range*-Faktor K1L ist essentiell für eine permissive Replikation von Vacciniavirus (VACV) WR in RK13-Zellen. Bei Deletion des K1L ist in den RK13-

Zellen keine Virusreplikation mehr nachweisbar. Mittels IFA, Plaque-Titrationstest und Impedanzanalyse wurde der Effekt der K1L_1-siRNA auf die Replikation des VACV WR in RK13-Zellen untersucht.

Indirekter IFA

Im indirekten IFA (3.2.8) wurden die infizierten RK13-Zellen mit einem anti-VACV-Antikörper detektiert und mit einem Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper rot angefärbt. In Abbildung 4-11 sind die IFA-Ergebnisse für die sortierten RK13-Zellen dargestellt.

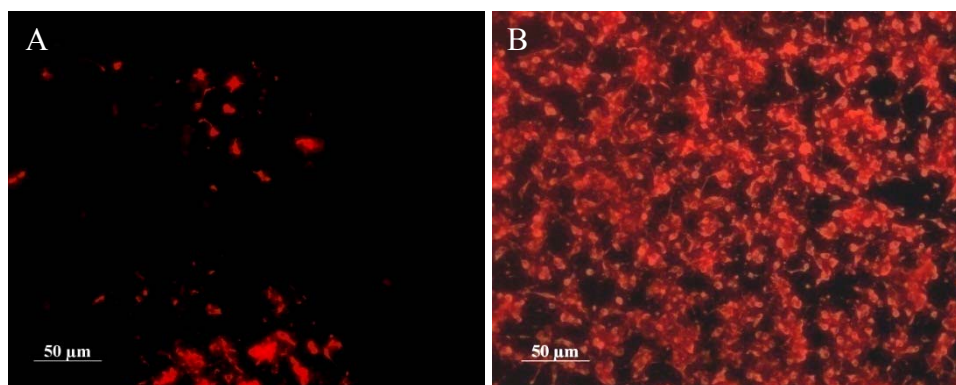


Abbildung 4-11: Indirekter IFA infizierter RK13-Zellen

RK13-Zellen wurden mit der (A) K1L-siRNA und der (B) SC-siRNA transfiziert und in einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung transfizierte RK13-Zellen angereichert. Nach 16 h erfolgte die Infektion mit VACV WR (MOI 0,1). 48 h p. i. wurden die RK13-Zellen für den IFA fixiert. Rot: infizierte RK13-Zellen.

Vergleicht man die Infektion der transfizierten Zellen mit dem VACV WR (Abbildung 4-11 A für die K1L-siRNA und B für die SC-siRNA), ist eine deutliche Inhibition der Virusreplikation durch den Einsatz der K1L-siRNA zu erkennen. In der mit der SC-siRNA transfizierten Population scheinen annähernd 100 % der RK13-Zellen infiziert zu sein. Bei der mit der K1L-siRNA transfizierten Population hingegen konnte sich die Infektion des VACV WR nicht derart manifestieren. Deutlich zu sehen sind auch einzelne Zellen, die zwar infiziert wurden, von denen ausgehend sich die Infektion aber nicht weiter ausbreiten konnte. Im IFA konnte eine K1L-siRNA-vermittelte Inhibition der Virusreplikation von VACV WR nachgewiesen werden.

Plaque-Titrationstest

Aufgrund der geringen Ausbeute an transfizierten RK13-Zellen nach dem Sortiervorgang, wurden im Fall der RK13-Zellen statt aufgeschlossener Zellen die Kulturüberstände 48 h p. i. in den Plaque-Titrationstest (3.2.9) eingesetzt. In Abbildung 4–12 sind exemplarisch zur Verdeutlichung des Unterschieds im Virustiter die ersten drei Verdünnungsstufen abgebildet. In den Kulturüberständen der mit der K1L-siRNA transfizierten RK13-Population (Abb. 4-12 A) war schon die zweite Verdünnungsstufe auszählbar, während dies in den Überständen der SC-Kontrolle (Abb. 4-12 B) erst bei einer größeren Verdünnung möglich war.

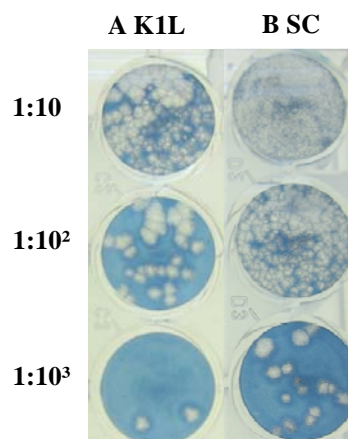


Abbildung 4-12: Plaque-Titrationstest mit RK13-Zellkulturüberständen

RK13-Zellen wurden mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert und einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung unterzogen. Nach 16 h erfolgte die Infektion mit VACV WR (MOI 0,01). 48 h p. i. wurden die Kulturüberstände der RK13-Zellen in den Plaque-Titrationstest auf Vero-Zellen eingesetzt. Gezeigt sind die ersten drei Verdünnungsstufen. Transfektion mit der (A) K1L-siRNA und der (B) SC-siRNA.

Abbildung 4-13 stellt die Ergebnisse der Plaque-Titrationstests für die sortierten RK13-Zellen grafisch dar. Der Virustiter im Kulturüberstand der mit K1L-siRNA transfizierten Zellen ist relativ zu dem Virustiter im Überstand der SC-Kontrolle angegeben. Analysiert wurde die Inhibition der Virusreplikation von VACV WR bei MOI 0,01 und MOI 0,1.

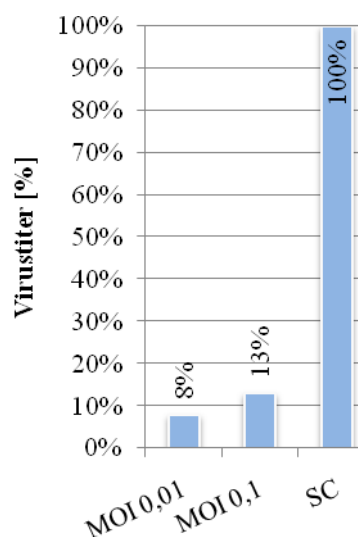


Abbildung 4-13: Inhibition der Replikation von VACV WR

Dargestellt sind die Verhältnisse der Virustiter in den Kulturüberständen der mit der K1L-siRNA transfizierten RK13-Zellen bezogen auf die SC-Kontrolle. Die Infektion mit VACV WR MOI 0,01 und MOI 0,1 erfolgte für 48 h.

Anhand der Ergebnisse des Plaque-Titrationstestes lässt sich eine Inhibition der Produktion infektiöser Partikel in den Zellkulturüberständen der mit der K1L-siRNA transfizierten RK13-Zellen nachweisen. Sowohl bei einer Infektion mit VACV WR MOI 0,01 als auch bei einer MOI 0,1 ließ sich die Virusreplikation relativ zur SC-Kontrolle auf 8 % bzw. 13 % reduzieren.

4.2.4 Impedanzmessung

Die RK13-Zellen wurden direkt nach dem Sortiervorgang (3.2.10) in die Kavitäten der *E-Plate* ausgesät und im xCELLigence™-Gerät (3.2.11) analysiert. Die Infektion (3.2.7) erfolgte zum gleichen Zeitpunkt wie parallel durchgeführt in der konventionellen 96-Kavitäten-Zellkulturplatte und ist in Abb. 4-14 anhand der vertikalen Linie (22 h nach dem Aussäen) zu erkennen. Der CI wurde in Abständen von 10 min über einen Zeitraum von 5 Tagen aufgezeichnet und zum Zeitpunkt der Infektion normalisiert (3.2.11). In Abbildung 4-13 wurde der normalisierte CI gegen die Zeit aufgetragen.

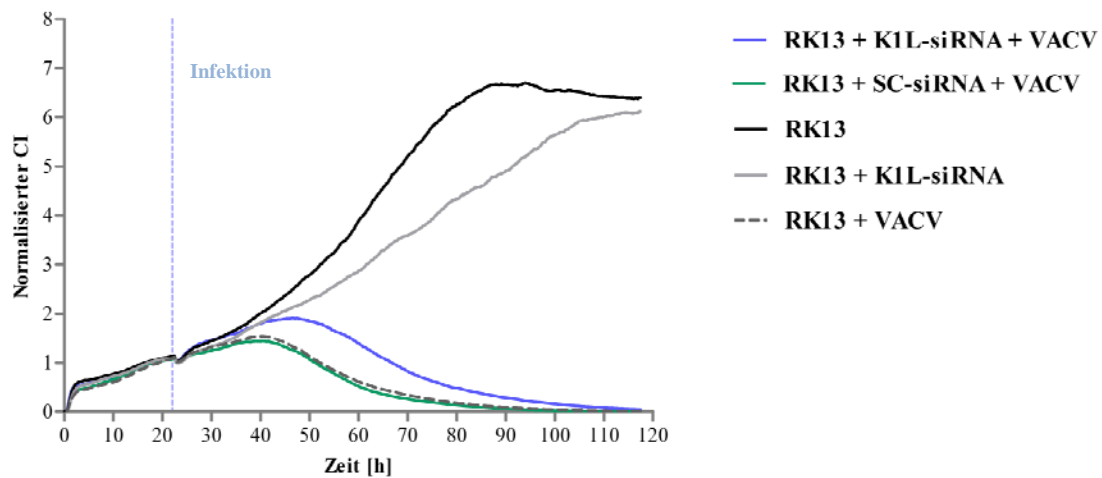


Abbildung 4-14: Impedanzanalyse von sortierten, infizierten RK13-Zellen

Die sortierten RK13-Zellen wurden nach dem Sortieren in die *E-Plate* ausgesät und nach 16 h mit VACV WR (MOI 0,01) infiziert. Dargestellt sind mit K1L- und SC-siRNA transfizierte RK13-Zellen, nur transfizierte (GFP⁺), nur infizierte RK13-Zellen (GFP⁻) und nicht transfizierte, nicht infizierte RK13-Zellen (GFP).

Bei den unbehandelten Zellen handelt es sich um ebenfalls sortierte RK13-Zellen der Negativfraktion, die nicht transfiziert und nicht infiziert wurden. Die Transfektion macht sich im CI der Zellen kaum bemerkbar („RK13-Zellen + K1L-siRNA“ in Abbildung 4-13). Die nur infizierten RK13-Zellen haben mit der SC-Kontrolle vergleichbare CI. Bei einer Infektion mit VACV WR MOI 0,01 ist der aufgezeichnete CI für die mit der K1L-siRNA transfizierten Zellen größer als der der SC-Kontrolle. Bei der Impedanzmessung ist die durch Einsatz der K1L-siRNA verminderte VACV WR-Replikation anhand des höheren CI im Vergleich zur SC-siRNA zu erkennen.

4.2.5 Zusammenfassung

In den RK13-Zellen konnte durch die Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung eine Anreicherung der transfizierten Zellen auf 94 % erreicht werden. Auf RNA-Ebene ergab sich für die K1L-siRNA eine zur SC-Kontrolle relative K1L-Genexpression von 20 %. Die Inhibition der Replikation des VACV konnte im indirekten IFA gezeigt werden. Weiterhin konnte im Plaque-Titrationstest eine MOI-abhängige Reduktion der Virusreplikation relativ zur SC-Kontrolle auf 8 % bzw. 13 % nachgewiesen werden. In

der Impedanzanalyse der RK13-Zellen wurde die siRNA-vermittelte Inhibition des VACV WR reproduziert.

4.3 siRNA-vermittelter *knockdown* von CP77 in CHO-K1-Zellen

4.3.1 Transfektion von CHO-K1-Zellen

Die Effizienz der Transfektion mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden war in den CHO-K1-Zellen verglichen mit den HEK293T-Zellen (4.1.2) und den sortierten RK13-Zellen (4.2.3) deutlich geringer (siehe Abbildung 4-15). Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte lediglich eine Transfektionsrate von ca. 40 % erzielt werden (Schätzung durch Zählen transfizierter und nicht-transfizierter Zellen in einem definierten Bereich der Population). Eine alternative Verwendung des Transfektionsreagenz Lipofectamin™2000 (Invitrogen) erzeugte nochmals schlechtere Transfektionsraten und einen starken cytotoxischen Effekt. In einer Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (3.2.10) konnten transfizierte CHO-K1-Zellen angereichert werden. Nach dem Sortierprozess wiesen die CHO-K1-Zellen der Positivfraktion jedoch nur noch eine Vitalität von 20 % auf und konnten nicht mehr kultiviert werden.

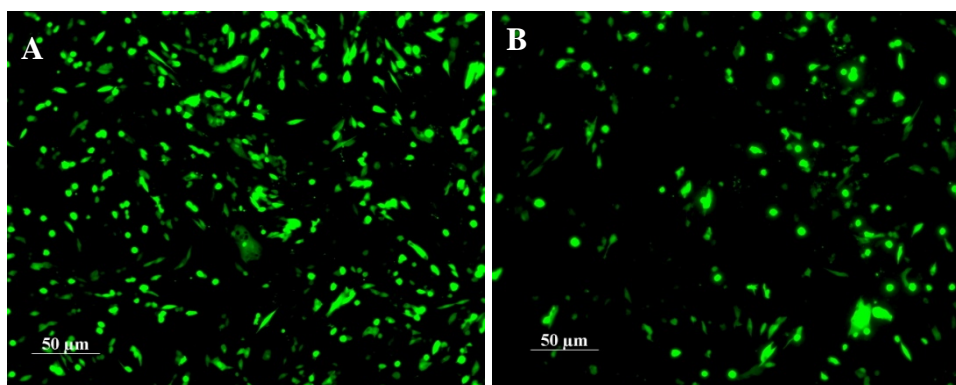


Abbildung 4-15: Transfektion von CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit der (A) CP77-siRNA und der (B) SC-siRNA für 36 h transfiziert. Transfizierte Zellen exprimieren ein Plasmid-kodiertes GFP.

4.3.2 *knockdown* von CP77 auf RNA-Ebene

Zur Auswahl der den besten *knockdown* erzeugenden CP77-siRNA wurden CHO-K1-Zellen mit den drei shRNA-exprimierenden Plasmiden transfiziert (3.2.6), nach 36 h mit

CPXV BR MOI 0,1 infiziert und 24 h p. i. die Zellen geerntet (3.2.7). Es folgte eine RNA-Extraktion (3.1.7) und die cDNA-Synthese (3.1.8). Abbildung 4-16 stellt die Ergebnisse der anschließenden *Real-Time-PCR* (3.1.9) grafisch dar. Zur Bestimmung der zur SC-Kontrolle relativen Genexpression von CP77 wurde die ddC_T-Methode angewendet.

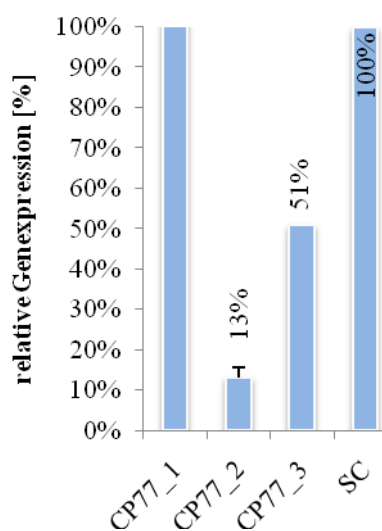


Abbildung 4-16: knockdown von CP77 in CHO-K1-Zellen auf RNA-Ebene

Die Genexpression von CP77 nach Transfektion von CHO-K1-Zellen mit den drei siRNAs CP77_1, CP77_2 und CP77_3 relativ zu SC-siRNA transfizierten Zellen. Nach 36 h wurden die CHO-K1-Zellen mit CPXV BR (MOI 0,1) für 24 h infiziert. Die Transfektion mit der CP77_2-siRNA und der SC-siRNA erfolgte in einer Doppelbestimmung.

Die CP77_1-siRNA erzeugte keinen *knockdown* der Genexpression von CP77. Die CP77_3-siRNA reduzierte die CP77-Genexpression auf 51 %. Die CP77_2-siRNA vermittelte in den CHO-K1-Zellen den effizientesten *knockdown* der CP77-Genexpression. Verglichen mit der CP77-Genexpression in den mit der SC-siRNA transfizierten CHO-K1-Zellen wurde CP77 hier nur noch zu 13 % exprimiert. Diese CP77-siRNA wurde daher zur weiteren Etablierung des siRNA-basierten Systems zum *knockdown* von CP77 in CHO-K1-Zellen verwendet.

4.3.3 Inhibition der Replikation des Kuhpockenvirus *Brighton Red*

Das Kuhpockenvirus (CPXV) verfügt über die drei *host-range*-Faktoren K1L, C7L und CP77. Hiervon ist CP77 essentiell für eine permissive Infektion von CHO-Zellen. Bei

einer Deletion des CP77 kann keine Virusreplikation in CHO-Zellen nachgewiesen werden (siehe 1.2).

Der Effekt der CP77-siRNA auf die Replikation des CPXV BR in CHO-K1-Zellen wurde in einem IFA, einem Plaque-Titrationstest und einer Impedanalanalyse untersucht.

Indirekter IFA

Der indirekte IFA von CHO-K1-Zellen zeigte in einem Experiment eine Inhibition der Replikation von CPXV BR in der mit der CP77-siRNA transfizierten Zellpopulation im Vergleich zur SC-Kontrolle. Die Zellen wurden mit MOI 0,1 für 24 h infiziert (3.2.7). In einem IFA (3.2.8) erfolgte die Detektion infizierter CHO-K1-Zellen mit einem polyklonalen anti-VACV-Primärantikörper und deren Anfärbung über einen Cy3-gekoppelten Sekundärantikörper (Abbildung 4-17 A CP77-siRNA, B SC-siRNA).

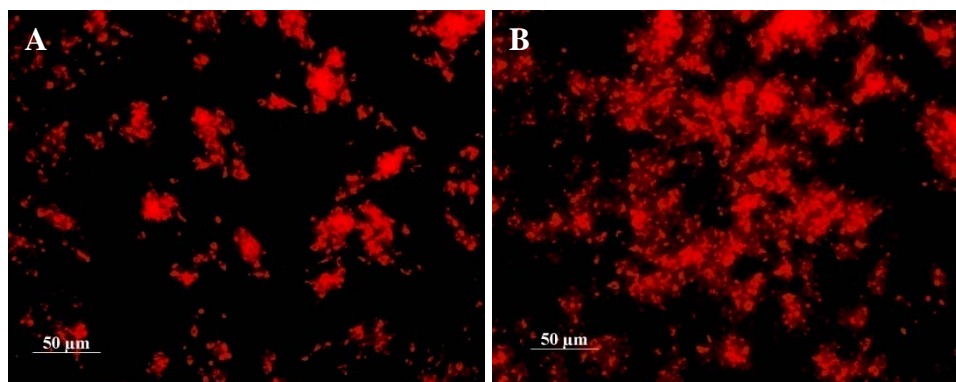


Abbildung 4-17: Indirekter IFA infizierter CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden für 36 h mit der (A) CP77-siRNA und der (B) SC-siRNA transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten CHO-K1-Zellen mit CPXV BR (MOI 0,1) infiziert. Die Fixierung der CHO-K1-Zellen erfolgte 24 h p. i. Rot: infizierte CHO-K1-Zellen.

In der mit der CP77-siRNA transfizierten CHO-Population (Abb. 4-17 A) ist die Infektion mit CPXV BR nicht so großflächig wie in der SC-Kontrolle, es kann hier eine verminderte Virusreplikation durch Einsatz der CP77-siRNA vermutet werden. Dieses Ergebnis konnte jedoch in vier nachfolgenden Experimenten nicht reproduziert werden.

Plaque-Titrationstest und Impedanalanalyse

CHO-K1-Zellen wurden mit der CP77- und der SC-siRNA transfiziert und nach 36 h mit dem CPXV BR (MOI 0,1) infiziert. 24 h p. i. wurden die Zellen trypsiniert und

durch mehrfaches Einfrieren und Tauen aufgeschlossen. Bei der anschließenden Zentrifugation wurden die Zelltrümmer entfernt und der Überstand in den Plaque-Titrationstest (3.2.9) auf Vero-Zellen eingesetzt und in einer Impedanzmessung analysiert.

Es konnte keine Inhibition der Virusreplikation durch Einsatz der CP77-siRNA nachgewiesen werden.

4.3.4 Zusammenfassung

In den CHO-K1-Zellen konnte durch den Einsatz der CP77-siRNA ein *knockdown* der Genexpression von CP77 auf $13 \% \pm 2 \%$ im Vergleich zur SC-Kontrolle erreicht werden. Im indirekten IFA konnte die Inhibition der Replikation von CPXV BR gezeigt, jedoch nicht reproduziert werden. Im Plaque-Titrationstest sowie mittels Impedanzanalyse konnte keine Inhibition der Virusreplikation nachgewiesen werden.

4.4 *host-range*-Effekte in Dubca-Zellen

Die Infektion von Dubca-Zellen mit CMLV CP-19 stellt ein gutes Modellsystem zur homologen Infektion von Menschen mit VARV dar. Der gezielte *knockdown* der *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 in Dubca-Zellen soll weitere Untersuchungen der Virus-Wirt-Interaktion in diesem Modellsystem ermöglichen.

In den Dubca-Zellen wurde zunächst die Permissivität der Replikation der drei Virusstämme CMLV CP-19, VACV WR und CPXV BR untersucht. Anschließend wurde die Funktionalität der drei etablierten siRNA-basierten Systeme zum *knockdown* der Genexpression von C7L, K1L und CP77 auf dieser Zelllinie analysiert.

4.4.1 Permissivität von Dubca-Zellen

Die Infektion (3.2.7) erfolgte für jeden der drei Virusstämme CMLV CP-19, CPXV BR und VACV WR mit MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 0,5 und MOI 1. In einem indirekten IFA (3.2.8) wurden 24 h p. i. infizierte Zellen angefärbt. Dubca-Zellen erwiesen sich als permissiv für Infektionen mit allen drei Virusstämmen.

Bei einer Infektion mit VACV war der cytopathische Effekt (CPE) besonders deutlich. Bei einer CPXV-Infektion fiel dieser geringer aus und bei einer Infektion der Dubca-Zellen mit dem CMLV CP-19 trat auch bei hohen MOI kaum ein CPE auf. Die verzögerte Replikation von CMLV im Vergleich zu VACV und CPXV stimmt mit den Beobachtungen überein, die bei Infektion von HEK293T-Zellen gemacht wurden.

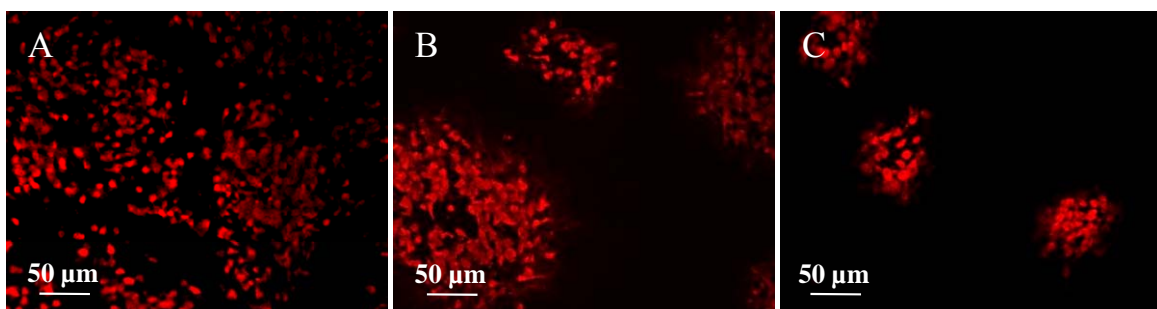


Abbildung 4-18: Permissivität von Dubca-Zellen
Infizierte Dubca-Zellen (rot) 24 h nach einer Infektion mit (A) CMLV CP-19 MOI 0,5, (B) VACV WR MOI 0,1 und (C) CPXV BR MOI 0,1.

4.4.2 Effizienz der siRNAs in Dubca-Zellen

Um die unter 4.1, 4.2 und 4.3 beschriebenen siRNA-basierten Systeme auf der Dubca-Zelllinie zu untersuchen, wurden diese zunächst mit den drei shRNA-exprimierenden Plasmiden und der SC-Kontrolle transfiziert (3.2.6). Abbildung 4-19 stellt exemplarisch die Transfektionseffizienz für die C7L-siRNA (A) und die SC-siRNA (B) dar. Nach einer Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte eine Transfektionsrate von ca. 70 % erzielt werden.

Es folgte die Infektion (3.2.7) mit den drei Virusstämmen CMLV CP-19 (MOI 0,1 und 0,5), VACV WR (MOI 0,1 und 0,01) und CPXV BR (MOI 0,1 und 0,5). 24 h p. i. wurden infizierte Zellen in einem IFA (3.2.8) angefärbt. Der Anteil infizierter Dubca-Zellen war nach der Transfektion sehr gering (Abbildung 4-17). Dies galt für alle siRNAs einschließlich der SC-Kontrolle und für alle drei Virusstämme.

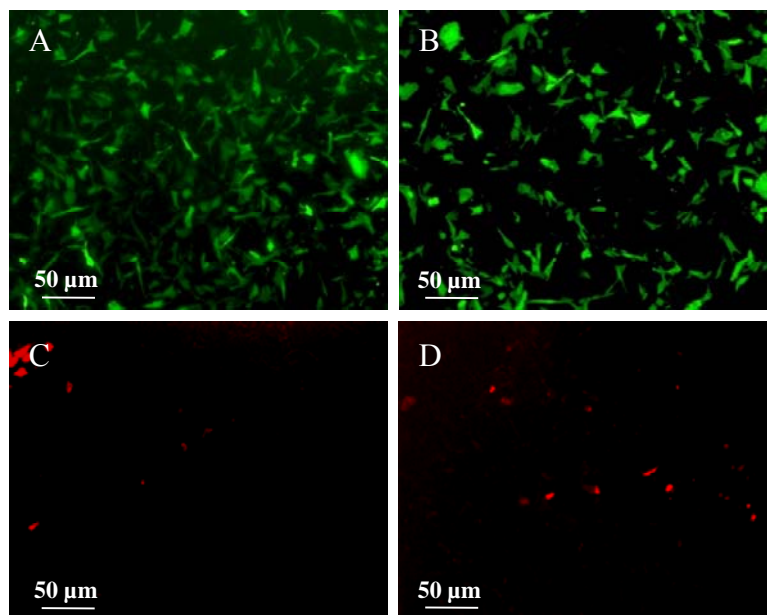


Abbildung 4-19: Transfektion und Infektion von Dubca-Zellen

Dubca-Zellen wurden für 24 h mit der (A) C7L-siRNA und der (B) SC-siRNA transfiziert. Transfizierte Dubca-Zellen exprimieren ein Plasmid-kodiertes GFP. Anschließend erfolgte die Infektion mit CMLV CP-19 (MOI 0,5) und 24 h p. i. die Fixierung der Dubca-Zellen für den IFA. Rot: infizierte Zellen in der mit der (C) C7L-siRNA und der (D) SC-siRNA transfizierten Population.

Es wurde daher die Infektion von SC-siRNA transfizierten und nicht-transfizierten Dubca-Zellen miteinander verglichen. 24 h nach der Transfektion folgte die Infektion

exemplarisch mit CPXV BR (MOI 0,01). 48 h p. i. und 96 h p. i. wurde der Kulturüberstand abgenommen und die Zellen trypsiniert. In einem mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgang wurden die Dubca-Zellen aufgeschlossen und die Zelltrümmer durch Zentrifugation entfernt. Die Virustiter im Kulturüberstand und in dem Überstand der aufgeschlossenen Dubca-Zellen wurden in einem Plaque-Titrationstest (3.2.9) 48 h p. i. und 96 h p. i. bestimmt. Abbildung 4-20 gibt den Virustiter in den mit der SC-siRNA transfizierten Dubca-Zellen und den dazugehörigen Kulturüberständen relativ zum Virustiter in der nicht-transfizierten Population an.

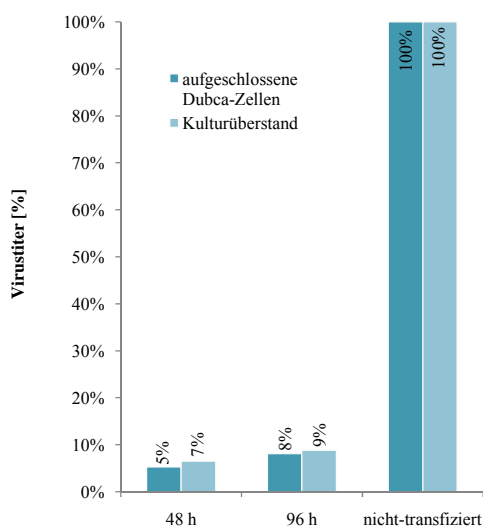


Abbildung 4-20: Virustiter in transfizierten Dubca-Zellen

Dargestellt sind die Verhältnisse der Virustiter der aufgeschlossenen Dubca-Zellen (dunkelblau) und der Kulturüberstände (hellblau) nach Transfektion mit der SC-siRNA relativ zum Virustiter in nicht-transfizierten Dubca-Zellen. 24 h nach der Transfektion erfolgte die Infektion mit CPXV BR (MOI 0,01) für 48 h und 96 h.

Der Virustiter war sowohl in den mit der SC-siRNA transfizierten Dubca-Zellen als auch in deren Kulturüberständen relativ zu den nicht-transfizierten Dubca-Zellen drastisch reduziert. 96 h nach der Infektion war der Virustiter in den aufgeschlossenen Dubca-Zellen um 92 % und im Kulturüberstand um 91 % geringer als bei nicht-transfizierten Dubca-Zellen.

Bei transfizierten Dubca-Zellen im Vergleich zu unbehandelten fand eine weitaus geringere Infektion statt. Zudem wurden auch kaum Viruspartikel in den Überstand abgegeben. Da nach einer Transfektion keine ausreichende Infektion mehr erzielt

werden konnte, konnte die Effizienz der siRNAs zur Inhibition der Virusreplikation in der Dubca-Zelllinie nicht ermittelt werden.

4.4.3 Zusammenfassung

Dubca-Zellen erwiesen sich als permissiv für die Infektion mit CMLV CP-19, VACV WR und CPXV BR. In Dubca-Zellen konnte eine Transfektionsrate von ca. 70 % erzielt werden. Nach der Transfektion war jedoch keine effiziente Infektion mehr möglich.

4.5 *host-range*-Effekte in NIH/3T3-Zellen

Bei NIH/3T3-Zellen handelt es sich um embryonale Mausfibroblasten (2.5). Sie dienen als Repräsentanten für die Gruppe der Nagetiere, die nach derzeitigem Erkenntnisstand das Hauptreservoir für Kuhpocken bilden (siehe 1.2). Kuhpockenviren verfügen über ein breites Wirtsspektrum und können zoonotische Erkrankungen beim Menschen verursachen.

4.5.1 Permissivität von NIH/3T3-Zellen

Zunächst wurde die Permissivität der Replikation der drei Virusstämme CMLV CP-19, VACV WR und CPXV BR in NIH/3T3-Zellen untersucht.

Die NIH/3T3-Zellen wurden mit den drei Virusstämmen jeweils mit MOI 0,01, MOI 0,1, MOI 0,5 und MOI 1 infiziert (3.2.7). 24 h p. i. wurden die Zellen fixiert und in einem IFA infizierte NIH/3T3-Zellen angefärbt (3.2.8). Das Ergebnis ist in Abbildung 4-21 zu sehen. NIH/3T3-Zellen sind permissiv für die Replikation der genannten Virusstämme. Bei MOI 1 waren 24 h p. i. annähernd 100 % aller NIH/3T3-Zellen infiziert (nicht dargestellt). Ein CPE trat bei den NIH/3T3-Zellen nur bei einer Infektion mit CPXV auf.

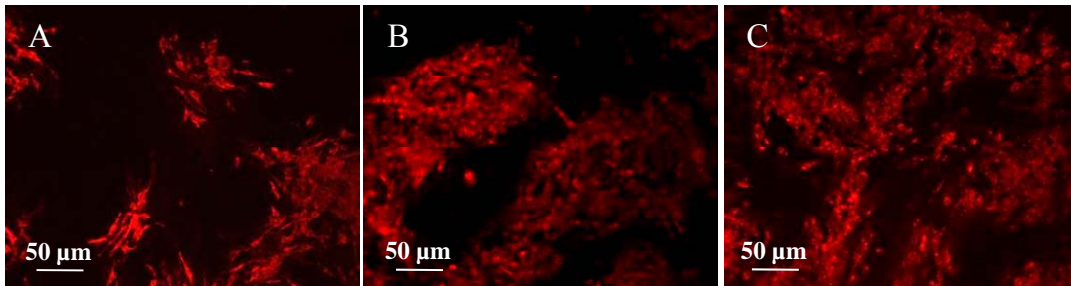


Abbildung 4-21: Permissivität von NIH/3T3-Zellen

Infizierte NIH/3T3-Zellen (rot) 24 h nach einer Infektion mit (A) CMLV CP-19 MOI 0,1, (B) VACV WR MOI 0,1 und (C) CPXV BR MOI 0,1.

4.5.2 Effizienz der siRNAs in NIH/3T3-Zellen

Um die Effizienz der siRNAs auf den NIH/3T3-Zellen zu untersuchen, wurden diese mit den drei siRNAs C7L_2 (4.1.1), K1L_1 (4.2.1), CP77_2 (4.3.1) und der SC-siRNA transfiziert. Die Transfektionseffizienz der NIH/3T3-Zellen ist exemplarisch in Abbildung 4-22 dargestellt. Nach Optimierung der Transfektionsbedingungen konnte eine Transfektionsrate von ca. 60 % erreicht werden.

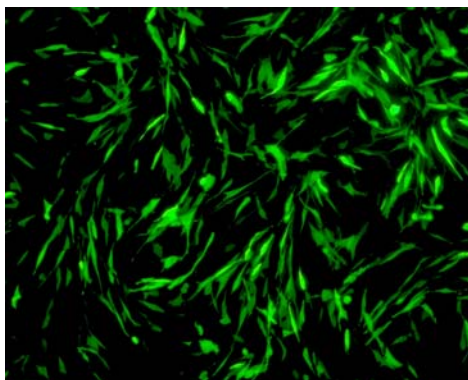


Abbildung 4-22: Transfektionseffizienz der NIH/3T3-Zellen

NIH/3T3-Zellen wurden für 24 h mit der SC-siRNA transfiziert. Erfolgreich transfizierte NIH/3T3-Zellen exprimieren ein Plasmid-kodiertes GFP.

Es folgte die Infektion mit dem jeweiligen Virusstamm (CMLV CP-19, VACV WR, CPXV BR) mit MOI 0,5. Die Zellen wurden lysiert, die RNA extrahiert und als cDNA (3.1.8) in die *Real-Time*-PCR (3.1.9) eingesetzt. Mithilfe der ddC_T-Methode wurde die zur SC-Kontrolle relative Genexpression der *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 ermittelt. Abbildung 4-23 stellt die Ergebnisse der *Real-Time*-PCR dar.

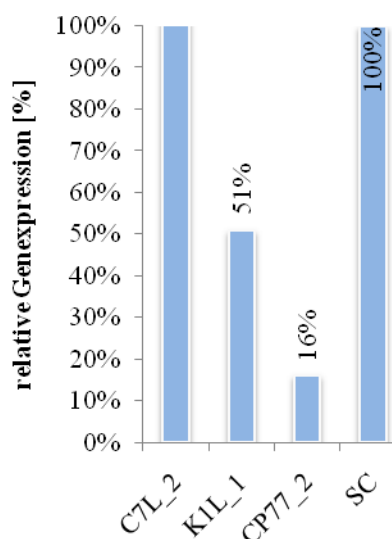


Abbildung 4-23: C7L-, K1L- und CP77-knockdown auf RNA-Ebene in NIH/3T3-Zellen

NIH/3T3-Zellen wurden für 24 h mit C7L-, K1L-, CP77- und SC-siRNA transfiziert und anschließend mit CPXV BR (MOI 0,5) infiziert. 24 h p. i. wurden die NIH/3T3-Zellen lysiert. Nach RNA-Extraktion und cDNA-Synthese wurde in einer *Real-Time-PCR* die Genexpression der *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 relativ zur jeweiligen SC-Kontrolle bestimmt.

Die K1L-siRNA und die CP77-siRNA können in den NIH/3T3-Zellen zur Reduktion der Genexpression von K1L auf 51 % und von CP77 auf 16 % eingesetzt werden. Die C7L-siRNA hingegen führt nicht zu einer verminderten Genexpression von C7L in den NIH/3T3-Zellen.

4.5.3 Inhibition der Virusreplikation in NIH/3T3-Zellen

Eine siRNA-vermittelte Inhibition der Replikation von CMLV CP-19, VACV WR und CPXV BR konnte in den NIH/3T3-Zellen weder mittels eines IFA, noch per Impedanzanalyse nachgewiesen werden.

4.5.4 Zusammenfassung

Die Infektion von NIH/3T3-Zellen mit CMLV CP-19, CPXV BR und VACV WR war permissiv. In den NIH/3T3-Zellen konnte eine Transfektionsrate von ca. 60 % erzielt werden. Auf RNA-Ebene wurde eine siRNA-vermittelte Reduktion der Genexpression

von K1L auf 51 % und von CP77 auf 16 % erzielt. Es konnte jedoch keine Inhibition der Replikation von VACV WR und CPXV BR nachgewiesen werden.

5 Diskussion

Zur Untersuchung der Mechanismen, die den Wirtstropismus von Pockenviren auf zellulärer Ebene determinieren, wurden siRNA-basierte Systeme zum selektiven *knockdown* von *host-range*-Genen etabliert.

5.1 siRNA-basierte Systeme zur Analyse von *host-range*-Faktoren

Eine einfache und schnelle Methode zum Abschalten einzelner Gene ist die RNA-Interferenz. Sie findet in der Forschung breite Anwendung und wurde in einer aktuellen Publikation zur Inhibition der Replikation des OPV MPXV verwendet. Mittels 48 synthetischer siRNAs wurden zwei potentielle Zielgene im MPXV-Genom als limitierend für die Replikation identifiziert und die MPXV-Replikation siRNA-vermittelt auf 5 - 35 % reduziert (Alkhalil *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurden 9 siRNAs zur gezielten Inhibition der Genexpression der *host-range*-Gene C7L, K1L und CP77 eingesetzt, denen bei bestimmten Viren eine essentielle Funktion in der Vermittlung einer permissiven Replikation in den verwendeten Zelllinien zugeschrieben wird (siehe 1.2). Die Transfektion der Zelllinien erfolgte mit shRNA-exprimierenden Plasmiden. Bei Einsatz eines Expressionsplasmides werden die siRNAs kontinuierlich synthetisiert und weisen so eine konstante Verfügbarkeit in den Zellen auf. Ein Plasmid-kodiertes GFP ermöglicht zudem die Kontrolle der Transfektionseffizienz und bei ungenügender Transfektionsrate zusätzlich eine Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung. Auf diesem Weg konnte die Bildung infektiöser Partikel von CMLV CP-19 und VACV WR auf 8 % bzw. 18 % reduziert werden. Die siRNA-basierten Systeme bieten einen selektiven und virus-unabhängigen *knockdown* der Expression der *host-range*-Gene. Eine siRNA gegen einen *host-range*-Faktor kann für jeden Virusstamm und in verschiedenen Zelllinien zur Untersuchung des Wirtstropismus eingesetzt werden. Dies bedeutet einen großen Vorteil gegenüber der arbeits- und zeitintensiven Erzeugung von Deletionsmutanten (Staib & Sutter 2003). Für jedes Pockenvirus und jeden zu untersuchenden *host-range*-Faktor müsste eine einzelne Deletionsmutante generiert werden.

Für das Erzeugen eines effektiven *knockdowns* des Ziel-Gens ist eine gute Transfektionsrate der Zellen mit den shRNA-exprimierenden Plasmiden essentiell.

Andernfalls steht die siRNA in der Zellpopulation nicht in ausreichender Menge zur Verfügung.

Bei den HEK293T-Zellen konnte eine ausreichende Transfektionseffizienz von ca. 85 % erreicht werden. Die Sortierung der RK13-Zellen bedeutete einen zusätzlichen Arbeitsaufwand und wies eine geringe Ausbeute auf. Dennoch konnten hierdurch die transfizierten RK13-Zellen in der verwendeten Population auf 94 % angereichert werden. Zu berücksichtigen ist hier, dass während des Ablaufes von Transfektion und nachfolgender Infektion vier Populationen entstehen: nur transfizierte Zellen, nur infizierte Zellen, nicht-transfizierte nicht-infizierter Zellen und transfizierte infizierte Zellen. In nur infizierten Zellen replizieren die Viren ungehindert. Dies erhöht den Anteil an Kopien des C7L-Gens relativ zum Referenzgen cMyc. Die tatsächliche Reduktion der Genexpression durch den Einsatz der siRNA ist demnach etwas stärker als die errechneten Werte für den *knockdown* von C7L und K1L, denn nicht-transfizierte und nicht-infizierte Zellen verfälschen das Ergebnis.

In den CHO-K1-Zellen konnte auf RNA-Ebene ein siRNA-vermittelter *knockdown* von CP77 auf $13 \% \pm 2 \%$ erzielt werden. Es konnte somit gezeigt werden, dass die CP77-siRNA effektiv an die Zielsequenz bindet. Eine starke Ausbildung von Sekundärstrukturen in der Ziel-RNA oder ein Binden der CP77-RNA an zell-spezifische Transkripte, welche die Effizienz der siRNA beeinträchtigen können, wurden somit ausgeschlossen. Dennoch konnte keine siRNA-vermittelte Inhibition der Replikation von CPXV BR nachgewiesen werden. Grund hierfür ist die geringe Transfektionseffizienz der CHO-K1-Zellen von geschätzten 40 %. Hierdurch entsteht eine vergleichsweise kleine Population an transfizierten CHO-K1-Zellen, die gleichzeitig infiziert wurden. Insbesondere gilt dies bei der eingesetzten MOI 0,01, bei der theoretisch nur 1 % der Zellen infiziert werden. Die Infektion mit einer höheren MOI erzeugte ebenfalls keine Inhibition der CPXV-Replikation, sondern führte lediglich zu einem Absterben der CHO-K1-Zellen und somit zu einer Reduktion der Kopienzahl des Referenzgens cMyc. Um die Transfektionsrate der CHO-K1-Zellen zu erhöhen, wurde als alternatives Transfektionsreagenz Lipofectamine™ 2000 eingesetzt. Die Transfektionseffizienz war jedoch erheblich schlechter und der cytotoxische Effekt nicht tolerierbar. In eine Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung reduzierte sich die Vitalität der CHO-K1-Zellen auf 20 %, sodass eine weitere Kultivierung sortierter

CHO-K1-Zellen nicht gelang. Demnach muss für einen siRNA-vermittelten *knockdown* von CP77 zunächst durch Einsatz geeigneter Methoden eine bessere Transfektionsrate der CHO-K1-Zellen erzielt werden.

Kritische Parameter der siRNA-basierten Systeme sind der Zeitraum zwischen der Transfektion und der Infektion bzw. der Zeitraum der Infektion bis zur Ernte der Zellen. Zu starkes Zellwachstum in einer Kavität kann die siRNA-vermittelten Effekte überlagern. cMyc dient bei der Untersuchung der siRNA-vermittelten Effekte auf RNA-Ebene als zelluläres Referenzgen und kann die Ergebnisse verfälschen, wenn die behandelten Zellen einer zu hohen Virusdosis ausgesetzt sind. Insbesondere in mit der SC-siRNA transfizierten Zellpopulationen, in denen die Virusreplikation nicht inhibiert wurde, führten starke CPE und Zellsterben bei zu hohen Infektionsdosen zu einer Reduktion der Kopienzahl des cMyc-Gens.

5.2 Übertragung der siRNA-basierten Systeme auf Dubca- und NIH/3T3-Zellen

Für die Übertragung der siRNA-basierten Systeme zum *knockdown* der *host-range*-Faktoren C7L, K1L und CP77 auf die Kamelzelllinie Dubca und die Nagetierzelllinie NIH/3T3 wurden die optimalen Versuchsbedingungen für die Transfektion (3.2.6) und die Infektion (3.2.7) etabliert. In beiden Zelllinien war die Replikation von CMLV CP-19, VACV WR und CPXV BR permissiv. Obwohl das CMLV CP-19 für C7L kodiert, nicht aber für K1L und CP77, wurde eine permissive Replikation nachgewiesen. K1L und CP77 können daher keine essentiellen *host-range*-Faktoren in dieser Zelllinie sein. Die Bedeutung von C7L für den Infektionsverlauf muss über einen *knockdown* von C7L analysiert werden.

Für die Dubca-Zellen ist eine weitere Untersuchung eines Effektes der Transfektion auf eine nachfolgende Infektion nötig. Es konnten in den mit SC-siRNA transfizierten Dubca-Zellen im Vergleich zu einer nicht-transfizierten Kontrollpopulation nur eine geringe Virusreplikation nachgewiesen werden (4.4.2). Dies galt auch für die Kulturüberstände. Die Virustiterbestimmung erfolgte 48 h p. i. und 96 h p. i. Das CPXV BR wäre während dieser Zeit theoretisch zur Durchführung mehrerer

Replikationszyklen fähig. Bisher ist ungeklärt, ob die Viruspartikel während der Inkubation der transfizierten Dubca-Zellen mit dem CPXV BR nicht in die Zellen eintreten konnten und daher der Großteil der Viren bei dem Mediumwechsel 1 h p. i. wieder entfernt wurde. Es ist jedoch auch möglich, dass die Viren in die Zellen eintreten und die Virusreplikation in einem sehr frühen Stadium blockiert wird. In diesem Fall können in einem IFA in den Zellen nur vereinzelt Viruspartikel angefärbt werden, die im Fluoreszenzmikroskop ein entsprechend schwaches Signal erzeugen.

In NIH/3T3-Zellen konnte die Genexpression von K1L auf 51 % und von CP77 auf 16 % reduziert werden (4.5.2). Es wurde keine Inhibition der Virusreplikation von VACV WR oder CPXV BR durch Einsatz dieser siRNAs erzielt. Die C7L-siRNA hat keinen *knockdown* der Genexpression von C7L in dieser Zelllinie erzeugt. Analog zu den Dubca-Zellen kann in den NIH/3T3-Zellen eine essentielle *host-range*-Funktion von K1L und CP77 ausgeschlossen werden, denn CMLV CP-19 kann auch ohne diese Faktoren permissiv replizieren. Zur weiteren Analyse der Funktion von C7L ist ein *knockdown* der C7L-Genexpression nötig. Die siRNAs bieten in dieser Zelllinie aber auch die Möglichkeit, das Vorhandensein weiterer, bisher nicht bekannter *host-range*-Faktoren zu untersuchen.

5.3 Impedanzmessung von transfizierten und infizierten Zellen

Die Durchführung einer Impedanzanalyse ist eine neue Methode zur einfachen, nicht-invasiven und *label*-freien Quantifizierung des Zellstatus in *Real-Time*. Die automatisierte Aufzeichnung ist zeitsparend und bietet zudem eine kontinuierliche Qualitätskontrolle der Zellen. Durch seine Sensitivität liefert das System zusätzlich Informationen über Änderungen in der Morphologie und der Vitalität der Zellen, die lichtmikroskopisch nicht sichtbar sind. So wurde für einige Zelllinien die Zellzahl pro Kavität im xCELLigence™-System ergänzend optimiert. Es zeigte sich, dass bei Aussäen einer geringeren Zellzahl zu Beginn der Experimente die siRNA-vermittelten Effekte auf die Virusreplikation meist deutlicher waren. Zudem konnten Effekte der Transfektion auf die Zellen und lichtmikroskopisch nicht sichtbare CPE detektiert werden. Die Sensitivität des Systems bietet auch die Möglichkeit, geringere MOI

einzusetzen. Dies ist ein Vorteil, denn bei zu starkem CPE und Zellsterben ist das Experiment häufig nicht auswertbar.

Aufgrund der Elektroden im Boden der *E-Plate* musste auf eine Kontrolle der Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop verzichtet werden.

Die Impedanzmessung wurde bereits als eine nützliche Alternative zu konventionellen Methoden zur Titration von Pockenviren, Antikörper-Neutralisations-Tests und zur Untersuchung antiviraler Substanzen beschrieben (Witkowski & Schuenadel 2010). Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Impedanzmessung von Zellen ebenfalls eine geeignete Methode zur Analyse siRNA-basierter Systeme. Die siRNA-vermittelte Inhibition der Replikation von CMLV CP-19 in HEK293T-Zellen konnte in der Impedanzanalyse nachgewiesen werden (4.1.4). Bei den sortierten RK13-Zellen konnten der Experimentablauf und die Ergebnisse in einer Impedanzmessung reproduziert werden (4.2.4). Die Impedanzmessung ermöglicht einfache und schnelle simultane Analyse einer Vielzahl an Proben auf Vero-Zellen und liefert mit dem konventionellen Plaque-Titrationstest vergleichbare Ergebnisse. Es können jedoch auch komplexe Experimentabläufe durchgeführt werden. Hilfreich ist dies insbesondere bei Versuchsoptimierungen mit einer großen Anzahl an variablen Parametern. Sowohl die Optimierung der Transfektions- und Infektionsbedingungen für verschiedene Zelllinien als auch die Auswahl der adäquaten Inkubationszeiträume zwischen der Transfektion und der Infektion bzw. zwischen der Infektion und der Ernte lassen sich in der Impedanzmessung vergleichsweise einfach durchführen. Die Effekte verschiedener MOI können unter geringem Aufwand analysiert werden.

Die Durchführung von Mehrfachbestimmungen gibt zusätzlich eine statistische Sicherheit. Zu beachten ist jedoch, dass bei teilweise starken Randeffekten für ein verlässliches Ergebnis nicht die Informationen aller Kavitäten in die Auswertung einbezogen werden können und sich die Anzahl verwendbarer Kavitäten vermindert. So ist das Wachstum der Zellen in den außen liegenden Kavitäten meist weitaus schlechter und diese können nicht ausgewertet werden.

5.4 Ausblick

Die etablierten siRNA-basierten Systeme in den HEK293T- und den RK13-Zellen ermöglichen eine einfache Untersuchung der *host-range*-Funktion von C7L und K1L. Nach Transfektion der Zellen mit dem jeweiligen shRNA-exprimierenden Plasmid, können verschiedene Pockenvirusisolate auf Funktion der Faktoren C7L und K1L untersucht werden.

Weiterführend kann in einer Transkriptomanalyse das Repertoire an mRNAs in infizierten, nicht-infizierten und mit siRNA behandelten Zellen verglichen werden. siRNA-vermittelte Änderungen in der viralen Transkription können Aufschluss über die molekularen Vorgänge der Virusreplikation und die Funktion der entsprechenden *Host host-range*-Faktoren geben.

Zusätzlich bietet sich eine Proteomanalyse an, um den Effekt des *knockdowns* eines *host-range*-Faktors auf die virale und zelluläre Proteinexpression zu untersuchen. Es kann die Proteinexpression in nicht-infizierten, infizierten und mit siRNA behandelten Zellen miteinander verglichen werden. Die Proteine werden hierfür in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese nach ihrem isoelektrischen Punkt (isoelektrische Fokussierung) und dem Molekulargewicht (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt. Unterschiede in der Proteinexpression der verschiedenen behandelten Zellen sind durch einen Vergleich der im Gel entstehenden Muster zu erkennen. Proteine, die nicht in allen Proben enthalten sind, werden aus dem Gel geschnitten und mittels MALDI (Matrix-assistierten Laser-Desorptions-Ionisations)-TOF (*Time-of-Flight*)-Massenspektrometrie identifiziert. Eine Proteomanalyse liefert zudem Information, in welchem Maße der siRNA-vermittelte *knockdown* des *host-range*-Gens die Expression des entsprechenden Zielproteins herunterreguliert.

Um den Effekt des *knockdowns* genauer zu untersuchen, könnten GFP-exprimierende Viren für ein *Live Cell Imaging* eingesetzt werden. Dies ermöglicht eine dynamische Beobachtung der Viren und somit in der lebenden Zelle eine Detektion der Unterschiede in der Virusreplikation, die sich durch den siRNA-vermittelten *knockdown* eines *host-range*-Gens ergeben.

Zur Erzeugung eines siRNA-basierten *knockdowns* von CP77 in CHO-Zellen könnte als kostenintensivere Alternative zu den shRNA-exprimierenden Plasmiden der Einsatz einer synthetischen siRNA in Kombination mit einem hierfür optimierten Transfektionsreagenz getestet werden. Synthetische siRNAs weisen in der Zelle meist eine relativ geringe Halbwertszeit auf. Sie sind nach der Transfektion aber sofort in den Zellen verfügbar und daher geeignet, den Zeitraum des Experimentes zu verkürzen und somit die CHO-K1-Zellen während des Experimentes geringeren Belastungen auszusetzen. Der Einsatz fluoreszenzmarkierter siRNAs kann zusätzlich eine Kontrolle der Transfektionsrate ermöglichen. Für die Bestimmung der Transfektionsbedingungen bietet sich hier der Einsatz der Impedanzmessung an. Mit dieser Methode können die einzusetzende Konzentration an synthetischer siRNA, die Menge an Transfektionsreagenz und auch der zeitliche Ablauf des Experiments optimiert werden. Besonders letzterer Faktor ist aufgrund der bereits genannten Halbwertszeit kritisch.

In Dubca-Zellen muss zunächst untersucht werden, ob der Einsatz anderer Transfektionsreagenzien den gleichen Effekt hat bzw. ob bei Behandlung der Dubca-Zellen mit Transfektionsreagenz ohne Zugabe von DNA ebenfalls eine verminderte Infektion auftritt. Wenn die Pockenviren in transfizierte Dubca-Zellen eindringen können, muss untersucht werden, in welcher Phase die Virusreplikation blockiert wird. Eine geeignete Methode ist hier der Einsatz einer *Real-Time-PCR* mit spezifischen Sonden für frühe, mittlere und späte Gene.

Erst nach Aufklärung des Effektes der Transfektion auf die Infektion in Dubca-Zellen können weitere Experimente zur Charakterisierung der Faktoren, die den engen Wirtstropismus des Kamelpockenvirus determinieren, durchgeführt werden.

Weitere Informationen hierzu könnte auch die weitere Etablierung eines siRNA-vermittelten *knockdown* von C7L in NIH/3T3-Zellen liefern.

Ein simultaner *knockdown* mehrerer *host-range*-Gene wäre zur Aufklärung der *host-range*-Funktion ebenfalls aufschlussreich. Eine solche Untersuchung ist besonders in Kuhpockenviren interessant, da sie für das breiteste Repertoire an *host-range*-Genen kodieren. So könnten zum Beispiel HEK293T-Zellen mit K1L- und C7L-siRNA transfiziert werden. Wenn die Ko-Transfektion mit beiden siRNAs erfolgreich war, sollte bei einer Infektion mit VACV WR keine Replikation mehr nachweisbar sein.

Ebenso könnte in einem ähnlichen Modell CPXV auf das eventuelle Vorhandensein weiterer *host-range*-Faktoren untersucht werden. Voraussetzung ist, dass eine erfolgreiche Ko-Transfektion aller drei siRNAs erzielt werden kann oder bei Ko-Transfektion von C7L- und K1L-siRNA eine bereits in der Arbeitsgruppe erzeugte CP77-Deletionsmutante von CPXV BR für die Infektion verwendet wird.

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
AGO2	Argonaut 2
ANK	Ankyrin
Bp	Basenpaare
BR	Brighton Red
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
cDNA	<i>complementary/copy DNA</i>
CEV	<i>Cell-associated Enveloped Virus</i>
CHO	<i>Chinese hamster ovary</i>
CI	<i>Cell Index</i>
CMLV	<i>Camelpoxvirus</i>
CPE	Cytopathischer Effekt
CPXV	<i>Cowpoxvirus</i>
crm	<i>cytokine response modifying protein</i>
cT	<i>Threshold cycle</i>
Da	Dalton
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure</i>
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	<i>double stranded</i>
DTT	Dithiothreitol
Dubca	<i>Dubai camel</i>
ECTV	Ectromelievirus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEV	<i>Extracellular Enveloped Virus</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
for	<i>forward</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
FSC	<i>Forward Scatter</i>
GBLV	Taterapockenvirus
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Gln	Glutamin
h	Stunde/n
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
Hin	<i>Haemophilus influenzae</i>
hMGFP	<i>“humanized “ Monster Green[®] Fluorescent Protein</i>
IEV	<i>Intracellular Enveloped Virus</i>
IFA	Immunfluoreszenzassay
IMV	<i>Intracellular Mature Virus</i>
ITR	<i>Inverted Terminal Repeats</i>
kBP	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
MALDI	Matrix-assistierte Laser-Desorptions-Ionisation

Mg	Magnesium
MGB	<i>Minor Groove Binding</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MOCV	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
MOI	<i>Multiplicity of Infection</i>
MPXV	<i>Monkeypoxvirus</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
ms	Millisekunden
NCI	<i>Normalized Cell Index</i>
OPV	Orthopockenvirus
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p. i.	post infection
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAZ	Piwi, Argonaute, Zwiller/Pinhead-Domäne
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PKR	Proteinkinase R
PstI	<i>Providencia stuartii</i> I
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i>
RCNV	Raccoonpoxvirus
rev	<i>reverse</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RK	<i>Rabbit kidney</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> /Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SC	<i>Scrambled</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
SIB	Swiss Institute of Bioinformatics
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
siRNP	<i>siRNA-containing ribonucleoprotein complex</i>
SKXV	Skunkpoxvirus
Spi	Serinproteaseinhibitor
ss	<i>single stranded</i>
SSC	<i>Side Scatter</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TMGB	TaqMan MGB
TOF	<i>Time-of-flight</i>
VACVWR	Vacciniavirus Western Reserve
VARV	Variolavirus
VPXV	Volepoxvirus
WHO	<i>World Health Organization</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Klassifizierung der Pockenviren	6
Abbildung 1-2: Struktur von OPV	7
Abbildung 1-3: Der pockenvirale Replikationszyklus	9
Abbildung 1-4: Vereinfachtes Schema der shRNA-vermittelten RNA-Interferenz.....	17
Abbildung 1-5: Überblick über den Experimentaufbau.....	19
Abbildung 3-1: pGeneClip™ hMGFP (Promega).....	26
Abbildung 3-2: Struktur der <i>hairpin</i> -Oligonukleotide (Promega).....	27
Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der <i>Real-Time</i> -PCR im TaqMan®-Format	32
Abbildung 3-4: Prinzip der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung	41
Abbildung 3-5: Impedanzmessung von Zellen.....	43
Abbildung 4-1: Transfektionseffizienz von HEK293T-Zellen.....	46
Abbildung 4-2: <i>knockdown</i> von C7L in HEK293T-Zellen auf RNA-Ebene.....	47
Abbildung 4-3: Indirekter IFA infizierter HEK293T-Zellen	48
Abbildung 4-4: Aufgeschlossenen HEK293T-Zellen im Plaque-Titrationstest	49
Abbildung 4-5: Inhibition der Replikation von CMLV CP-19	50
Abbildung 4-6: Impedanzanalyse der aufgeschlossenen HEK293T-Zellen	51
Abbildung 4-7: Die transfizierte RK13-Population vor der Sortierung.....	52
Abbildung 4-8: Verteilung der transfizierten RK13-Population nach der Sortierung	53
Abbildung 4-9: Transfektionseffizienz von RK13-Zellen	54
Abbildung 4-10: <i>knockdown</i> von K1L in HEK293T- bzw. RK13-Zellen auf RNA-Ebene	56
Abbildung 4-11: Indirekter IFA infizierter RK13-Zellen.....	57
Abbildung 4-12: Plaque-Titrationstest mit RK13-Zellkulturüberständen	58
Abbildung 4-13: Inhibition der Replikation von VACV WR.....	59
Abbildung 4-14: Impedanzanalyse von sortierten, infizierten RK13-Zellen	60
Abbildung 4-15: Transfektion von CHO-K1-Zellen	61
Abbildung 4-16: <i>knockdown</i> von CP77 in CHO-K1-Zellen auf RNA-Ebene.....	62
Abbildung 4-17: Indirekter IFA infizierter CHO-K1-Zellen	63
Abbildung 4-18: Permissivität von Dubca-Zellen	65
Abbildung 4-19: Transfektion und Infektion von Dubca-Zellen	66
Abbildung 4-20: Virustiter in transfizierten Dubca-Zellen.....	67
Abbildung 4-21: Permissivität von NIH/3T3-Zellen	69
Abbildung 4-22: Transfektionseffizienz der NIH/3T3-Zellen	69
Abbildung 4-23: C7L-, K1L- und CP77- <i>knockdown</i> auf RNA-Ebene in NIH/3T3-Zellen	70

Literaturverzeichnis

- Afonso CL, Tulman ER, Lu Z, Zsak L, Sandybaev NT, Kerembekova UZ, Zaitsev VL, Kutish GF, Rock DL (2002) The genome of camelpox virus. *Virology* 295:1-9.
- Alkhalil A, Strand S, Mucker E, Huggins JW, Jahrling PB, Ibrahim SM (2009) Inhibition of Monkeypox virus replication by RNA interference, *Virology Journal* 6:188
- Alzhanova D, Fruh K (2010) Modulation of the host immune response by cowpox virus. *Microbes Infect*
- Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J (2007) The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science* 318:761-764.
- Assarsson E, Greenbaum JA, Sundstrom M, Schaffer L, Hammond JA, Pasquetto V, Oseroff C, Hendrickson RC, Lefkowitz EJ, Tschärke DC, Sidney J, Grey HM, Head SR, Peters B, Sette A (2008) Kinetic analysis of a complete poxvirus transcriptome reveals an immediate-early class of genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2140-2145.
- Backes S, Sperling KM, 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.
- Barquet N, Domingo P (1997) Smallpox: the triumph over the most terrible of the ministers of death. *Ann Intern Med* 127:635-642.
- Baxby D, Hessami M, Ghaboosi B, Ramyar H (1975) Response of camels to intradermal inoculation with smallpox and camelpox viruses. *Infect Immun* 11:617-621.
- Becker C, Kurth A, Hessler F, Kramp H, Gokel M, Hoffmann R, Kuczka A, Nitsche A (2009) Cowpox virus infection in pet rat owners: not always immediately recognized. *Dtsch Arztebl Int* 106:329-334.
- Bradley RR, 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.
- Breman JG, Henderson DA (2002) Diagnosis and management of smallpox. *N Engl J Med* 346:1300-1308.
- Broyles SS, Fesler BS (1990) Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *J Virol* 64:1523-1529.
- CDC (2003) Update: Multistate Outbreak of Monkeypox Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio and Wisconsin, *MMWR* 52:642-646

- Chantrey J, Meyer H, Baxby D, Begon M, Bown KJ, Hazel SM, Jones T, Montgomery WI, Bennett M (1999) Cowpox: reservoir hosts and geographic range. *Epidemiol Infect* 122:455-460.
- Chung CS, Vasilevskaya IA, Wang SC, Bair CH, Chang W (1997) Apoptosis and host restriction of vaccinia virus in RK13 cells. *Virus Res* 52:121-132.
- Cowley R, Greenaway PJ (1990) Nucleotide sequence comparison of homologous genomic regions from variola, monkeypox, and vaccinia viruses. *J Med Virol* 31:267-271.
- Croft DR, Sotir MJ, Williams CJ, Kazmierczak JJ, Wegner MV, Rausch D, Graham MB, Foldy SL, Wolters M, Damon IK, Karem KL, Davis JP (2007) Occupational risks during a monkeypox outbreak, Wisconsin, 2003. *Emerg Infect Dis* 13:1150-1157.
- Deria A, Jezek Z, Markvart K, Carrasco P, Weisfeld J (1980) The world's last endemic case of smallpox: surveillance and containment measures. *Bull World Health Organ* 58:279-283.
- Diven DG (2001) An overview of poxviruses. *J Am Acad Dermatol* 44:1-16.
- Drillien R, Koehren F, Kirn A (1981) Host range deletion mutant of vaccinia virus defective in human cells. *Virology* 111:488-499.
- Drillien R, Spehner D, Kirn A (1978) Host range restriction of vaccinia virus in Chinese hamster ovary cells: relationship to shutoff of protein synthesis. *J Virol* 28:843-850.
- Eis-Hubinger AM, Gerritzen A, Schneeweis KE, Pfeiff B, Pullmann H, Mayr A, Czerny CP (1990) Fatal cowpox-like virus infection transmitted by cat. *Lancet* 336:880-
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H (2004) Zoonotische Pockenviren. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 671-679.
- Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H (2010b) Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 140:229-236.
- Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H (2010a) Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol* 140:229-236.
- Esposito J, Knight J (1985) Orthopoxvirus DNA: A Comparison of Restriction Profiles and Maps. *Virology* 143, 230-251
- Fenner F, Henderson D A, Arita I, Jezek Z and Ladnyi I D (1988) Smallpox and its Eradication
- Fenner F, Wittek R, Dumbell K R, The Orthopoxviruses, Academic Press, Inc., 1989
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9:102-114.

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Gershon PD, Moss B (1990) Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4401-4405.
- 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.
- Gillard S, Spehner D, Drillien R, Kirn A (1989) Antibodies directed against a synthetic peptide enable detection of a protein encoded by a vaccinia virus host range gene that is conserved within the Orthopoxvirus genus. *J Virol* 63:1814-1817.
- Goebel SJ, Johnson GP, Perkus ME, Davis SW, Winslow JP, Paoletti E (1990) The complete DNA sequence of vaccinia virus. *Virology* 179:247-263.
- Gubser C, Hue S, Kellam P, Smith GL (2004) Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J Gen Virol* 85:105-117.
- Gubser C, Smith GL (2002) The sequence of camelpox virus shows it is most closely related to variola virus, the cause of smallpox. *J Gen Virol* 83:855-872.
- Guerra S, Lopez-Fernandez LA, Pascual-Montano A, Najera JL, Zaballos A, Esteban M (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J Virol* 80:985-998.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991) Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7276-7280.
- Hsiao JC, Chao CC, Young MJ, Chang YT, Cho EC, Chang W (2006) A poxvirus host range protein, CP77, binds to a cellular protein, HMG20A, and regulates its dissociation from the vaccinia virus genome in CHO-K1 cells. *J Virol* 80:7714-7728.
- Hsiao JC, Chung CS, 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 JC, Chung CS, 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.
- Hsiao JC, Assarsson E, Head SR, Sette A, Chang W. 2010. CP77-exosome complex promotes RNA decay associated with vaccinia virus growth in HeLa cells. XVIII International Poxvirus, Asfvirus and Iridovirus Symposium, P5.13.

- Jezek Z, Kriz B, Rothbauer V (1983) Camelpox and its risk to the human population. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 27:29-42.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
- Kotwal GJ, Moss B (1988) Analysis of a large cluster of nonessential genes deleted from a vaccinia virus terminal transposition mutant. *Virology* 167:524-537.
- Kurreck J (2009) RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew Chem Int Ed Engl* 48:1378-1398.
- Langland JO, Jacobs BL (2002) The role of the PKR-inhibitory genes, E3L and K3L, in determining vaccinia virus host range. *Virology* 299:133-141.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402-408.
- Ludwig H, Mages J, Staib C, Lehmann MH, Lang R, Sutter G (2005) Role of viral factor E3L in modified vaccinia virus ankara infection of human HeLa Cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. *J Virol* 79:2584-2596.
- Martinez J, Patkaniowska A, Elbashir SM, Harborth J, Hossbach M, Urlaub H, Meyer J, Weber K, Vandeburgh K, Manninga H, Scaringe SA, Luehrmann R, Tuschl T (2003) Analysis of mammalian gene function using small interfering RNAs. *Nucleic Acids Res Suppl* 333
- McFadden G (2005) Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* 3:201-213.
- 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.
- Modrow, S. and Falde D., Truyen U. 2010 *Molekulare Virologie*
- Moore ZS, Seward JF, Lane JM (2006) Smallpox. *Lancet* 367:425-435.
- Moss, B. (2007) *Poxviridae: The Viruses and Their Replication*
- Najera JL, Gomez CE, Domingo-Gil E, Gherardi MM, 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.
- Oguiura N, Spohner 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.
- Perkus ME, Goebel SJ, Davis SW, Johnson GP, Limbach K, Norton EK, Paoletti E (1990) Vaccinia virus host range genes. *Virology* 179:276-286.

- Pickup DJ, Ink BS, Hu W, Ray CA, Joklik WK (1986) Hemorrhage in lesions caused by cowpox virus is induced by a viral protein that is related to plasma protein inhibitors of serine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7698-7702.
- Proud CG (2005) eIF2 and the control of cell physiology. *Semin Cell Dev Biol* 16:3-12.
- 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.
- Ramsey-Ewing AL, Moss B (1996) Complementation of a vaccinia virus host-range K1L gene deletion by the nonhomologous CP77 gene. *Virology* 222:75-86.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005) Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123:621-629.
- Rosales R, Harris N, Ahn BY, Moss B (1994a) Purification and identification of a vaccinia virus-encoded intermediate stage promoter-specific transcription factor that has homology to eukaryotic transcription factor SII (TFIIS) and an additional role as a viral RNA polymerase subunit. *J Biol Chem* 269:14260-14267.
- Rosales R, Sutter G, Moss B (1994b) A cellular factor is required for transcription of vaccinia viral intermediate-stage genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:3794-3798.
- Rosel JL, Earl PL, Weir JP, Moss B (1986) Conserved TAAATG sequence at the transcriptional and translational initiation sites of vaccinia virus late genes deduced by structural and functional analysis of the HindIII H genome fragment. *J Virol* 60:436-449.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Senkevich TG, Koonin EV, Buller RM (1994) A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology* 198:118-128.
- Senkevich TG, Ward BM, Moss B (2004) Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. *J Virol* 78:2357-2366.
- Shisler JL, Jin XL (2004) The vaccinia virus K1L gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing IkappaBalpha degradation. *J Virol* 78:3553-3560.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC (2001) The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature. *J Biol Chem* 276:33293-33296.
- 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.
- Steinborn A, Essbauer S, Marsch WC (2003) Human cowpox/catpox infection. A potentially unrecognized disease. *Dtsch Med Wochenschr* 128:607-610.

- Staib C, Sutter G (2003) Live Viral Vectors in Methods in Molecular Medicine, Vol. 87, Vaccine Protocols, 2nd Edition
- Stewart TL, Wasilenko ST, Barry M (2005) Vaccinia virus F1L protein is a tail-anchored protein that functions at the mitochondria to inhibit apoptosis. *J Virol* 79:1084-1098.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453:534-538.
- Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse LJ (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* 12:2031-2046.
- Tschannen R, Schafer R (1980) Strain and host-cell dependence of vaccinia virus proteins. *Eur J Biochem* 111:145-150.
- Turner PC, Moyer RW (1998) Control of Apoptosis by Poxviruses. *Virology* 8:453-469.
- Tuschl T (2001) RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2:239-245.
- Tuschl T, Borkhardt A (2002) Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2:158-167.
- Vorou RM, Papavassiliou VG, Pierrotsakos IN (2008) Cowpox virus infection: an emerging health threat. *Curr Opin Infect Dis* 21:153-156.
- Vos JC, Saker M, Stunnenberg HG (1991a) Promoter melting by a stage-specific vaccinia virus transcription factor is independent of the presence of RNA polymerase. *Cell* 65:105-113.
- Vos JC, Saker M, Stunnenberg HG (1991b) Vaccinia virus capping enzyme is a transcription initiation factor. *EMBO J* 10:2553-2558.
- Wasilenko ST, Banadyga L, Bond D, Barry M (2005) The vaccinia virus F1L protein interacts with the proapoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol* 79:14031-14043.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453:539-543.
- Werden SJ, Rahman MM, McFadden G (2008) Poxvirus host range genes. *Adv Virus Res* 71:135-171.
- Willis KL, Patel S, Xiang Y, Shisler JL (2009) The effect of the vaccinia K1 protein on the PKR-eIF2 α pathway in RK13 and HeLa cells. *Virology* 394:73-81.
- Witkowski P, Schuenadel L, Wiethaus J, Bourquain DR, Kurth A, Nitsche A (2010) Cellular impedance measurement as a new tool for poxvirus titration, antibody neutralization testing and evaluation of antiviral substrates, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Andreas Nitsche für die Bereitstellung meines Themas und für jegliche konstruktive Kritik, Anregungen, unermüdliche Ratschläge und Aufmunterungen bedanken.

Livia Schünadel danke ich für ihre hervorragende Betreuung, ihre Geduld und ihre Unterstützung, wann immer ich mit neuen Problemen und Fragen an sie herantrat.

Weiterer Dank gilt meinen Kollegen, die mir das Vollenden meines Werks sowohl mit einer sehr angenehmen Arbeitsatmosphäre als auch mit zahlreichen Ratschlägen erleichtert haben.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinen Eltern, die maßgeblich zu dem beigetragen haben, was ich bin, und selbstverständlich all meinen Lieben, die mir in jeder Krise zur Seite stehen und an mich glauben.