

Expression und Funktion Apoptose regulierender Gene von Orthopockenviren

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Peter Witkowski

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Ingenieurwissenschaften
-Dr.-Ing.-

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. F.-J. Methner
Berichter:	Prof. Dr. R. Lauster
Berichter:	Prof. Dr. J. Kurreck
Berichter:	Dr. A. Nitsche

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 10. Mai 2010

Berlin 2010

D 83

Für Bela

Für meine Eltern

Danke für Alles

Danksagung

An dieser Stelle sei vor allem Andreas Nitsche gedankt, der mich während meiner Doktorarbeit unterstützt hat. Danke für Deine Zeit, dein Vertrauen und Deine Tritte. Es war in angemessenen Verhältnissen dosiert und hat mich weitergebracht.

Ansonsten danke ich Prof. Roland Lauster und Prof. Jens Kurreck für die Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten als auch zu betreuen.

Prof. Rüdiger Schade danke ich für seine offene Art die Dinge anzugehen und für sein Vertrauen in meine Arbeit und die hervorragende Kooperation.

Ansonsten muss ich unbedingt die vielen fleißigen Kollegen erwähnen, die mit ihrer Unterstützung zu meinem Erfolg beigetragen haben. Da wären insbesondere: Daniel Bourquain, Julia Wiethaus, Anja Voigt, Danny Niedrig, Luisa Denkel, Friederike Behler und Janine Michel.

Ich danke auch Wojtek Dabrowski und Sascha Engel für den speziellen IT Support in jeder Lebenslage.

Ansonsten geht meine fachliche und persönliche Anerkennung an die Jungs und Mädels von ZBS1, sowie den netten Kollegen vom NRZ Influenza, P11 und ZBS4. An dieser Stelle darf das Robert Koch-Institut nicht unerwähnt bleiben, welches junge Wissenschaftler in besonderem Maße fördert.

Letztendlich bleiben noch die unerschütterlichen Damen Else, Dolores, Clementine et al.

Trotz Blut und Schweiß war es eine gute Zeit.

Peter

Dezember 2009

Zusammenfassung

Nach der Eradikation des Variolavirus durch das WHO-Impfprogramm Ende des letzten Jahrhunderts treten andere *Orthopockenviren* (OPV) in den letzten Jahren gehäuft als Erreger humaner Infektionen in Erscheinung. Weitaus weniger gefährlich als die humanen Pocken können OPV, wie zum Beispiel die Kuhpockenviren oder Vacciniaviren, den Menschen infizieren und auch zu schwerwiegenden Komplikationen führen.

Mit ihrem bis zu 230.000 Basenpaaren großen Genom enthalten OPV Erbinformationen für eine Vielzahl sogenannter Wirtsbereichsfaktoren, die bis zu 50% des gesamten Pockengenoms ausmachen können. Das Arsenal dieser Proteine ist abhängig von der Virusspezies und hat großen Einfluss auf deren Pathogenesemechanismen.

Um den Einfluss ausgewählter Wirtsbereichsfaktoren zu untersuchen, wurden pockenvirale Proteine ausgesucht, die inhibitorisch in apoptotische Kaskaden der Wirtszellen eingreifen. Zu den Zielen der Arbeit gehörte die Etablierung von Nachweismethoden für apoptotische Prozesse, die Charakterisierung der Apoptose modulierenden Wirkung pockenviraler Proteine, sowie eine Untersuchung der Funktion der Modulatoren als tatsächliche Virulenzfaktoren.

Im Fokus des Projektes standen die Proteine CrmA als Kaspase-Inhibitor, F1L als Inhibitor der intrinsisch vermittelten Apoptose und schließlich P28 als RING-Finger-Protein mit unbekanntem Wirkmechanismus. Homologe dieser Proteine aus verschiedenen Vaccinia-, Kamel- und Kuhpockenviren wurden untersucht.

Mittels real-time PCR wurde die Expression der untersuchten Genprodukte nach OPV Infektion gezeigt und quantifiziert. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass spezifische mRNA bereits wenige Minuten nach der Infektion vorhanden ist und warfen Fragen bezüglich fertiger Transkripte in Pockenvirionen auf, deren Existenz im Laufe dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Um die Expression viraler Proteine untersuchen zu können, wurden spezifische IgY Antikörper generiert. Dies geschah basierend auf zirkulären und linearen DNA Vakzinen, die mit der Gene Gun in Hühner appliziert wurden. Ein neu entwickelter Antikörper-Neutralisationstest zur Charakterisierung der generierten Antikörper wurde im xCELLigence System etabliert und zeigte eine nur sehr schwache neutralisierende Wirkung der IgY.

Im Laufe des Projektes konnten Apoptose Nachweismethoden auf der Basis von markierten Kaspase-Inhibitoren und DNA-Strangbruch-Markern etabliert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass OPV nach der Infektion zum Teil Apoptose induzieren, die Zellen jedoch gegenüber äußeren Apoptose Stimuli schützen. Eine transiente Expression der viralen Proteine in nicht-infizierten Zellkulturen führte ebenfalls zur Apoptose Inhibition nach einem äußerem Stimulus.

Weiterhin gelang es mithilfe von siRNA die Expression der drei Proteine in infizierten Zellen zu unterdrücken. Versuche in Zelllinien, als auch in primären Hühnerzellen haben jedoch gezeigt, dass der *Knock down* der Apoptose Inhibitoren keinen Einfluss auf die Virusvermehrung hatte.

Abstract

The WHO vaccination programme against Variola virus in the end of the 1970s eradicated the human poxvirus worldwide. Since then other *Orthopoxviruses* (OPV) like Cowpox viruses or Vaccinia viruses from animal hosts are found increasingly to cause human infections. As the immune status of human populations decreases, OPV infections can lead to complications especially in high risk and immunocompromised patients.

Up to 50% of the OPV genome, with a size of maximally 230,000 bp, code for so-called host-range proteins which are of high importance for viral permissiveness. The arsenal of these proteins mainly depends on virus species and controls mechanisms of pathogenesis.

In order to determine the impact of host-range factors, proteins were chosen that interfere with the highly complex apoptotic cascades and work as apoptotic inhibitors. The first aims of this work were to establish detection methods for apoptotic processes in different cell lines, to characterise the anti-apoptotic impact of OPV proteins detached from the poxviral proteome and to examine the importance of these proteins as virulence factors.

The project focused on crmA as an extrinsically working inhibitor of caspases, on FIL as a mitochondrially located inhibitor of intrinsic apoptosis and on p28 as RING-finger protein with unknown mode of action. Homologues of these proteins from Vaccinia, Camelpox and Cowpox viruses were investigated.

The expression of the listed proteins was shown and quantified by real-time PCR. The results showed that specific mRNA can be measured a few minutes after infection. This fact led to the suggestion that mRNA is possibly present, coding for immune modulators within OPV particles. Further experiments confirmed this hypothesis and explained how it was possible for OPV to engage the expression so quickly.

In order to make more conclusions about protein expression, IgY antibodies specific for OPV immune modulators were generated by DNA vaccination of chickens via Gene Gun. Circular and linear vaccines were used, and antibodies with titres as high as 1:160,000 could be isolated. A new neutralisation test could be developed based on impedance measurement by the xCELLigence system in order to characterise the IgY.

In the course of the project, methods for apoptosis detection could be established on the basis of caspase inhibition and DNA strand breaks. It could be shown that OPV induce apoptosis on very low levels after infection; however, infected cells are effectively protected from external apoptotic stimuli. Comparable testing after a transient OPV protein expression in non-infected cell cultures showed protection against external induction of apoptotic death.

After probing the single OPV proteins, their expression in infected cells could be successfully suppressed by the design and deployment of siRNA. However, trials in cell lines and primary cells showed that the efficient knock-down had no significant impact on virus propagation.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	II
Zusammenfassung	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	3
1.1 Orthopockenviren	3
1.1.1 Einteilung der Pockenviren und charakteristische Vertreter	3
1.1.2 Viruspartikel	4
1.1.3 Genom	5
1.1.4 Replikation.....	5
1.1.5 Epidemiologie.....	7
1.1.6 Klinik/Pathogenese.....	8
1.2 Programmierter Zelltod – Apoptose	9
1.2.1 Nekrose	9
1.2.2 Morphologische Veränderungen der Zelle im Verlauf der Apoptose	10
1.2.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose Induktion.....	11
1.2.4 Kaspasen	11
1.2.5 Initiation und Regulation der Apoptose.....	12
1.2.6 Extrinsische Induktion	13
1.2.7 Intrinsische Induktion	15
1.3 Immunmodulation durch Orthopockenviren	16
1.3.1 Apoptose Induktion durch Pockenviren	16
1.3.2 Kaspase-Inhibitoren der Pockenviren und das CrmA Protein	17
1.3.3 Inhibierung der rezeptorvermittelten Apoptose durch Rezeptormimikry.....	17
1.3.4 Inhibierung der Mitochondrien-assoziierten Apoptose und das FIL Protein	18
1.3.5 Das P28 Protein	18
1.3.6 v-GAAP –ein neuartiger Apoptose Inhibitor der Orthopockenviren.....	19
1.4 siRNA als Alternative zu viralen Knock out Mutanten.....	19
1.5 Einsatz neuartiger DNA basierter IgY Antikörper in der Virologie.....	21
1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	23
2 Methoden.....	26
2.1 Allgemeines.....	26
2.2 Zellkulturtechnik	26
2.2.1 Zellkultur zur Anzucht von Zelllinien	26
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von primären Zellen	26
2.2.3 OPV Infektionen von Zellkulturen	27
2.2.4 Zellkultur zur Anzucht von Viren.....	27
2.2.5 Virusaufreinigung aus Anzuchtkulturen.....	28
2.2.6 Bestimmung des Pockentiters durch einen Plaque-Titrationstest.....	29
2.2.7 Bestimmung des neutralisierenden Titers von Antikörpern mittels Plaque-Neutralisationstest	30
2.2.8 Expression viraler Proteine <i>in vitro</i> durch Transfektion humaner Zelllinien	30
2.2.9 Zellsortierung zur Anreicherung transfizierter Zellen	31
2.2.10 Zellanalyse durch Impedanzmessung - das xCELLigence System	31
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	33
2.3.1 Erstellung von Expressionsvektoren für virale Proteine	33
2.3.2 Erstellung von Expressionsvektoren für antivirale siRNA.....	35
2.3.3 Erstellung von Expressionsvektoren für die DNA-Immunisierung.....	36
2.3.4 Vakzin Design	36
2.4 Charakterisierung der Expression von Apoptose Modulatoren auf Transkriptebene.....	37
2.4.1 Nukleinsäureextraktion.....	37
2.4.2 cDNA-Synthese	37
2.4.3 Real-time qPCR.....	38
2.5 Immunologische Methoden zur Charakterisierung pockenviraler Apoptose Modulatoren...	39

2.5.1	Generierung OPV-spezifischer IgY im Huhn.....	39
2.5.2	Immunzytochemie zum Nachweis viraler Proteine	41
2.5.3	Durchflusszytometrie zum Nachweis von Apoptose.....	43
2.5.4	Western Blot zur IgY-Charakterisierung.....	44
3	Material	45
3.1	Allgemein	45
3.2	Zellen.....	46
3.3	Viren.....	46
3.4	Oligonukleotide	46
3.5	Antikörper und Marker.....	47
3.6	Puffer und Medien.....	48
3.7	Software.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Expression der Apoptose Modulatoren auf Transkriptebe- ne in Zelllinien nach Infektion....	50
4.1.1	Unterschiede in der Expression zwischen pathogenen und nicht-pathogenen OPV	51
4.2	Existenz von mRNA für Immun Modulatoren in VACV und CPXV Virionen.....	51
4.3	Expression der Immun-Modulatoren nach dem Einsatz spezifischer siRNA	52
4.4	Untersuchung des Einflusses des siRNA Knock downs auf die Virusvermehrung	56
4.5	Einfluss der siRNA-Sequenz auf deren Interferenzwirksamkeit.....	56
4.6	Charakterisierung der in Hühnereiern generierten IgY-Ak.....	57
4.6.1	Anstieg der spezifischen IgY Titer in Hühnereiern nach DNA Immunisierung	57
4.6.2	Charakterisierung der IgY mittels Immunzytochemie.....	59
4.7	Expression der pockenviralen Apoptose Modulatoren auf Proteinebene in Zelllinien	62
4.7.1	Etablierung eines quantitativen Virus Neutralisationstests im xCELLigence System zur weiteren Charakterisierung von IgY	65
4.8	Apoptose Modulation durch Pockenvirale Proteine	70
4.8.1	Apoptose Induktion in Zelllinien.....	70
4.8.2	Induktion von Apoptose mittels intrinsischer und extrinsischer Induktoren <i>in vitro</i> nach Transfektion mit pockenviralen Apoptose Inhibitoren.....	71
5	Diskussion	73
5.1	Apoptose Modulation durch OPV	73
5.2	Expression der Apoptose Modulatoren	74
5.2.1	Generierung OPV spezifischer real-time PCR und Messung der Expression von Apoptose Modulatoren	74
5.2.2	Existenz viraler mRNA in Viruspartikeln	75
5.2.3	Bedeutung von mRNA früher Gene für die OPV Infektion	75
5.2.4	Nachweis pockenviraler Immun-Modulatoren auf Proteinebene	76
5.3	Folgen des Knock outs von Immunmodulatoren.....	79
5.3.1	Klassische <i>Knock out</i> Mutanten.....	80
5.3.2	Einsatz von siRNA für Gen <i>Knock down</i>	80
5.3.3	Einfluss der Sequenz auf die Interferenzwirksamkeit	82
5.3.4	Pockenvirale Apoptose Modulatoren als Virulenzfaktoren in der Zellkultur.....	83
5.3.5	Neutralisierende Eigenschaften von IgY	85
5.4	Etablierung des xCELLigence Systems für virologische Fragestellungen.....	85
5.4.1	Anwendbarkeit des Systems.....	85
5.5	Extrinsischen Apoptose Stimuli in Modulator exprimierenden Zellen.....	87
5.5.1	Heterologe Expression der YFP-Konstrukte in eukaryontischen Zellen.....	87
5.5.2	Schutz gegen Apoptose durch einzelne OPV-Proteine.....	88
5.5.3	Zusammenfassung	89
5.5.4	Ausblick.....	89
	Abkürzungsverzeichnis	92
	Abbildungsverzeichnis	91
	Tabellenverzeichnis.....	91
	Literaturverzeichnis.....	92
	Liste eigener Veröffentlichungen.....	102

1 Einleitung

1.1 Orthopockenviren

Pockenviren verursachen die seit längstem bekannte, übertragbare Erkrankung des Menschen (Dixon, 1962; Truyen, 2002). So zeigt zum Beispiel die Mumie von Pharao Ramses II. von Ägypten deutliche Pockennarben und somit Hinweise auf eine vor Tausenden von Jahren stattgefundene Pockenerkrankung (Dixon, 1962; Hopkins, 2002).

In Europa galten Pocken bis zur Einführung einer Impfung als Kinderkrankheit. Ab dem 18. Jahrhundert häuften sich die Pockenfälle und lösten die Pest als Leitkrankheit ab. Nach Schätzungen starben jedes Jahr 400.000 Menschen an Pocken. Oft zählten Kinder erst zur Familie, wenn sie die Pocken überstanden hatten (Winkle, 2005).

Die europäischen Eroberer brachten die Pocken nach Amerika mit, wo sie unter den Ureinwohnern verheerende Epidemien auslösten. In Nordamerika wurden die Pocken auch als biologische Waffe eingesetzt: Ein britischer Befehlshaber schenkte zwei indianischen Häuptlingen pockeninfizierte Decken. Dies führte unter der völlig ungeschützten Bevölkerung zu einer schweren Pockenepidemie. Die Europäer dagegen waren durch zahlreiche frühere Pockenepidemien stark durchseucht und daher relativ wenig gefährdet (Winkle, 2005).

Erste Impfungen gegen Pockenviren wurden mit einem OPV aus der Kuh Ende des 18. Jahrhunderts von Edward Jenner und John Hunter in England durchgeführt (Winkle, 2005). Er gab diesem Virus den Namen *Vacciniavirus*. Bereits in vorchristlicher Zeit wurde in China eine „Variolation“ mittels kutaner Injektion mit humanpathogenen Pockenviren aus speziell getrockneten Pockenpusteln durchgeführt (Truyen, 2002).

Noch in den 50er und 60er Jahren gab es in Europa Pockenepidemien, so z.B. 1950 in Glasgow, 1957 in Hamburg oder 1967 in der Tschechoslowakei (Moore, Seward et al., 2006). 1958 begann die WHO ein weltweites Impfprogramm, das dazu führte, dass 1977 der letzte bekannte, natürliche Pockenfall weltweit aufgetreten ist. 1979 wurden die humanen Pocken für ausgerottet erklärt und es besteht seit dieser Zeit keine gesetzliche Impfpflicht mehr, wobei es nationale Unterschiede bei dem Zeitpunkt der Einstellung der Impfung gab (Fenner, Henderson et al., 1988).

1.1.1 Einteilung der Pockenviren und charakteristische Vertreter

Die Pockenviren werden in zwei Unterfamilien eingeteilt, die einerseits die Pocken der Wirbeltiere und andererseits die Insektenpocken darstellen. Die einzelnen Genera innerhalb der Virusfamilien ähneln sich zwar bezüglich Morphologie und des Wirtstropismus, jedoch hybridisieren die Genome der einzelnen Viren nicht miteinander (Truyen, 2002).

Abbildung 1 zeigt die Einteilung der charakteristischen Vertreter der Poxviridae (Truyen, 2002). Hierbei sind die *Chordopoxvirinae* die Pocken die Wirbeltiere infizieren, die *Entomopoxvirinae* infizieren Insekten. Zu den *Chordopoxvirinae* gehören acht Genera. Vier dieser Genera (*Molluscipox*-, *Parapox*-, *Orthopox*- und *Yatapoxviridae*) sind in der Lage den Menschen zu infizieren. Die humanen Pockenviren gehören zur Gattung der *Orthopoxviren*, wobei das eradizierte Variola die humanen Pocken verursacht, während Kuhpocken, Affenpocken und Vaccinia zoonotische Infektionen verursachen können.

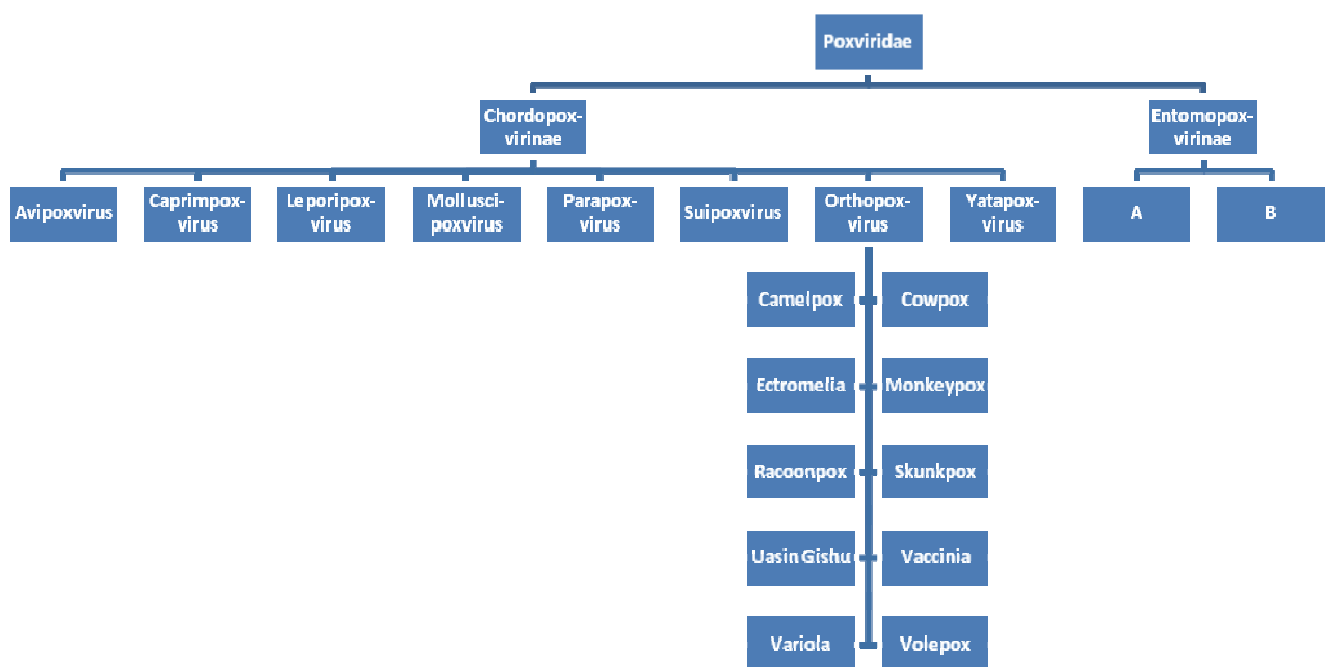


Abbildung 1: Systematische Einteilung der *Poxviridae* mit einem Schwerpunkt auf der Gattung *Orthopoxvirus* (Truyen, 2002)

1.1.2 Viruspartikel

OPV gehören zu den größten bekannten Viren. Sie haben, eine ovale, ziegelsteinähnliche Form mit deutlich strukturierter Oberfläche und Abmessungen von 300 nm x 200 nm x 100 nm (Abbildung 2). Im Inneren ruht ein bikonkaves Kapsid mit S-förmig zusammengefaltetem Genom, das von einer zweifachen Membran umgeben ist. Innerhalb der Membran befinden sich außerdem zwei Lateralkörper. Viruspartikel dieser Form werden als IMV bezeichnet (*intracellular mature virus* = IMV) (Roberts & Smith, 2008).

Extrazelluläre Viruspartikel besitzen eine zusätzliche Membran als umgebende Hülle. Beide Partikel sind infektiös. Für die Übertragung von Individuum zu Individuum ist die extrazelluläre Form verantwortlich (*extracellular enveloped virus* = EEV) (Roberts & Smith, 2008).

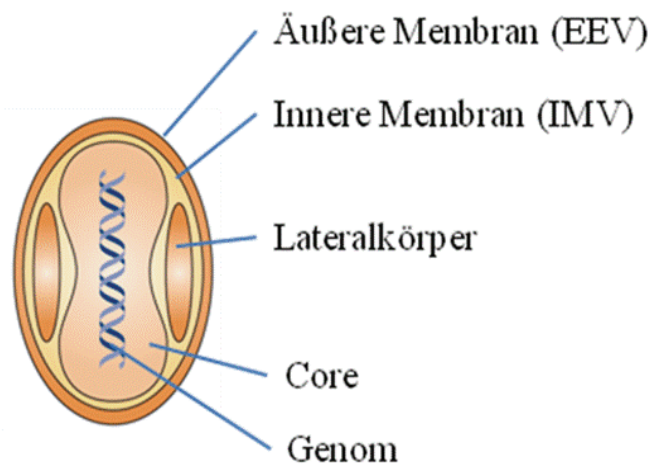


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Pockenvirus (McFadden, 2005).

1.1.3 Genom

Das Genom von Pockenviren besteht aus DNA und ist doppelsträngig, linear aufgebaut. Es hat eine Größe von 130.000 Basenpaaren bei Parapockenviren und bis zu 300.000 Basenpaaren bei Geflügelpockenviren. Vacciniaviren besitzen ca. 190.000 Basenpaare (Hughes & Friedman, 2005).

Das Genom kodiert für 150 bis 200 Gene und enthält keine Introns. Die Promotorsequenzen sind sehr kurz und die Gene sind je nach Zeitpunkt ihrer Expression nach Infektion in Gruppen (früh, intermediär, spät) angeordnet. Während die Regionen in der Mitte des Genoms, welche vor allem für Strukturproteine kodieren, bei allen Pockenviren stark konserviert sind, nimmt die Variabilität nach außen hin zu. In den äußeren Regionen kodiert das Pockengenom für sogenannte Wirtsbereichsfaktoren, die über die Permissivität des Wirtsorganismus entscheiden (Gubser, Hue et al., 2004; Lefkowitz, Wang et al., 2006).

1.1.4 Replikation

Orthopockenviren können viele verschiedene Zelltypen infizieren, andere, wie Avi- oder Levoripoxviren dagegen, haben ein sehr enges Wirtsspektrum.

Es ist nicht genau geklärt, welche Wirtszellrezeptoren an der Bindung des Virus an die Zelle beteiligt sind. Es gibt jedoch mindestens fünf virale Membranproteine (H3, A27 und D8 für IMVs, sowie B5 und A34 für EEVs), die an der Adsorption an die Wirtszellen beteiligt sind und gegen die Antikörper gebildet werden, die in den meisten Fällen neutralisierend wirken (Roberts & Smith, 2008).

Die Aufnahme in die Wirtszelle erfolgt über Endozytose des Viruspartikels und Eintritt des *Core* in das Zytoplasma, bzw. anschließende Fusion von Virus- und Endosomenmembran

(IMV), oder über direkte Fusion von Virus- und Zellmembran nach erfolgter Ausstülpung aus der äußersten Membran (EEV) (Roberts & Smith, 2008).

Im noch intakten Capsid beginnt die Transkription. Die beteiligten Enzyme sind Bestandteile des Viruspartikels und müssen somit nicht erst in der Wirtszelle synthetisiert werden. Im Zytoplasma läuft der Infektionszyklus dann in so genannten Virusfabriken (Guarnierische Einschlusskörperchen) ab, die bereits sehr früh nach der Infektion nachweisbar sind (Assarsson, Greenbaum et al., 2008).

In dieser Phase wird ungefähr die Hälfte aller Virusgene transkribiert – sie alle besitzen ähnliche Promotorsequenzen. Für die Bindung des RNA-Polymerase Komplexes an die DNA ist ein Transkriptionsfaktor namens „Vacciniavirus early transcription factor“ (VETF) notwendig. Er wird als Heterodimer aus zwei von dem Virus eingebrachten Proteinen gebildet. Die frühen mRNA Spezies werden alle am 5'-Ende mit einer Cap-Gruppe modifiziert und am 3'-Ende polyadenyliert.

Die Freisetzung des Genoms ins Zytoplasma findet im Anschluss an die frühe Transkription statt, woran ein proteolytisches, trypsinähnliches Virusprotein beteiligt ist (McLennan, 2007).

Die DNA-, RNA-, und Proteinsynthese der Zelle wird bereits in dieser frühen Phase abgeschaltet, der Mechanismus ist jedoch weitgehend unbekannt.

Die DNA-Replikation ist in VACV infizierten Zellen ca. 6 Stunden nach der Infektion (Andocken der Viren an die Zielzelle) abgeschlossen. Währenddessen werden bis zu 10.000 Kopien des Genoms hergestellt. Die Replikation scheint an beiden Enden des DNA Doppelstranges an Einzelstrangbrüchen (nicks) zu beginnen und wird vermutlich über 3'-OH-Enden „geprimed“. Ein Replikationsursprung, wie bei anderen DNA-Viren, konnte nicht gefunden werden. Nach dem Einleiten der Replikation biegt sich der neue Strang durch Bildung von Hairpin Strukturen vom Doppelstrang weg und ermöglicht den Beginn einer weiteren Replikation. Auf diese Weise können Pockenviren, ähnlich den Parvoviren, mehrere DNA Kopien gleichzeitig erstellen – sogenannte Konkatemere (Merchinsky & Moss, 1989).

Nach der Bildung neuer Virusgenome beginnt die Synthese der viralen Strukturproteine und einiger Enzyme, die Bestandteile des späteren Viruspartikels sind, ebenso wie Proteinkinasen und –proteasen, die für die Freisetzung des Genoms notwendig sind.

Nach der Freisetzung des Genoms wird die DNA von einer Doppelmembran umhüllt, die aus den Bestandteilen des intermediären Kompartiments der Zelle neu zusammengesetzt wird (IMV). Zu diesem Zeitpunkt muss der Transport der Virusproteine bereits abgeschlossen sein und die Viruspartikel werden in die Peripherie der Zelle befördert, wo sie nach Erhalt einer

weiteren Membran mit den Golgi-Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert und nach draußen entlassen werden (EEV) (McFadden, 2005).

1.1.5 Epidemiologie

Durch Variola verursachte Pockenerkrankungen (Variola vera) waren ursprünglich in der östlichen Hemisphäre, auf dem indischen Subkontinent und in China verbreitet. Über die Seidenstraße kamen sie im Mittelalter bis zum Vorderen Orient und dann nach Afrika und Europa. Auswanderer brachten sie später mit nach Amerika. Als Seuche traten die Pocken epidemisch auf oder kehrten endemisch alle vier bis sieben Jahre wieder (Alibek, 2004).

Die Übertragung fand in frühen Infektionsstadien vor allem über eine Tröpfcheninfektion statt, aber auch durch Krusten, Pusteln und kontaminierte Textilien. Die Letalität betrug 10 – 40 %. Eine weitere schwächere Form, genannt Variola minor (Alastrimvirus), trat in Südamerika, Afrika und Australien auf, wo die Letalität bei 1 – 2 % lag (Alibek, 2004).

Nach 1977 (letzter gemeldeter natürlicher VARV Fall) traten, von Arbeitsunfällen in Laboratorien abgesehen, nur noch durch Kontakt mit Tieren verursachte zoonotische Pockeninfektionen auf, die beim Menschen jedoch überwiegend als harmlose und leicht fieberhafte Erkrankungen ablaufen. Komplikationen im Verlauf werden häufig bei immunsupprimierten oder chronisch erkrankten Patienten, sowie Kindern festgestellt. Betroffene, die noch eine oder zwei Pockenimpfungen erhalten haben, besitzen in diesen Fällen einen erhöhten Schutz aufgrund von Kreuzreaktivitäten (Sivapalasingam, Kennedy et al., 2007). Ein gutes Beispiel für zoonotische Pockeninfektionen ist ein Affenpocken Ausbruch in Texas/USA, bei dem im April 2003 19 Menschen nachweislich durch aus Ghana importierte Affen infiziert worden sind (bei über 90 Verdachtsfällen) (Centers for Disease Control and Prevention, 2003; Di Giulio & Eckburg, 2004).

Da weltweit seit dem Ende der 70er Jahre nicht mehr gegen Pocken geimpft wird, ist der Immunstatus der Bevölkerung mit jedem Jahr zunehmend schlechter. In letzter Zeit ist eine Zunahme an zoonotischen Pockeninfektionen in vielen Regionen der Welt zu verzeichnen. So treten zum Beispiel in Afrika die bereits genannten Affenpockeninfektionen auf, die in bis zu 15% der Fälle letal verlaufen können und dessen Erreger zu Pathogenen der biologischen Sicherheitsstufe 3 gezählt wird (Di Giulio & Eckburg, 2004). Weiterhin gibt es in Südamerika vermehrt Infektionen mit Vaccinia-ähnlichen Viren, welche wahrscheinlich ein Reservoir in wildlebenden Tieren erschlossen haben (Silva-Fernandes, Travassos et al., 2009). Letztendlich gibt es auch in Deutschland verstärkt zoonotische Pockenvirusinfektionen. Kuhpockenviren, die hauptsächlich durch Katzen, aber auch durch Futter- und „Schmusenager“ übertragen werden, konnten vom Konsiliarlabor für Pockenviren in

Menschen und Zootieren nachgewiesen werden (Nitsche, Kurth et al., 2007; Nitsche & Pauli, 2007). Es wird vermutet, dass nach der Eradikation des VARV und mit dem zunehmend schlechten Schutz der Bevölkerung, es früher oder später einem Pockenvirus gelingen wird, die „biologische Nische Mensch“ für sich zu beanspruchen (McFadden, 2005).

1.1.6 Klinik/Pathogenese

Die Inkubationszeit einer humanen Pockenerkrankung beträgt ca. 10 – 14 Tage. Während dieser Zeit erfolgt die Replikation in den oberen Luftwegen und den Lungenalveolen. Von dort aus breitet sich das Virus über Makrophagen und Lymphozyten in die Lymphknoten aus. Danach erfolgt ein akuter Ausbruch durch Fieber, Kopf-, Glieder- und Hodenschmerzen, Blutungen der Binde- und Schleimhaut sowie Schluckbeschwerden durch Ausschlag im Mund- und Rachenbereich. Nach dieser ersten „kleinen Virämie“ erfolgt eine Ausbreitung in das reticulohistiocytäre System. Nach erneuter Vermehrung - ca. zwei Tage später - folgen Rückenschmerzen und Hautausschläge am ganzen Körper. Während dieser „großen Virämie“ wird der gesamte Organismus befallen und die Viren können zu diesem Zeitpunkt in vielen inneren Organen nachgewiesen werden (Fenner, Henderson et al., 1988).

Die für Pocken typischen Pusteln entwickeln sich aus Flecken über Papeln zu Bläschen und vertrocknen nach zwei bis drei Wochen zu Krusten, die meist Narben hinterlassen.

In einigen Bereichen kommt es während der Infektion zu lokaler Zellproliferation, die durch den viruskodierte epithelzellspezifischen Wachstumsfaktor SPGF (*smallpox growth factor*) ausgelöst wird (Kim, Yang et al., 2004). In einigen Fällen ist der Krankheitsverlauf mit schweren Hämorrhagien der Haut und Schleimhäute, sowie inneren Blutungen verbunden (so genannte „Schwarze Pocken“).

Der Verlauf der Erkrankung mit Variola minor ist dem zuvor genannten ähnlich, jedoch leichter in der Ausprägung der Symptome (Hopkins, 2002).

In Tieren können Pockenviren unterschiedlich schwere Krankheitsbilder mit hoher Morbidität und Mortalität hervorrufen, wie das Ektromelievirus (Mauspocken) und die Kamelpocken, deren Genome enge Verwandtschaft zum Variolavirus aufweisen, wodurch das Risiko einer einfachen Adaption solcher Viren an den Menschen besteht (Afonso, Tulman et al., 2002; Esteban & Buller, 2005). Dieses Potential erfordert eine genaue Analyse der noch zum Großteil unbekannten Mechanismen, welche der Wirtsspezifität und Pathogenität der Pockenviren zu Grunde liegen. Erste Erkenntnisse auf Genomebene beschreiben 91 konservierte pockenvirale Gene, die an allgemeinen Vorgängen wie Replikation und Assemblierung mitwirken, wogegen eine Vielzahl von bis zu 100 nicht konservierten Virulenz- und host-range Genen innerhalb der inverted terminal repeats (ITR) eine sehr große

Divergenz aufweisen und vermutlich Wirtsbereich und Pathogenität bestimmen (Seet, Johnston et al., 2003). So weisen Kuhpocken ein hohes zoonotisches Potenzial und gleichzeitig das größte pockenvirale Genom auf, während Pockenviren, wie Variola oder Ectromelia über kleinere ITR-Regionen verfügen und ein sehr enges Wirtsspektrum besitzen. Über die Aktivitäten vieler in den ITR kodierter Proteine ist ebenso wenig bekannt, wie über deren Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen. Auch ist nicht bekannt, welche intrazellulären Mechanismen bestimmen, ob eine Infektion mit Pockenviren permissiv oder abortiv verläuft. Da alle für die Adsorption von Pockenviren und die Penetration der Zelle bekannten zellulären Faktoren ubiquitär vorhanden zu sein scheinen, müssen intrazelluläre Modulationen eines breiten Spektrums antiviraler Reaktionen, wie Apoptose, Interferon Induktion des antiviralen Status, stressinduzierte Signalkaskaden, MHC-restringierte Antigenpräsentation und pro-inflammatorische Signalwege eine essentielle Rolle spielen.

1.2 Programmierter Zelltod – Apoptose

Der Begriff „Apoptosis“ setzt sich aus den griechischen Wörtern apo (Weg) und ptosis (Fall) zusammen und soll an das Herabfallen der Blätter im Herbst erinnern. In dieser Zeit bereiten sich die Pflanzen auf den Winter vor und sichern alle verfügbaren Ressourcen aus ihrem Laub, um dieses dann abzuwerfen. Der „Apoptose“ genannte Prozess spielt hier eine entscheidende Rolle, denn es handelt sich dabei um einen programmierten und beabsichtigten Zelltod. Der Begriff deutet an, dass der gesteuerte und selektive Tod von lebenden Zellen eine Voraussetzung für das Überleben eines komplexen Organismus ist. In dieser Form und Bedeutung tauchte die Bezeichnung das erste Mal 1972 in der biomedizinischen Literatur auf (Kerr, Wyllie et al., 1972).

Apoptose ist der wahrscheinlich wichtigste Regulationsmechanismus innerhalb von mehrzelligen Organismen, der für eine Homöostase in allen Geweben essentiell ist, aber auch als Abwehrmechanismus gegen Viren- und Tumorerkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin ist Apoptose während der Embryonalentwicklung für die Auflösung nicht mehr benötigter stützender Gewebepartien verantwortlich (z. B. das Entfernen von Haut zwischen den neu entstehenden Fingern einer Hand) (Gewies, 2003).

1.2.1 Nekrose

Während des Vorgangs der Apoptose wird eine Zelle Schritt für Schritt nach einem festgelegten Programm zerlegt. Dieser Prozess steht im großen Gegensatz zu dem „Nekrose“ genannten Zelltod. Bei der Nekrose handelt es sich um einen unnatürlich eintretenden Tod, der durch Verletzungen, Verlust der Blutzufuhr und manche Infektionen verursacht werden

kann. Es kommt dabei zur Beschädigung der Zellmembran, wodurch Ionenpumpen ausfallen und der osmotische Druck die Zelle endgültig zum Platzen bringt. Der vollständige Inhalt der Zelle ergießt sich in die Umgebung und lockt Zellen des Immunsystems an, die eine Entzündungsreaktion auslösen (Hengartner, 2000).

1.2.2 Morphologische Veränderungen der Zelle im Verlauf der Apoptose

Rein morphologisch betrachtet, schrumpft eine apoptotische Zelle zunächst und das Chromatin im Kern kondensiert. Um ihr Volumen zu verkleinern, pumpt die Zelle vor allem Kaliumionen nach außen und kontrahiert ihr Zytoskelett. Es entstehen so genannte „Apoptotische Körperchen“ durch Ausstülpungen der Zellmembran, die von Phagozyten erkannt und beseitigt werden. Der Erkennungsmechanismus basiert auf einer Membranveränderung, die durch die Umlagerung von Phosphatidylserinresten von der Innen- auf die Außenseite der Membran charakterisiert wird. Apoptose hinterlässt somit keine Spuren und löst im Gegensatz zur Nekrose vor allem keine Entzündungsreaktion aus. Des Weiteren ist die Apoptose bis zu einem gewissen Grad reversibel. Der Verlauf von Apoptose und Nekrose ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Mischformen aus Apoptose und Nekrose sind bekannt und werden als Nekroptosis bezeichnet (Wang, 2001).

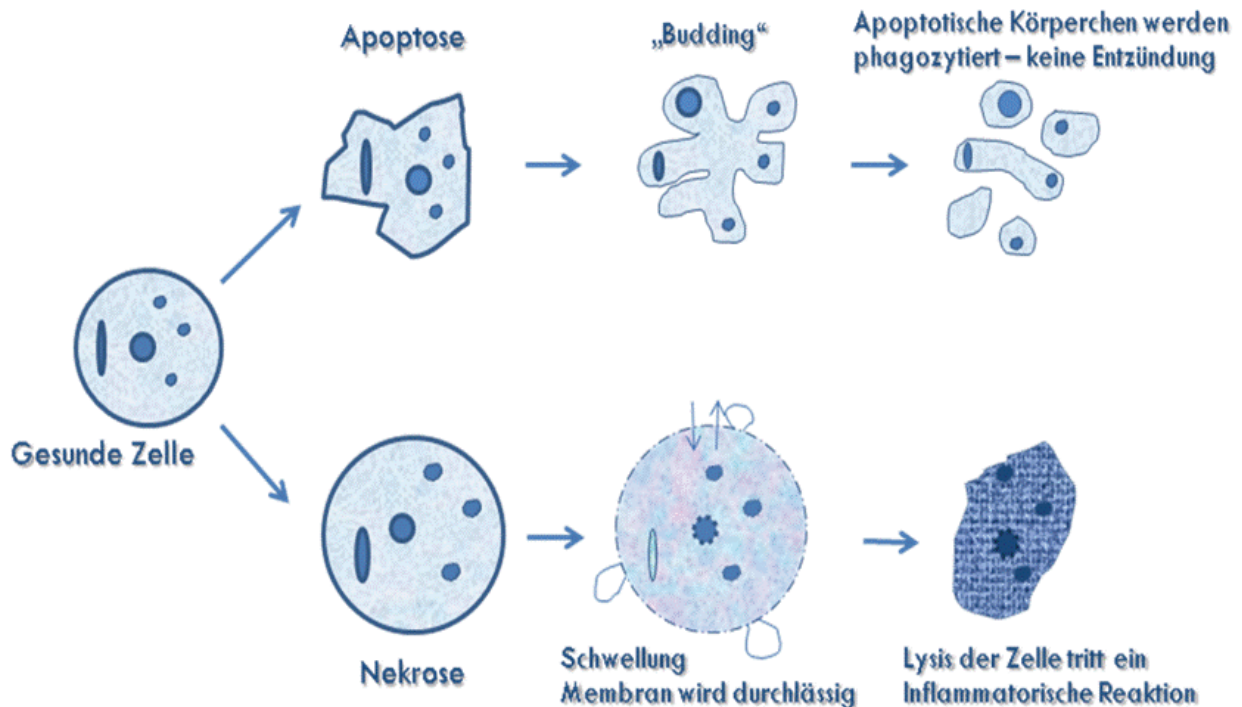


Abbildung 3: Vergleichende Darstellung von Nekrose und Apoptose. (Angepasst nach Gewies 2003).

Die wichtigsten Eigenschaften, die die Apoptose von der Nekrose abgrenzen sind:

- Erhalt der Membranintegrität bei Veränderung ihrer Symmetrie
- Chromatin-Aggregation und oligonukleosomale Fragmentierung

- Kondensation der Zelle und Bildung von apoptotischen Körperchen
- Strenge Regulation
- Aktivierung der Kaspase-Kaskade
- Energiebedarf
- Initiation durch physiologische Stimuli
- Ablauf spezifisch in einzelnen Zellen
- Entzündungsreaktion bleibt aus
- Phagozytose apoptotischer Körperchen auch durch Nachbarzellen möglich

1.2.3 Molekulare Mechanismen der Apoptose Induktion

Apoptose ist ein hochgradig regulierter und effizienter Vorgang, der die Beteiligung einer Vielzahl von Faktoren erfordert. Die Komponenten des Signalnetzwerks der Apoptose sind genetisch kodiert und liegen in inaktiver Form in der Zelle vor (Hengartner, 2000). Verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Stimuli können die Apoptose beeinflussen, z.B. Ligandenbindung an bestimmte Oberflächenrezeptoren der Zellen, DNA-Schäden hervorgerufen durch Defekte der Reparaturmechanismen, Behandlung mit zytotoxischen Chemikalien oder Bestrahlung, Mangel an Überlebenssignalen, bzw. gegensätzliche Zellzyklus-Signale oder entwicklungsabhängige Todessignale. Trotz der Vielfalt unterschiedlicher Stimuli ist die Maschinerie, welche durch diese in Gang gesetzt wird, einheitlich und führt zu den charakteristischen Eigenschaften des apoptotischen Zelltodes. Alle Arten des apoptotischen Zelltodes besitzen eine große Gemeinsamkeit: die Aktivierung von spezifischen Proteasekaskaden, unter Beteiligung der sogenannten **Kaspasen**.

1.2.4 Kaspasen

Zu den prominentesten Teilnehmern der apoptotischen Maschinerie gehören die Cysteiny-Aspartat-spezifischen Proteasen, genannt Kaspasen, denen eine tragende Rolle in der Initiation und Ausführung aller apoptotischen Prozesse zufällt (Creagh & Martin, 2001). Ihre katalytische Aktivität beruht auf einem Cystein-Rest im aktiven Zentrum dieser Proteasen, der Peptidbindungen C-terminal von Aspartat erkennt und prozessiert (Denault & Salvesen, 2002).

Mindestens 14 Mitglieder der Kaspase Familie wurden in tierischen Zellen charakterisiert, wobei Kaspase-11 und -12 nur aus Mäusen bekannt sind (Denault & Salvesen, 2002; Richardson & Kumar, 2002). Die Nomenklatur basiert auf der Reihenfolge ihrer Entdeckung – Kaspase-1 (ICE, Interleukin-1 β -Converting Enzyme) wurde 1993 zuerst beschrieben (Miura, Zhu et al., 1993). Kaspasen liegen in der Zelle als pro-Enzyme (inaktive Vorstufen)

vor und werden durch autokatalytische Spaltung oder durch andere Kaspasen aktiviert. So entstehen Kaskaden aus sich gegenseitig aktivierenden Kaspasen, die aufgrund der Proenzymform jederzeit zur Verfügung stehen ohne erst synthetisiert werden zu müssen, andererseits jedoch zahlreiche Möglichkeiten der Regulation bieten. Die am Ende der Kaskade stehenden Kaspasen sind für das Zerlegen des Zellgerüsts und der Kernmatrix zuständig. Sie aktivieren Endonukleasen und spalten Proteine, die für Signaltransduktionswege und Reparaturen innerhalb der Zelle zuständig sind (Creagh & Martin, 2001). Dabei ist die Beteiligung der Kaspasen-1, -4, -5, -11 und -12 überwiegend an der proteolytischen Reifung pro-inflammatorischer Zytokine, wie pro-IL-1 β und pro-IL-18 gezeigt und ihre Rolle als ausführende Kaspasen während der Apoptose selbst fraglich (Denault & Salvesen, 2002). Dagegen werden die Kaspasen-2, -3 und Kaspasen-6 bis -10 als bedeutende Teilnehmer der apoptotischen Kaskaden identifiziert (Earnshaw, Martins et al., 1999). Es werden sogenannte Initiator-Kaspasen (-2, -8, -9, -10) und die Effektor-Kaspasen (-3, -6, -7) unterschieden. Während die Effektor-Kaspasen kurze Prodomänen aufweisen und von aktiven Initiator-Kaspasen aktiviert werden, sind die Prodomänen bei den Initiator-Kaspasen länger und enthalten Effektordomänen (DED, *death effector domains*) im Fall von pro-Kaspase-8 und -10, oder Rekrutierungsdomänen (CARD, *caspase recruitment domain*) im Fall von pro-Kaspase-2 und -9 (Earnshaw, Martins et al., 1999). Initiator-Kaspasen werden nicht von anderen Kaspasen aktiviert - sie starten die apoptotischen Kaskaden.

1.2.5 Initiation und Regulation der Apoptose

Das Auslösen von Apoptose ist ein vielschichtiger und komplexer Prozess. Er ist vielfach reguliert und berücksichtigt etliche Faktoren, die den Zustand der Zelle beschreiben. Eine Vielzahl verschiedener Stimuli ist in der Lage Apoptose zu induzieren und je nach Stimulus können Veränderungen bereits sehr früh oder erst nach einigen Stunden nachgewiesen werden. Diese Veränderungen sind stark davon abhängig, über welchen Weg die Apoptose induziert wird.

Zytostatika und verschiedene Arten von Strahlen führen zu Schäden an der DNA und lösen die Expression der Tumor-Suppressorgene aus. Während Zytostatika u.A. die Topoisomerase-Aktivität herabsetzen, schädigt harte Strahlung das Genom direkt, indem sie intramolekulare Bindungen zerstört. Todesfaktoren aktivieren bestimmte Rezeptoren an der Zelloberfläche, die wiederum Apoptose auslösen. Bestimmte Überlebens- und Wachstumsfaktoren unterdrücken durch ihre Anwesenheit apoptotische Prozesse innerhalb der Zelle, so dass erst durch das Fehlen dieser Substanzen der programmierte Zelltod eintreten kann. Oft handelt es

sich letztendlich um ein Zusammenspiel von antagonistischen und antagonistischen Faktoren, das über den Bestand der Zelle entscheidet (Ameisen, 2002; Gewies, 2003).

Bei vielen dieser Faktoren handelt es sich um Mitglieder der Bcl-2 Familie, welche über das Vorkommen bestimmter Homologiedomänen (BH1-BH4) definiert werden. Die Hauptfunktion dieser Proteine ist die Regulation der Membranintegrität von Mitochondrien und der Freisetzung bestimmter Proteine aus ihrer Matrix (Cory & Adams, 2002). Es handelt sich dabei sowohl um pro- als auch anti-apoptotische Proteine, zu denen neben Bcl-2 auch noch Bcl-XL, Bcl-w und Mcl gehören, die alle vier BH Domänen besitzen. Eine Besonderheit sind die BH3-only Proteine, die nur über das kurze BH3-Motiv verfügen welches eine regulatorische Funktion bei der Aktivierung apoptotischer Protagonisten besitzt (Cory & Adams, 2002; Mund, Gewies et al., 2003). Die Proteine Bax und Bak sind weitere wichtige Teilnehmer an der Regulation der Mitochondrien, wobei sie im Laufe der apoptotischen Prozesse innerhalb der Mitochondrienmembran Homooligomere ausbilden, die zur Permeabilisierung und Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren führen (Borner, 2003).

Neben den Bcl-2 Proteinen sind die Mitglieder der IAP- (*inhibitors of apoptosis protein*-) Familie bei der Hemmung der Apoptose von Bedeutung. Alle IAPs enthalten *baculovirus IAP repeat* (BIR) Domänen, welche für die anti-apoptotische Wirkung essentiell sind (Takahashi, Deveraux et al., 1998). IAPs binden Kaspasen über ihre BIR-Domänen und inhibieren deren Wirkungsmechanismus (Huang, Park et al., 2001; Salvesen & Duckett, 2002). Neben den BIR-Domänen enthalten einige IAPs eine hoch konservierte RING-Domäne, die eine Ubiquitinligase Aktivität besitzt. IAPs sind in der Lage ihre eigene Ubiquitinilierung zu katalysieren und sich damit für die Degradierung durch das Proteasom zu markieren (Yang, Fang et al., 2000). Eventuell werden auch andere Substrate wie Kaspase-3 und -7 markiert und abgebaut (Suzuki, Nakabayashi et al., 2001). Dem anti-apoptotischen Effekt der IAPs wirken die mitochondrialen Proteine Smac und Diablo entgegen, die durch negative Regulierung der IAPs und Freisetzung IAP-gebundener Kaspasen ihre pro-apoptotische Wirkung entfalten (Du, Fang et al., 2000).

1.2.6 Extrinsische Induktion

Apoptose kann durch Stimuli über Oberflächenrezeptoren der Zelle induziert werden. Ein Beispiel dafür ist das CD95 (auch APO-1 oder FasL) Rezeptor Ligand System, das von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) eingesetzt wird, um entartete oder infizierte Zellen zu töten. CD95 gehört zur TNF-Rezeptorfamilie und wird von den meisten Zellen, jedoch in unterschiedlichen Mengen, exprimiert. Eine mögliche Kaspasekaskade wird durch das Binden des Rezeptors CD95 und des Tumor Nekrose Faktors (TNF) ausgelöst. Der membranständige

Teil des TNF-Rezeptors, TNF-R1, oligomerisiert zunächst mit mehreren TNF Molekülen, um dann weitere Proteine, wie das TNF-R1-assoziierte Protein mit Todesdomäne (TRADD) oder die Fas-assoziierte Todesdomäne (FADD), zu rekrutieren. Dieser Proteinkomplex bindet proenzymatische Formen der Kaspasen 2 und 8/10, die dadurch in proteolytisch aktive Formen umgewandelt werden. Diese Kaspasen aktivieren dann weitere Kaspasen und die bereits erwähnte Kaskade setzt ein (Hengartner, 2000).

Außerdem ist das Granzym, welches von zytotoxischen T Lymphozyten sezerniert wird, ein weiterer Apoptose Induktor, der gemeinsam mit dem so genannten Perforin Poren innerhalb der Zellmembran bildet. Das Granzym kann auf zwei unterschiedliche Arten apoptotische Prozesse einleiten, beziehungsweise unterstützen: Granzym A prozessiert den SET-Komplex, der aus mehreren Proteinen besteht, die hauptsächlich als Transkriptionsinhibitoren für DNA Reparaturgene wirken. Granzym B hingegen setzt durch proteolytische Aktivität Kaspase-Kaskaden in Gang (Lord, Rajotte et al., 2003).

Zellen, welche befähigt sind diesen direkten und überwiegend Kaspase-abhängigen Weg der Apoptose Induktion einzuschlagen, werden als Typ I Zellen klassifiziert (Scaffidi, Fulda et al., 1998). In Typ II Zellen ist das Signal des aktivierten Rezeptors nicht ausreichend um eine Kaspase-Kaskade zu induzieren, welche stark genug ist, direkt den Zelltod auszulösen. In diesem Fall ist eine Signalverstärkung über den Mitochondrien-abhängigen Apoptose Signalweg notwendig.

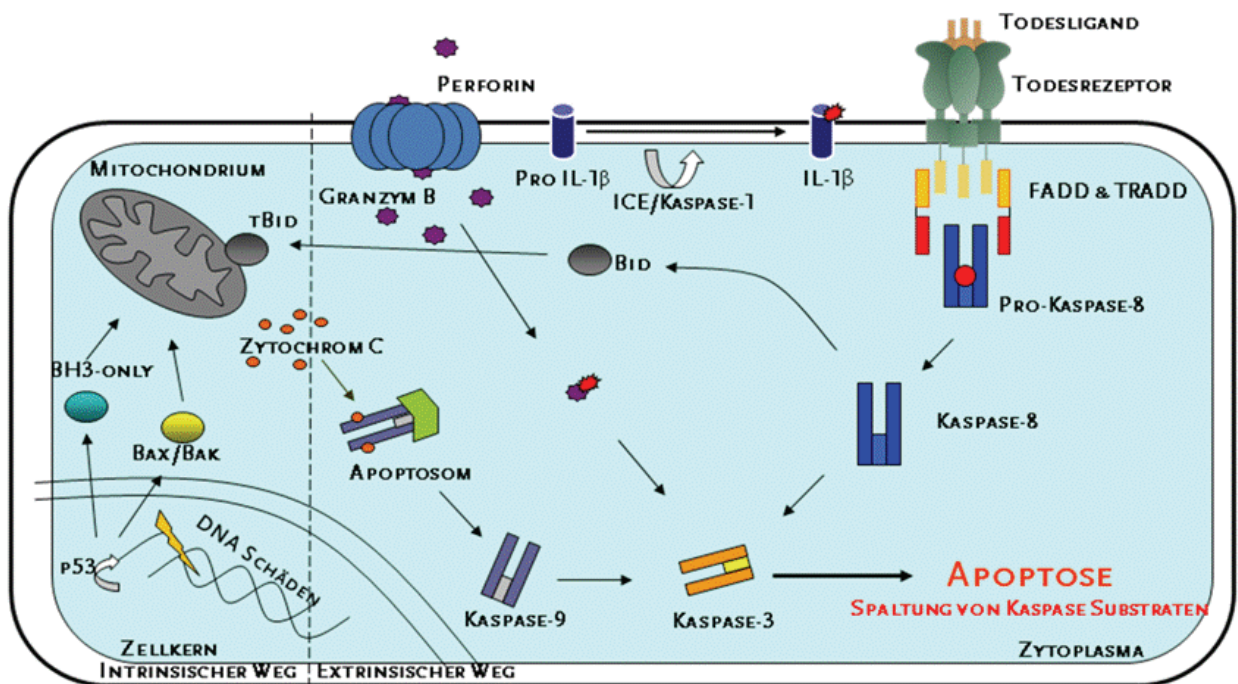


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptose. Die Abbildung verdeutlicht die Zusammenhänge zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Zelltod. Berücksichtigt werden die Induktion via Todesliganden, DNA Schäden, die Wirkung von Perforin und Granzym, sowie die Aktivierung des p53-Gens.

Die Verbindung zwischen der Kaspase-Kaskade und den Mitochondrien wird durch das Mitglied der Bcl-2 Familie Bid gestellt. Bid wird durch Kaspase-8 gespalten und gelangt zu den Mitochondrien, wo es die Freisetzung von Zytocrom C und weiterer mitochondrialer pro-apoptotischer Faktoren in das Zytosol vermittelt (Luo, Budihardjo et al., 1998). Zytosolisches Zytocrom C bindet an monomeres Apaf-1, welches in einer ATP-abhängige Konformationsänderung oligomerisiert und das Apoptosom bildet. Das Apoptosom stellt einen radförmigen Komplex dar, welcher die Aktivierung der Initiator-Prokaspase-9 reguliert (Acehan, Jiang et al., 2002). Aktivierte Kaspase-9 initiiert eine Kaspase-Kaskade unter Beteiligung der Effektor-Kaspasen-3, -6 und -7, resultierend im Tod der Zelle (Slee, Harte et al., 1999). Der Ablauf der Apoptose Induktion über den extrinsischen Signalweg ist schematisch als ein Teil von Abbildung 4 dargestellt.

1.2.7 Intrinsische Induktion

Neben dem extrinsischen Signalweg spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle bei der Integration und Verteilung von pro-apoptotischen Signalen aus dem Inneren der Zelle. Der Zusammenbruch des Membranpotentials ($\Delta\Psi$) von Mitochondrien ist ein fundamentaler Vorgang im Verlauf der Apoptose. Aufgrund dessen werden mitochondriale Proteine, wie zum Beispiel der Apoptose Induzierende Faktor (AIF) oder das Zytocrom C, in das Zytoplasma entlassen (Slee, Harte et al., 1999).

Bei AIF handelt es sich um ein Flavoprotein mit proteolytischer Aktivität, das von sich aus in der Lage ist, Apoptose zu induzieren. Es kann eine Kaspase-Kaskade aktivieren, oder nach Migration in den Nukleus eine DNA-Fragmentierung initiieren, wofür es an die DNA bindet und zur Trennung der einzelnen Nukleosomen führt (Du, Fang et al., 2000).

Zytocrom C ist Teil der Oxidationskette innerhalb der Mitochondrienmembran und wird im Kontext der Apoptose auch als Apaf-2 (Apoptotischer Protease-aktivierender Faktor) bezeichnet. Es spielt eine Rolle bei der Bildung des Apoptosoms, bei der weiterhin Apaf-1 (ced-4) und Apaf-3 (Kaspase-9) rekrutiert werden. Diese drei Proteine aktivieren unter ATP-Verbrauch die Kaspase-9, die nur in Kaspase-Kaskaden involviert ist, welche durch Mitochondrienschäden aktiviert werden (Susin, Lorenzo et al., 1999).

Auf Grund der zentralen Bedeutung, des Verlusts des $\Delta\Psi$ und der Freisetzung mitochondrialer Proteine für die Vermittlung und Verstärkung der Apoptose Signalgebung, unterliegen diese Ereignisse einer strengen Regulation. Die Mechanismen der Regulation sind dabei in vielen Fällen abhängig von Mitgliedern der Bcl-2 Familie (Wang, 2001). Die Komponenten und der Ablauf des intrinsischen Apoptose Signalweges sind zusammenfassend in einem Teil von Abbildung 4 dargestellt.

1.3 Immunmodulation durch Orthopockenviren

Für die erfolgreiche Infektion eines Wirtes muss ein Virus in der Lage sein, dessen Abwehrmechanismen zu umgehen. Zahlreiche Viren besitzen die Fähigkeit, das apoptotische Programm ihrer Wirtszelle zu modulieren. Da Apoptose als wichtiger Abwehrmechanismus gegen die frühe Phase von Virusinfektionen fungiert, ist es im Sinne der meisten Viren, die Signalkaskaden des programmierten Zelltods zu unterbrechen und somit durch Verhinderung des Zelltods die eigene Vermehrung zu optimieren, bzw. die Persistenz im Organismus zu erleichtern. (Roulston, Marcellus et al., 1999).

Andererseits kann eine Virusinfektion auch Apoptose induzieren, wobei in Abwesenheit von Entzündungsprozessen Erreger an Nachbarzellen weitergegeben werden können. Es gibt sogar Viren, die ausgewählte Bereiche der apoptotischen Mechanismen für die Prozessierung eigener Proteine gebrauchen. Um die infizierte Zelle möglichst effektiv zu nutzen, stehen den Viren etliche Strategien zur Apoptose Modulation zur Verfügung (Benedict, Norris et al., 2002).

Im Falle der Poxviridae gibt es für nahezu alle bekannten Apoptose Evasionsstrategien Beispiele, jedoch sind bisher keine Proteine bekannt, die Apoptose induzierende Eigenschaften besitzen (Pogo, Melana et al., 2004).

Im Allgemeinen kann man die virale Immunmodulation, je nach Wirkungsprinzip, in verschiedene Gruppen unterteilen.

1.3.1 Apoptose Induktion durch Pockenviren

Eine Infektion durch Orthopockenviren kann durch das Initiieren angeborener zellulärer Abwehrreaktionen selbst auch als Apoptose Stimulus wirken und Kaspasen oder die BH3-Protein vermittelte intrinsische Kaskaden aktivieren. Daher schützen viele virale Proteine vor der Apoptose Induktion durch cytotoxische T-Zellen und Zytokine (Everett & McFadden, 2002) (Pogo, Melana et al., 2004).

Die Fähigkeit der OPV zur Apoptose Induktion wurde in einigen Fällen durch den Einsatz von *Knock out* Mutanten gezeigt. So konnte ein Kuhpockenvirus, in welchem der Kaspase-Inhibitor CrmA deletiert wurde, Apoptose in Schweinenierenzellen induzieren (Macen, Takahashi et al., 1998). Auch das Vacciniavirus induziert in einigen Zelllinien Apoptose und kann in diesen Fällen nicht effektiv replizieren (Ramsey-Ewing & Moss, 1998).

Wie durch Moss et al. gezeigt, reicht eine Adsorption von Viren nicht für einen apoptotischen Stimulus aus und vermutlich ist dafür die Aufnahme der Viruspartikel in die Wirtszelle notwendig. Für Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten wurde die Apoptose Induktion durch Vacciniaviren mehrfach beschrieben, wobei der Grund dafür noch unbekannt

ist (Baixeras, Cebrian et al., 1998; Engelmayer, Larsson et al., 1999; Humlova, Vokurka et al., 2002). In permissiven Zelllinien findet eine Apoptose Induktion nur nach der Deletion von mindestens zwei viralen Genen (E3L und F1L) statt, wobei angenommen wird, dass Vacciniaviren den apoptotischen Zelltod induzieren, jedoch virale Inhibitoren diesem Prozess entgegenwirken (Wasilenko, Banadyga et al., 2005; Fischer, Ludwig et al., 2006). Seit kurzem ist gezeigt, dass VACV beim Eintritt in eine Wirtszelle Apoptose Mimikry nutzen und durch Makropinozytose aufgenommen werden können (Mercer & Helenius, 2008).

1.3.2 Kaspase-Inhibitoren der Pockenviren und das CrmA Protein

Die Aktivierung von Kaspase-Kaskaden ist ein zentraler und ausschlaggebender Vorgang während der Apoptose. Pockenviren besitzen die Fähigkeit in diese Kaskaden direkt einzugreifen. So ist der zuerst in Kuhpocken beschriebene Kaspase-Inhibitor CrmA ein prominentes Beispiel für eine direkte Kaspase-Blockade (Komiyama, Ray et al., 1994b). Es handelt sich dabei um ein Protein, welches bereits früh während der Infektion exprimiert wird und nach dem Prinzip der Liganden-Mimikry als Pseudosubstrat stabile Komplexe mit Serin- und Cystein-Proteasen bildet (Zhou, Snipas et al., 1997). CrmA weist eine hohe Homologie zur Serpin-Protease Inhibitor Superfamilie (Serpins) auf und inhibiert sowohl Kaspase-1, als auch Kaspase-8, die für die Aktivierung von Interleukin-1 β und die ligandenvermittelte Apoptose Induktion zuständig sind (Dbaibo & Hannun, 1998). Es wurde gezeigt, dass CrmA vor der Apoptose Induktion durch TNF und Fas schützt, jedoch nicht vor intrinsisch induzierter Apoptose (Smith, Strasser et al., 1996a).

Viele Pockenviren besitzen CrmA-Homologe, wobei aus der Familie der Serpine noch weitere pockenvirale Vertreter bekannt sind: SPI-1, SPI-2 (CrmA) und SPI-3 (Nathaniel, MacNeill et al., 2004).

Die OPV kodieren außerdem für sogenannte IAPs (Inhibitors of apoptosis), die eine weitere Möglichkeit der OPV darstellen, Kaspase-Aktivität (in diesem Fall durch Binding und Vermittlung der Ubiquitinierung) zu inhibieren (Li, Liston et al., 2005).

1.3.3 Inhibierung der rezeptorvermittelten Apoptose durch Rezeptormimikry

Pockenviren sind weiterhin in der Lage, die durch Stimulierung von Todesrezeptoren der TNFR-Superfamilie initiierte Apoptose, durch lösliche TNF-Rezeptorhomologe zu unterbinden. Die ersten bekannten Rezeptoren wurden beim Myxomatose Virus und dem Shope Fibrom Virus identifiziert (M-T2 und S-T2) (Smith, Davis et al., 1990; Smith, Davis et al., 1991); weitere auch in Variola- und Vacciniaviren (Panus, Smith et al., 2002). TNF-Bindeproteine ohne Rezeptorhomologien sind zum Beispiel von Tanapocken bekannt

(Brunetti, Paulose-Murphy et al., 2003). Das Molluscum Contagiosum Virus ist in der Lage sogenannte „viral FLICE (Fas-associated death-domain-like interleukin-1 β converting enzyme) inhibitory proteins“, auch vFLIPS, zu exprimieren, die mit den DEDs von FADD und Kaspase-8 interagieren und deren Aktivierung verhindern (Shisler & Moss, 2001).

Pockenviren sind weiterhin in der Lage Modifikationen während der Reifung, der Zusammensetzung und des Exports der MHC Moleküle vorzunehmen. Es besteht die Möglichkeit der Expression von „Killer Cell Inhibitory Receptors“ und „Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors“, um die Wirksamkeit von Killerzellen gegenüber infizierten Zellen herabzusetzen. MHC I Homologe mit NK tötenden Eigenschaften sind ebenfalls bekannt (Everett & McFadden, 2002).

1.3.4 Inhibierung der Mitochondrien-assoziierten Apoptose und das F1L Protein

Im Bereich der Mitochondrien wirken Viren oftmals durch Homologe von Bcl-2 Genen der Apoptose entgegen (Alcami, Ghazal et al., 2002). Avipocken kodieren solche viralen Bcl-2 Homologe (Everett & McFadden, 2001), während die Pockenviren des Säugetiere auf einer anderen Ebene in die mitochondrialen Prozesse eingreifen. Hier kann das M11L Protein des Myxomatose Virus aufgeführt werden, welches in der Mitochondrienmembran lokalisiert und den Austritt des Zytochrom C in das Zytosol verhindert (Everett, Barry et al., 2000; Wang, Barrett et al., 2004). Während Homologe von M11L bei vielen Genera der Pockenviren zu finden sind, verfügen Orthopockenviren über ein weiteres an den Mitochondrien lokalisierendes Protein, welches weder zu M11L, noch Bcl-2 homolog ist. Das F1L Protein wirkt innerhalb der Mitochondrien ähnlich auf Membranpotential und Zytochrom C Freisetzung (Stewart, Wasilenko et al., 2005), während es inhibierend auf die Aktivierung von Bak wirkt (Wasilenko, Banadyga et al., 2005; Taylor, Quilty et al., 2006). F1L besitzt eine Bcl-2-ähnliche Domäne, die ein BH3-Bindungsprofil aufweist (Kvansakul, Yang et al., 2008). Zudem wurde gezeigt, dass der Vaccinia Growth Factor (VGF) das Überleben infizierter Zellen sichert, indem er synergistisch mit F1L wirkt und den EGF-Rezeptor Signalweg (der extrinsisch durch EGF und TGF- α aktiviert wird) unterdrückt (Postigo, Martin et al., 2009).

1.3.5 Das P28 Protein

1994 wurde ein pockenvirales 28 kD Protein entdeckt, welches ein RING Zink Finger Motiv enthält und in Mäusen einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (Senkevich, Koonin et al., 1994). Das P28 wirkt oberhalb von Kaspase-3 nach einer UV-vermittelten Apoptose Induktion (Brick, Burke et al., 2000). Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass das Protein eine E3 Ubiquitin Ligase Aktivität besitzt (Huang, Huang et al., 2004) und vermutlich

einen zellulären Ursprung aufgrund seiner Homologie zur N1R Genfamilie besitzt (Nicholls & Gray, 2004). 2005 wurde schließlich gezeigt, dass P28 nach seiner selbstvermittelten Ubiquitinierung in der Umgebung von Virusfabriken lokalisiert, wobei die RING-Domäne unverändert bleibt (Nerenberg, Taylor et al., 2005). Trotz zahlreicher Publikationen P28 betreffend bleibt der Mechanismus der P28-Apoptose Modulation unbekannt.

1.3.6 v-GAAP –ein neuartiger Apoptose Inhibitor der Orthopockenviren

Kürzlich ist ein weiterer Apoptose Inhibitor bei VACV und CMLV beschrieben worden, der in ähnlicher Form auch in eukaryontischen Zellen zu finden ist. Das sogenannte Golgi anti-apoptotische Protein, das in seiner viralen Form als v-GAAP (in der humanen als h-GAAP) bezeichnet wird, schützt vor intrinsischen und extrinsischen apoptotischen Stimuli, wobei die Abwesenheit eines funktionalen h-GAAP in eukaryontischen Zellen Apoptose induziert. Deletionsmutanten von v-GAAP zeigten eine herabgesetzte Virulenz im murinen Modell, während die Funktionsweise des Proteins unbekannt bleibt. Dieser neue Apoptose Modulator scheint stark konserviert in Pflanzen, Insekten, Amphibien, Säugern und Pockenviren (Gubser, Bergamaschi et al., 2007).

1.4 siRNA als Alternative zu viralen Knock out Mutanten

Die Funktionsmechanismen der oben genannten pockenviralen Proteine sind zu unterschiedlich großen Anteilen hauptsächlich für VACV bekannt. Auch wenn die Apoptose Modulation für alle Proteine angenommen werden kann, so ist wenig über ihre Effekte auf die Virusreplikation unter verschiedenen Bedingungen bekannt. In diesem Zusammenhang kommt in dieser Arbeit die Technologie der RNA-Interferenz (RNAi) zum Einsatz, welche einen gezielten *Knock down* und somit die Untersuchung der Funktion von Genen möglich macht und eine zeitintensive Generierung von Deletionsmutanten umgeht.

Der Einsatz von kurzen interferierenden RNAs (*engl: short interfering RNA*, siRNA) mittels Transfektion kann speziell dazu genutzt werden, die Expression pockenviraler Proteine in infizierten Zellen zu supprimieren und ihre Notwendigkeit für die virale Replikation *in vitro* zu untersuchen. Eine Anwendung auf Zelllinien und primären Zellen ist durch die Nutzung einer auf Transfektion basierenden Technologie möglich. Sie erlaubt die Diskriminierung der vorhandenen Regulationsmechanismen zwischen Zelllinien (mit zum Teil fehlenden Regulationsmechanismen, inklusive einer geringeren Anfälligkeit für virale Immunmodulatoren), und primären Zellen (die auch begrenzt Aussagen über *in vivo* Systeme erlauben).

Der Einsatz von siRNA ist kurzfristig möglich. Nach Computer gestütztem Design können entsprechende Oligonukleotide synthetisiert und in Expressionsplasmide ligiert werden. Durch Transfektion wird die genetische Information für die siRNA in Zielzellen gebracht, die zudem eine Antibiotikaresistenz oder einen Fluoreszenzmarker auf demselben Plasmid erhalten. In dieser Arbeit wurde das siSTRIKE™ U6 hairpin cloning system (Promega) verwendet, welches gegenüber chemisch synthetisierter siRNA sowohl ökonomische Vorteile als auch eine längere Stabilität bietet, da die Sekundärstrukturen *in situ* gebildet werden können (Fuchs, Welk et al., 2004). Die 19-21 bp langen siRNA Oligonukleotide werden inklusive einer Loop-Sequenz als *short hairpin RNA* (shRNA), die von Strang und Anti-Strang flankiert werden, in 60 bp langen Oligonukleotid Ketten synthetisiert und nach Klonierung auf ihre Effektivität hin untersucht. Komplette synthetische shRNA hat zudem den Nachteil, dass die RNAi-Maschinerie der Zelle durch den raschen Konzentrationsanstieg hohem Stress ausgesetzt wird.

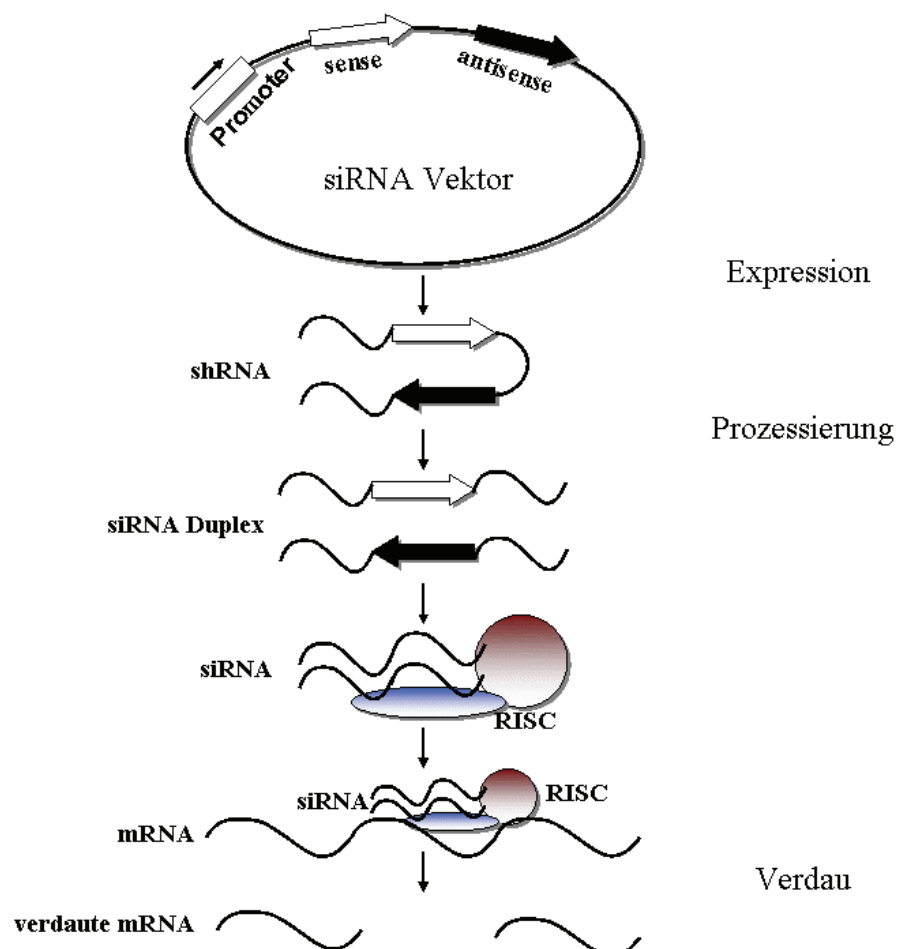


Abbildung 5: Mechanismus der RNA Interferenz. Nach der Prozessierung wird die vom shRNA Vektor exprimierte siRNA in einen Multi-Protein-Komplex bekannt als RISC (siehe Text) integriert. Homologie zwischen dem sense Strang der siRNA und der mRNA erlaubt eine Bindung der RISC Nuklease und einen Verdau des Transkriptes.

Nach erfolgreicher Transfektion wird die siRNA in Zielzellen exprimiert und führt im Idealfall zur spezifischen Degradation der Ziel-mRNA (Caplen & Mousses, 2003) wobei dsRNA von einer als Dicer bezeichneten RNase erkannt und in 21-23 bp große siRNA zerschnitten wird (Bernstein, Denli et al., 2001; Elbashir, Lendeckel et al., 2001; Agrawal, Dasaradhi et al., 2003; Hammond, 2005). Die siRNA wird in einen RNAi Zielkomplex (RISC – RNA-induced silencing complex) eingebaut, welcher homologe mRNA durch enzymatische Spaltung zersetzt und so die Expression unterdrückt (Elbashir, Lendeckel et al., 2001). Der Vorgang ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

In dieser Arbeit wurde siRNA gegen pockenvirale Immunmodulatoren von VACV und CPXV entworfen, um die Technologie für virologische Anwendungen zu evaluieren und den Einfluss des *Knock down* der genannten Genprodukte auf die Virusreplikation in Zelllinien und primären Zellen zu untersuchen.

1.5 Einsatz neuartiger DNA basierter IgY Antikörper in der Virologie

Die Erforschung von Mechanismen der viralen Pathogenese erfordert häufig den Einsatz spezifischer Antikörper (Ak) zur Charakterisierung einzelner Proteine und ihrer Funktion. Auch bei der Diagnostik von Infektionskrankheiten spielen Ak eine wichtige Rolle. Die kommerzielle Verfügbarkeit solcher Ak ist leider oft gering. In diesen Fällen werden Ak für spezielle Anwendungen üblicherweise in Mäusen oder Kaninchen in eigener Produktion gewonnen, oder in Form einer Dienstleistung durch Dritte, die jedoch sehr teuer sein kann. Dazu wird die *in vitro* Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen vorausgesetzt, die man für die Immunisierung verwendet. Üblicherweise wird nach der Immunisierung mit dem Protein der Verlauf der Ak-Entwicklung dokumentiert. Ist der Ak-Titer hoch genug, so werden aus dem Blut des Tieres polyklonale Ak gewonnen. Werden monoklonale Ak benötigt, so werden Hybridomazelllinien erstellt, die eine Fusion aus selektionierten, Ak-sezernierenden Milzzellen der immunisierten Maus und einer immortalisierten Zelllinie entstehen. Dies bedeutet in jedem Fall die Tötung der Maus.

Seit 1969 sind IgG-ähnliche Moleküle im Serum des Huhns bekannt (Leslie & Clem, 1969). Aufgrund ihres verstärkten Vorkommens auch im Eigelb wurden diese als IgY (engl.: yolk = Eigelb) bezeichnet und konnten bisher in allen untersuchten Vogelspezies gefunden werden. Seit 2004 ist das Genom des Huhns entschlüsselt und bietet die Möglichkeit der gezielten Suche nach Proteinen des aviären Immunsystems, und dessen Charakterisierung für viele Teilgebiete der Immunologie und verwandter Wissenschaften (Davison, Kaspers et al., 2008). Diese Immunglobuline bieten eine Alternative zu IgG aus Mammalia und haben diesen gegenüber einige besondere Vorteile (Sharma, 1997). So ist der Mechanismus der B-Zell-

Differenzierung in Hühnern von dem in Säugern unterschiedlich (Pink, Vainio et al., 1985; Reynaud, Dahan et al., 1989), was dazu führt, dass in Hühnern andere Epitope immunogen wirken können. Somit können Ak gegen Proteine hergestellt werden, die in Säugern als schwierig gelten oder so stark konserviert sind, dass sie in Mäusen oder Kaninchen gar nicht immunogen wirken (De, Pastoureau et al., 2001; Tini, Jewell et al., 2002; Klimentzou, Paravatou-Petsotas et al., 2006). Die geringe Kreuzreaktivität zwischen IgY und Ak aus Säugern ist ein großer Vorteil in Detektionssystemen, besonders dann, wenn diese mit einer Vielzahl von Ak simultan arbeiten (Larsson, Balow et al., 1993; Carlander, Stalberg et al., 1999). Schließlich bietet die Anwendung von IgY im Vergleich zu anderen Systemen eine hohe Ausbeute an Ak: Ein Eigelb kann 5-25 mg/ml Ak enthalten (Rose, Orlans et al., 1974; Schade, Calzado et al., 2005) und somit könnten theoretisch bis zu 40 g spezifisches IgY pro Jahr und Huhn gewonnen werden. Dies entspricht der Menge an Ak, die in derselben Zeit aus 40 Kaninchen gewonnen werden kann, die, im Gegensatz zu den Hühnern, für die Gewinnung dieser Ak-Mengen letztlich getötet werden müssen (Mine & Kovacs-Nolan, 2004). Da die Probennahme für die Isolierung von IgY-Ak aus dem Einsammeln von Eiern besteht, ist diese Methode nicht invasiv (Schade, Burger et al., 1994). Weiterhin bedeutet das auch wegen der hohen erreichten Ak-Titer eine Stressreduktion für die Versuchstiere (Schade, Pfister et al., 1991), sowie eine Reduktion der benötigten Tieranzahl (Gassmann, Thommes et al., 1990).

Deshalb gilt die IgY-Technologie heutzutage als tierschonende Alternative zur traditionellen Produktion polyklonaler Ak in Mammalia. Abgesehen von der Verwendung von Ak in analytischen und diagnostischen Verfahren (Narat, 2003), können aviäre Ak auch als therapeutische und prophylaktische Ak interessant werden, nicht zuletzt weil kostengünstig enorme Mengen von hochtitrigen Ak produziert werden können. Inzwischen ist die Anwendung prophylaktischer Ak (zum Beispiel bei Menschen und in der Rinderzucht gegen gastrointestinale Pathogene) etabliert. Zudem ist die Anwendung therapeutischer Ak (in Form von IgY [DeltaFc] aus Enten gegen Schlangengift von Kobra und Krait (Chiou, 2008) oder als Huhn-IgY gegen Parodontose (Yokoyama, Sugano et al., 2007a) publiziert (Übersicht bei Kovacs-Nolan und Mine, 2004, Van Nguyen et al., 2006, Nilsson et al., 2007, Yokoyama et al., 2007, Meenatchisundaram et al., 2008 (Kovacs-Nolan & Mine, 2004; Van, Umeda et al., 2006; Nilsson, Osmark et al., 2007; Yokoyama, Sugano et al., 2007b; Meenatchisundaram, Parameswari et al., 2008)).

Neben der klassischen Immunisierung durch Injektion eines Antigen-Adjuvanz-Gemisches wird in Säugern seit einigen Jahren die DNA-Immunisierung mit Plasmiden angewendet (Wolff, Malone et al., 1990; Wolff, Ludtke et al., 1992). Durch die Verwendung *in vivo*

exprimierbarer DNA als Vakzin entfällt die Notwendigkeit der *in vitro*-Proteinexpression und Aufreinigung. Das durch die DNA kodierte Protein wird im Gewebe des immunisierten Tieres unter der Kontrolle eines starken Promoters exprimiert (Davis, 1997) und erreicht dort häufig die naturidentische Konformation aufgrund von post-translationalen Modifikationen. Außerdem ermöglicht die DNA-Vakzinierung effiziente Modifikationen im Sinne einer Codon-Optimierung für höhere Expressionsraten durch Vermeidung seltener tRNA-Spezies (Grosjean & Fiers, 1982), genauso wie die schnelle Selektion von immunogenen Subdomänen für eine Immunisierung. Derartige Modifikationen werden lediglich auf DNA-Ebene durchgeführt und erfordern keine Proteinexpression *in vitro*.

In der Regel werden bei der DNA-Vakzinierung die Versuchstiere entweder durch Injektion oder mit der Gene-Gun-Methode durch ein Expressions-Plasmid immunisiert. Die DNA-Vakzinierung wurde bei Hühnern bereits experimentell eingesetzt, jedoch nicht zur Generierung polyklonaler Ak, sondern im Rahmen einer Impfstrategie zum Schutz der Hühner vor Coccidiose (Klotz, Gehre et al., 2007; Xu, Song et al., 2008) oder vor Influenzaviren nach Verimpfung eines HA-Gen-Expressionsplasmides (Jiang, Yu et al., 2007).

Kürzlich wurde ein DNA-Vakzin verwendet, um in Enten Hepadnavirus-spezifische Ak herzustellen (Abouzid, Ndeboko et al., 2005). In einem weiteren Ansatz wurden komplette, inaktivierte SARS-Coronavirus-Partikel zur Generierung von IgY gegen SARS-Coronaviren eingesetzt (Fu, Huang et al., 2006). Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass die Viruspartikel mit effizienten Methoden inaktiviert werden müssen, um die Gefahr einer Infektion auszuschließen, die Proteine des Virus dabei jedoch ihre natürliche Konformation häufig verlieren und dadurch die generierten Ak native Proteine nicht mehr erkennen können. Bei einer nicht ausreichenden Inaktivierung besteht des Weiteren ein Risiko für den Bestand der Tierversuchsanlage.

Eine detaillierte Darstellung von Protokollen zur DNA-Immunisierung von Hühnern ist nicht bekannt.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Das Projekt soll sich insbesondere mit der Etablierung von Methoden zur Untersuchung der Mechanismen der Apoptose Inhibition von CrmA, F1L und p28 und ihrer Anwendung beschäftigen. Außerdem gehört zu den Zielen des Projektes die Klärung folgender Fragestellungen:

1. Exprimieren alle OPV in verschiedenen Zelllinien die Gene crmA, p28 und F1L?

Da OPV sehr unterschiedliche Wirtstropismen aufweisen, kann ein Unterschied in der Zusammensetzung der exprimierten Proteine ausschlaggebend für die Virusvermehrung sein. Für die Untersuchung pockenviraler Gene sollte zunächst ihre Expression nachgewiesen werden.

2. Werden alle 3 Gene exprimiert oder nur eine Auswahl?

3. Wie schnell werden diese Gene nach der Infektion exprimiert?

Für die Immunevasion ist eine rasche Expression von Immunmodulatoren notwendig. Durch eine Verzögerung der Immunantwort des Wirtes kann das Virus sich wertvolle Zeit für seine Replikation erkaufen. Diese Frage kann durch die Erstellung von Wachstumskinetiken beantwortet werden.

4. Enthalten Viruspartikel bereits diese mRNAs?

Bei Pocken wird vermutet, dass sie bereits mRNA für früh benötigte Proteine mit in eine Wirtszelle bringen. Die Einbringung von Transkripten für Immunmodulatoren kann mithilfe spezifischer qPCR von aufgereinigten OPV Virionen untersucht werden.

5. Gibt es Unterschiede zwischen nicht-pathogenen und humanpathogenen OPV?

VARV und CMLV verfügen über einen engen Wirtsbereich und haben in ihren Wirtsspezies oft einen schweren Verlauf, während CPXV und VACV sich umgekehrt verhalten. Das Expressionsmuster von Wirtsbereichs-Faktoren trägt höchstwahrscheinlich zu dieser Erscheinung bei, kann allerdings nicht für VARV bestimmt werden.

6. Kann man in OPV infizierten Zellen genauso Apoptose induzieren, wie in nicht infizierten Zellen?

Wie stark und wie lange können OPV den apoptotischen Prozess hinauszögern? Durch den gezielten Einsatz von Apoptose Induktoren können diese Prozesse unter Umständen sogar quantifiziert werden.

7. Verhindert die Expression der Proteine CrmA, p28 und F1L in humanen Zellen die Auslösung der Apoptose durch verschiedene Induktoren? Wie effektiv und wirksam sind einzelne pockenvirale Proteine außerhalb eines infizierten Systems?

8. Welche Apoptose Signalwege sind betroffen?

Durch den Einsatz spezifischer Marker für zelluläre Proteine kann die Aktivierung bestimmter apoptotischer Kaskaden nachverfolgt werden.

9. Was geschieht, wenn man diese Gene in transfizierten oder infizierten Zellen gezielt ausschaltet? Hat das einen Einfluss auf die Virusreplikation?

Die Klärung dieser Fragen könnte wesentliche Einblicke in die Pathogenese-Mechanismen der OPV liefern und damit neue Ziele für eine Therapie bzw. Prävention identifizieren.

Durch verschiedene Arten der Apoptose Induktion in OPV infizierten Zellkulturen, kann gezeigt werden, ob die Infektion der Zellen im gegebenen Zell-Virus System zu einer generellen Inhibition der Apoptose führt, oder ob nur einzelne Signalwege betroffen sind. Dies könnte dann relevant sein, wenn entweder nicht alle der drei genannten Gene von dem verwendeten Virus exprimiert werden, oder aber noch nicht charakterisierte virale Faktoren eine Rolle spielen.

Zur Aufklärung der Funktion der Proteine CrmA, P28 und F1L können die entsprechenden Proteine in Expressionsvektoren kloniert und in OPV suszeptiblen humanen Zellen, auch in Kombinationen, transfiziert werden. Die Verwendung der entsprechenden Vektoren erlaubt die Markierung der exprimierten Proteine mit fluoreszierenden Markern oder deren Identifizierung in der Fluoreszenzmikroskopie mit Hilfe spezieller Antikörper. Anschließend wird in diesen Zellen auf verschiedene Arten Apoptose induziert und der Anteil apoptotischer Zellen quantifiziert, wobei auch hier Apoptose Marker verwendet werden, die repräsentativ für die verschiedenen Apoptose Signalwege sind. Durch eine Mehrfachfärbung kann gezeigt werden, ob transfizierte Zellen sich bei Apoptose Induktion anders verhalten als nicht transfizierte Zellen und damit kann auch die Rolle der einzelnen Proteine CrmA, P28 und F1L bei der Apoptose Inhibition gezeigt werden. Hierbei wird das bereits hochgradig charakterisierte Protein CrmA als eine Art Standard genutzt. Ein weiterer interessanter Aspekt ist es zu untersuchen, ob transfizierte Zellen bei Infektion mit OPV ein anderes Replikationsverhalten zeigen und das zu Veränderungen bei den entstehenden Virustitern führt.

Weiterhin sollen kommerziell erhältliche Antikörper für anti-apoptotische Proteine evaluiert werden und in den etablierten Methoden zum Einsatz kommen.

Letztlich sollen siRNAs hergestellt werden, mit denen die Gene crmA, p28 und F1L in infizierten Zellkulturen gezielt ausgeschaltet werden können. In infizierten Zellkulturen kann so gezeigt werden, wie wichtig die Expression dieser Gene für die Virusreplikation ist. Darüber hinaus besteht so die Möglichkeit, die Existenz von noch unbekannten Apoptose Modulatoren der OPV zu finden.

2 Methoden

2.1 Allgemeines

Die folgenden Arbeiten wurden zum größten Teil in den Laboratorien des Zentrums für Biologische Sicherheit 1 am RKI durchgeführt. Einige Großgeräte, wie das Konfokale Laserscanning Mikroskop oder die FACS-Geräte LSRII und FACSAria II wurden durch das RKI zur Verfügung gestellt.

Die Immunisierung der Hühner zur Antikörpergenerierung und deren Aufreinigung fand in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmakologie der Charité Berlin (Prof. Rüdiger Schade), den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin (FEM) (Dr. Stefan Nagel) und der Arbeitsgruppe ZBS4 statt. Die Arbeiten dazu wurden an den Standorten FEM und Charité Mitte durchgeführt.

2.2 Zellkulturtechnik

2.2.1 Zellkultur zur Anzucht von Zelllinien

Sämtliche Arbeiten für die Zellkultur wurden innerhalb einer sterilen Sicherheitswerkbank in einem L2/L3**-Labor durchgeführt. Es erfolgte eine strenge räumliche Trennung von infizierten und nicht-infizierten Kulturen.

In der Regel wurden alle Zellen in D-MEM Medium (Glutamingehalt 1%, FKS Gehalt 5-10%) bei 37°C und einem CO₂ Gehalt in der Luft von 5% in einem feuchten Brutschrank kultiviert.

Das Umsetzen der Zellen fand je nach Zelldichte und -bedarf statt und erfolgte bei adhärenenten Zellen unter Einsatz von Trypsin-EDTA (1:2) zum Ablösen und zum Verhindern von Klümpchenbildung.

Außer der Kultivierung in Kulturgefäßen und Mikrotiterplatten erfolgte eine Anzucht auf Objektträgern und Deckgläschen, um eine direkte Immunfluoreszenzfärbung des Zellrasens zu ermöglichen.

Zur längeren Aufbewahrung wurden die Zellen in einem DMSO-FKS (1:9) Gemisch aufgenommen und in Stickstoffbehältern gelagert.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von primären Zellen

Für die Isolierung von primären Hühnereifibroblasten (primary Chicken Embryonic Fibroblasts, pCEF) wurden 11 Tage alte, bebrütete Hühnereier benötigt. Diese wurden mittels einer Lampe geschiert, um den Zustand des Embryos zu prüfen. Die Luftblase im Ei wurde mit einem Marker angezeichnet. Anschließend wurde das Ei 30 min bei -20°C gekühlt, um

den Embryo abzutöten. Die Oberfläche des Eis wurde desinfiziert. Danach wurde mit Hilfe einer Schere und einer Pinzette die Eierschale um die Luftblase herum entfernt, ohne die Chorioallantoismembran (CAM) zu verletzen. Nun wurde mit einer neuen Pinzette an der geöffneten Stelle die CAM entfernt, der Embryo entnommen und in eine offene, sterile Petrischale gelegt. Anschließend wurden die Extremitäten, der Kopf, sowie die inneren Organe entfernt. Der Torso wurde in eine neue Petrischale überführt und mit einer Schere zerkleinert. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin (ohne EDTA) wurde mit einer Pipette das Zell-Trypsin-Gemisch homogenisiert, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min inkubiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Sediment wurden 10 ml Trypsin pipettiert, gut gemischt und in einen Erlenmeyerkolben transferiert, wo das Gemisch 30 min bei Raumtemperatur langsam gerührt wurde. Erneut wurde das Gemisch in ein Zentrifugenröhrchen pipettiert und 5 min inkubiert. Der Überstand wurde in einem neuen Zentrifugenröhrchen 10 min bei 250x g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 10 ml DMEM-Medium (5% FKS, 1% Glutamin) versetzt und gut gemischt. Die Zellzahl wurde mikroskopisch mit einer Neubauer Kammer bestimmt und $1,5 \times 10^6$ Zellen pro 25 cm² Kulturflasche eingesät. Nach 24h wurde das Medium gewechselt.

2.2.3 OPV Infektionen von Zellkulturen

Alle infektiösen Arbeiten wurden unter L2/L3**-Bedingungen durchgeführt. Infektionen wurden in der Regel in Mikrotiterplatten durchgeführt und es wurde mit einer „Multiplicity of Infection“ (MOI) von 0,1 bis 10 infiziert. Zur Infektion wurde eine entsprechende Menge des gewünschten Virus, das üblicherweise im Zellkulturmedium vorliegt und bei -80°C gelagert wird, zügig im warmen Wasser aufgetaut.

Die Zellen wurden mit einer zuvor entsprechend der MOI bestimmten Menge virushaltigem Medium versetzt, geschüttelt und bei Standardbedingungen 1h inkubiert. Als nächstes wurden die Zellen mit frischem Medium gewaschen und schließlich, wie üblich, weiter kultiviert.

2.2.4 Zellkultur zur Anzucht von Viren

Für die geplanten Versuchsreihen mussten vorab ausreichende Virusstocks angelegt werden. Die Virusanzucht erfolgte auf HEp-2 Zellen von denen 2×10^7 in eine T175 Kulturflasche eingesät wurden. Die Zellen wurden mit einer geeigneten MOI, die in Vorversuchen bestimmt wurde, infiziert. Hierzu wurde das Kulturmedium aus den Kulturflaschen abgegossen. Die Virusstocklösung wurde entsprechend der einzusetzenden MOI mit 5-10 ml des Kulturmediums verdünnt und auf die HEp-2 Zellen gegeben, da die Infektion in einem möglichst geringen Volumen durchgeführt werden sollte. Nach der Zugabe der Viruslösung

wurden die Kulturflaschen leicht geschwenkt, um das Virus enthaltende Medium gleichmäßig zu verteilen. Anschließend wurden die Kulturflaschen bei Standardbedingungen für 2h inkubiert, wobei das regelmäßige Schwenken zu einer besseren Verteilung der Viruslösung auf dem Zellrasen führte. Anschließend wurden 10-15 ml frisches Kulturmedium draufgegeben und die Kulturflaschen erneut inkubiert. Die Infektionsdauer lag bei 3-5 Tagen (abhängig von der Virusspezies) bzw. solange bis der zytopathische Effekt (CPE) sichtbar wurde und die Mehrheit der Zellen sich durch Schwenken bzw. durch leichtes Klopfen auf die Kulturflasche ablösen ließ. Lösten sich nach einer ausreichenden Inkubationszeit nicht alle Zellen durch Abklopfen ab, so konnte diese durch einen Zellschaber abgekratzt werden.

2.2.5 Virusaufreinigung aus Anzuchtkulturen

Nach der Virusanzucht und dem Ablösen der infizierten Zellen wurden diese zusammen mit dem Kulturmedium in Zentrifugenröhrchen (50 ml bzw. 15 ml) überführt. Um die Zellen, die die intrazellulären reifen Virionen (intracellular mature virion, IMV) enthielten, zu pelletieren, wurde eine Zentrifugation bei 500x g und 4°C für 10 min durchgeführt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand (ÜS) verworfen und die Zellpellets in je ca. 3 ml PBS „ohne“ resuspendiert und anschließend vereinigt (nicht mehr als 20 ml pro 50 ml Zentrifugenröhrchen). Um einen besseren Zellaufschluss zu erreichen, wurden der Zellsuspension Glaskügelchen zugegeben (0,5 – 1 cm Füllhöhe pro Röhrchen). Durch wiederholtes Frieren und Tauen sowie durch Vortexen in Anwesenheit der zugegebenen Glaskügelchen wurde der Zerfall der Zellen erreicht. Beide Vorgänge wurden 2-3x wiederholt. Nach dem Aufschluss wurden die Zelltrümmer durch eine Klärzentrifugation bei 250x g und 4°C für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, während das Pellet erneut in 4 ml PBS „ohne“ resuspendiert und bei gleichen Bedingungen zentrifugiert wurde. Die ÜS wurden vereinigt. Bei einem milchig getrübbten ÜS sollte die Zentrifugation wiederholt werden, da bei einer starken Verunreinigung mit Zelltrümmern die Gefahr eines Durchbruchs des Zuckerkissens bei der Ultrazentrifugation bestand.

Um Aggregate, die beim Zellaufschluss entstanden, aufzulösen, wurden die Zentrifugenröhrchen 3x im Ultraschallbad im Eiswasser beschallt. Nach dem Ultraschallbad konnte die Virussuspension bis zur weiteren Aufreinigung bei 4°C gelagert werden.

2.2.5.1 Zentrifugation durch ein Zuckerkissen

Für die Ultrazentrifugation durch ein Zuckerkissen wurde zuerst eine 30%-ige Saccharose-Lösung in PBS „ohne“ angesetzt und anschließend durch ein 0,45 µm Filter sterilfiltriert.

Für die Ultrazentrifugation wurden SW40Ti Röhrchen mit 5 ml 30%-iger Saccharose-Lösung befüllt. Auf diese Zuckerlösung wurde vorsichtig die Virussuspension bis zu ca. 0,5 cm unter den Rand des Röhrchens aufgeschichtet. Das Befüllen der Röhrchen sollte nur tropfenweise erfolgen, da sich sonst die beiden Lösungen vermischten. Nach dem Befüllen wurden die Röhrchen gewogen und das Gewicht durch Zugabe von PBS „ohne“ angeglichen. Die Ultrazentrifugation wurde bei 160.000x g und 4°C für 1h durchgeführt.

Nach der Zentrifugation befand sich unter der Saccharoseschicht ein Viruspellet. Dieses wurde in einem möglichst geringen Volumen (1-2 ml) PBS „ohne“ resuspendiert. Die entstandene Virussuspension wurde wiederholt (3-5x) gevortext und in einem Eisbad mit Ultraschall beschallt.

2.2.6 Bestimmung des Pockentiters durch einen Plaque-Titrationstest

Der Plaque Titrationstest wurde durchgeführt, um die Anzahl infektiöser Partikel innerhalb einer Probe festzustellen. Es handelte sich hierbei um eine direkte Methode, die intakte und replikationsfähige Viruspartikel durch entstehende Plaques sichtbar macht. Sie wurde verwendet, um die Viruskonzentrationen der in der Anzucht angelegten Vorräte festzustellen, als auch um die Virusreplikation unter bestimmten Bedingungen zu testen.

Der Test wurde auf Vero E6-7 Zellen durchgeführt, die sich aufgrund ihrer Morphologie besonders gut dafür eignen, einen einheitlichen Zellrasen zu bilden.

Zunächst wurden in einer 24er Mikrotiterplatte je Kavität 200 µl der Vero-Zellsuspension mit einer Zellzahl von $1,5 \times 10^6$ /ml Zellen ausgesät. Eine Verdünnungsreihe der Virussuspension mit Verdünnungen von 1:10 bis 1:10⁶ in Kulturmedium wurde angelegt und jeweils 200 µl dieser Virusverdünnung pro Kavität pipettiert und durch eine Schaukelbewegung gemischt. Die infizierten Zellen wurden 5 h bei Kulturbedingungen inkubiert und mit je 400 µl 1,6%-iger Cetyl Methyl Celluloselösung (CMC), die die Viren im Überstand festhält und Folgeinfektionen innerhalb der Kultur verhindert, überschichtet. Es folgten 3-4 Tage Inkubation bei Kulturbedingungen. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen 20 min in 4% Formalin fixiert. Es folgte eine Behandlung mit 0,1% Naphtalenblack (10 min), um intakte Zellen zu färben.

Die bei der Färbung entstehenden ungefärbten Plaques konnten nun ausgezählt werden. Man geht davon aus, dass ein Plaque für ein „Plaque Forming Unit“ (PFU) steht, welches bei hohen Verdünnungen statistisch gesehen ein replikationsfähiges Viruspartikel darstellt. Die Verdünnung der eingesetzten Virusstocks musste bei der Berechnung des Titers entsprechend berücksichtigt werden.

2.2.7 Bestimmung des neutralisierenden Titers von Antikörpern mittels Plaque-Neutralisationstest

Der klassische Neutralisationstest (NT) wurde nach dem gleichen Prinzip wie ein Plaque-Titrationstest durchgeführt (siehe oben). Um einen neutralisierenden Titer zu bestimmen, wurden zunächst Antikörper- oder Serumpräparationen der gewünschten Proben 1 h bei 56°C inaktiviert (Inaktivierung von Komplementproteinen im Serum), sterilfiltriert und es wurden Verdünnungsreihen dieser Präparate erstellt, welche mit Virus (MOI 0,1) für 2h bei 37°C vorinkubiert wurden. Anschließend wurde das vorbehandelte Virus auf zuvor ausplattierte VERO E6-7 Zellen ausgebracht. Es folgte, eine Übersichtung mit CMC und eine Färbung und Plaqueauszählung nach ca. 4 Tagen nach Infektion (*post infection* = p.I.) Die höchste Verdünnungsstufe des Serums, die zu einer Plaquereduktion von 50% führte, wurde als neutralisierender Titer bezeichnet. Als Kontrollen wurden AK-Präparationen mit bekanntem neutralisierendem Titer, sowie infizierte Zellen, mitgeführt.

2.2.8 Expression viraler Proteine *in vitro* durch Transfektion humaner Zelllinien

Transfektionen zum Einbringen von Fremd-DNA in Eukaryontenzellen wurden durchgeführt, um pockenvirale Proteine außerhalb des in infizierten Zellen vorhandenen viralen Proteoms zu exprimieren. So sollte ein Effekt auf die Apoptose Induktion im Einzelnen untersucht werden. Alle Transfektionen wurden mit Hilfe von Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland), einem Gemisch aus kationischen Lipiden, welche negativ geladene Nukleinsäuren komplexieren, durchgeführt. Als Medium für den Transfektionsmix wurde OPTI-MEM (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) verwendet.

Es wurden für eine Standardtransfektion 1×10^5 Zellen/Kavität in einer 24er Mikrotiterplatte ausgesät und 4-8 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mikroskopisch auf Konfluenz überprüft. Diese sollte möglichst 50-70% betragen. Das Medium wurde gewechselt und durch 100 µl frisches, vorgewärmtes DMEM (5% FKS, 1% Glutamin) ersetzt. Es wurden pro Ansatz 2,0 µg der zu transfizierenden DNA in 50 µl OPTI-MEM aufgenommen und 5 min inkubiert. Außerdem wurden getrennt davon pro Ansatz 3 µl Lipofectamine mit 50 µl OPTI-MEM gemischt. Die beiden Ansätze wurden vorsichtig kombiniert und 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl des Transfektionsmixes vorsichtig in die Zellkultur gegeben, 6-8 h inkubiert und zwischendurch geschwenkt. Danach sollte aufgrund von Zytotoxizitätseffekten des Lipofectamins das Medium durch frisches ersetzt werden.

2.2.9 Zellsortierung zur Anreicherung transfizierter Zellen

Im Falle der Transfektion mit siRNA oder Expressionsvektoren für virale Proteine wurde in einzelnen Fällen eine Zellsortierung durchgeführt, die die Anzahl nicht-transfizierter Zellen in der Kultur auf ein Minimum reduzieren sollte. Hierfür wurden die Geräte FACSDiva und FACSARIA der Firma Becton Dickinson verwendet.

Nach einer Transfektion im 75 cm² - Zellkulturflaschenformat wurden die entsprechenden Zellen durch Trypsinbehandlung abgelöst und in optischem D-MEM Medium mit Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) bei 4°C aufgenommen. Die Sortierung wurde unter semi-sterilen Bedingungen bei einer Flussrate von ca. 20.000 Ereignissen pro Sekunde durchgeführt. Zur Anwendung kamen 70 - 100 µm Kanülen. Nach dem Sortierungsprozess wurden die Zellen bei 4°C gelagert, bis sie in Standardmedium mit Antibiotika gewaschen und kultiviert werden konnten.

2.2.10 Zellanalyse durch Impedanzmessung - das xCELLigence System

Das xCELLigence System (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) basiert auf einer neuartigen Technologie, welche real-time Beobachtung der Zellkultur zulässt (Abassi, Jackson et al., 2004; Solly, Wang et al., 2004). Es werden dabei spezielle 96er Mikrotiterplatten verwendet (E-plates), die einen mit Leitungen beschichteten Boden besitzen und in jeder Kavität individuelle Widerstandsmessungen erlauben. Die Veränderungen während des Versuchsablaufs können online beobachtet und aufgezeichnet werden und erlauben im Gegensatz zur Endpunktanalyse Aussagen über den kompletten Verlauf eines Versuchs. Der angezeigte Status der Zellen in der Mikrotiterplatte wird durch den sogenannten Zellindex (*CI*) dargestellt.

$$CI = \max_{i=1, \dots, N} \left(\frac{R_{cell}(f_i)}{R_0(f_i)} - 1 \right)$$

Dabei ist N die Anzahl der Frequenzen, bei denen die Impedanz gemessen wird (z.B.: N=3 für 10 kHz, 25 kHz und 50 kHz) und der Widerstand an der Elektrode bei entsprechender Frequenz durch $R_0(f)$ und $R_{cell}(f)$ für zellfreie und bewachsene Kavitäten (Atienza, Zhu et al., 2005). Je höher der Zellindex ist, umso intensiver ist die Interaktion zwischen den Zellen und dem Boden der Kavität, was durch die Anzahl der Zellen, ihre Größe und die Stärke der Interaktionen mit dem Gefäßboden beeinflusst wird.

Auf diese Weise können Einflüsse auf Zellen, wie Apoptose Induktion, Virusinfektion, oder die abgeschwächte Infektion nach Virusneutralisation online beobachtet werden.

In Vorversuchen musste für jede Zelllinie eine Wachstumskurve inklusive dazugehöriger CI ermittelt werden, wobei durch eine Zelltitration die optimale Zelldichte pro Kavität bestimmt wurde (Ansatz für 1.000 bis 20.000 Zellen pro Kavität). Grundsätzlich wurde vor jedem Versuchsansatz eine Hintergrundmessung mit 50 µl Medium durchgeführt, um die Qualität der Mikrotiterplatte zu testen. Weiterhin gehörten zu jeder Messung als Kontrollen Kavitäten mit Medium ohne Zellen, mit unbehandelten Zellen und mit Medium inklusive der getesteten Komponente, um Interaktionen mit dem Plattenboden auszuschließen. Messungen unbehandelter Zellen und Positivkontrollen waren für eine Quantifizierung der Messwerte unerlässlich, um Schwankungen zwischen den einzelnen Messungen zu kompensieren.

2.2.10.1 Virustitration im xCELLigence System

Um den Virustiter mit dem xCELLigence System auf HEK293 Zellen zu bestimmen, wurde in Vorversuchen die Zellzahl pro Kavität auf 5000 Zellen festgelegt. Die Zellen wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl ausgesät und es wurde eine Wachstumskurve für die Dauer von ca. 5 h aufgenommen. Anschließend wurden Virusverdünnungen mit bekannten Titern (MOI 0,1; 0,5; 1,0; 10,0) auf die Zellen gegeben und der CI wurde über bis zu 72 h im Vergleich zu nicht infizierten Zellen gemessen (Gesamtvolumen = 150 µl pro Kavität).

Die Titration diente hauptsächlich als Vorversuch zur Etablierung eines neuartigen Neutralisationstests (NT) auf der Basis des xCELLigence Systems für die Charakterisierung der im Laufe dieser Arbeit generierten IgY.

2.2.10.2 Virus Neutralisationstest im xCELLigence System

Nach erfolgter Etablierung des Virus Titrationstests wurde ein NT auf der Grundlage eines klassischen NT durchgeführt. Seren und Antikörperpräparationen mit aus klassischen NT bekannten neutralisierenden Titern (NT₅₀) wurden im xCELLigence System vermessen.

Zunächst wurden nach einer Hintergrund Messung mit 50 µl Medium HEK293 Zellen, wie bei der Virustitration, mit einer Zellzahl von 5000 pro Kavität in 50µl Medium ausgesät und der CI wurde gemessen. Nach 2-4 h wurden Antikörper- oder Serumverdünnungen in 50 µl Medium erstellt und mit Viruspartikeln (50 µl, MOI 0,1) für 1h bei 37°C inkubiert. Die behandelten Viren wurden dann auf die Zellen gegeben und die Messung wurde für bis zu 72 h im Gesamtvolumen von 200 µl fortgesetzt. Die Auswertung erfolgte mithilfe von Excel- und Prism-Software und wurde mit den neutralisierenden Titern aus dem klassischen NT verglichen.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Erstellung von Expressionvektoren für virale Proteine

Um den Einfluss von viralen Proteinen auf die Apoptose Induktion in Zelllinien zu überprüfen, wurden CrmA, F1L und P28 mit Hilfe von Expressionsvektoren in den zu untersuchenden Zellen exprimiert. Es handelte sich dabei um das Vivid Colors pcDNA 6.2 Expressionssystem der Firma Invitrogen. Nach dem Primerdesign wurde eine Klonierung der als PCR-Produkte amplifizierten Inserts durchgeführt.

2.3.1.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Ein Standard Pipettierprotokoll ist in Tabelle 1 dargestellt, einen Programmverlauf zeigt Tabelle 2.

Tabelle 1: Zusammensetzung einer konventionellen PCR		
Komponente	Endkonzentration	Volumen in µl
Wasser		16,90
Puffer	1x	2,50
Mg	2 mM	2,00
dNTP	100 µM	1,00
Primer 1	300 nM	0,75
Primer 2	300 nM	0,75
Taq Polymerase	1 U	1,00
Mixvolumen		24,00
Probenvolumen		1,00
Gesamtvolumen		25,00

Tabelle 2: Allgemeiner Ablauf einer konventionellen PCR			
Schritt	Temperatur in °C	Zeit in s	Wiederholungen
Denaturierung	95	600	
Denaturierung	95	15	45
Anlagerung	55-60	20	45
Elongation	72	15-60	45
Endauffüllung	72	300	

Die Angaben zu den Konzentrationen als auch zu der Dauer einzelner Schritte, deren Temperatur und Wiederholungen, können je nach Fragestellung variieren. So wurden die Anlagerungstemperaturen den Primer Schmelztemperaturen angepasst, sowie die Dauer der Elongation der Länge der Produkte.

2.3.1.2 Klonierung

Zur Untersuchung der Funktionsweise von Apoptose Inhibitoren wurden unter anderem die Proteine aus dem Zusammenhang der Infektion herausgelöst und nach der Klonierung in Expressionsplasmiden in Zielzellen transfiziert. Außerdem wurden Plasmide für die DNA Immunisierung, den Einsatz von siRNA und auch als Kontrollen zur Quantifizierung von PCR-Produkten in der real-time PCR verwendet.

Das TOPO TA Cloning, das in allen Fällen verwendet wurde, ermöglichte eine schnelle und einfache Klonierung von konventionellen PCR Produkten.

Es erfolgten eine Ligation und eine chemische Transformation in kompetente *E.coli* Bakterien nach Herstellerangaben der genutzten Expressionssystemkits (pcDNA6.2 -> transiente Expression, pcDNA3.1 -> IgY Herstellung, pcDNA2.0 -> Positivkontrollen qPCR; Invitrogen, Karlsruhe). Schließlich wurden die transformierten Bakterien auf Selektionsmedien ausplattiert und Klone gepickt. Eine Verifizierung erfolgte über eine konventionelle Kolonie-PCR mit Insert- und Vektorprimern. Die Klone wurden dann vermehrt, Plasmid-DNA wurde mittels Nucleospin Plasmid Quickpure Kit (M&N, Düren) aufgereinigt und nach Sanger mittels BigDye Terminator v3.1 Kit (ABI, Darmstadt) sequenziert. Die Plasmide wurden nach einer Konzentrationsmessung und Bestimmung der Kopienzahl in entsprechenden Verdünnungen bei -20°C gelagert. Ein Teil der Flüssigkultur wurde in Glycerin bei -80°C eingelagert (900 µl Glycerin : 100 µl Bakterienkultur), um Klone zum Animpfen von weiteren Kulturen bereit zu halten.

2.3.1.3 Sequenzierung Hergestellter Expressionsvektoren nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte unter Einsatz des BigDye Terminator v3.1 Reagenz (Applied Biosystems) nach Angaben des Herstellers mit einem 10 µl ¼ Ansatz (siehe Tabelle 3).

Nach der Sequenzierungsreaktion (siehe Tabelle 4) wurden die Proben in einem Kapillarsequenziergerät aufgetrennt und analysiert und mit Hilfe von Sequenzauswertungssoftware auf ihre Richtigkeit hin untersucht.

Tabelle 3: Zusammensetzung eines BigDye Sequenzierungsansatzes

Komponente	Endkonzentration	Volumen in μl
Primer	5 μmol	0,50
ABI Puffer	1x	1,50
BigDye 3.1	1/4x	1,00
Wasser		1,00
Mixvolumen		3,00
Probenvolumen		1,00-7,00
Gesamtvolumen		10,00

Tabelle 4: Allgemeiner Ablauf einer BigDye Sequenzierungsreaktion

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit in s	Wiederholungen
Denaturierung	96	120	
Denaturierung	96	10	25
Anlagerung	55	5	25
Elongation	60	240	25
Endauffüllung	60	300	

2.3.2 Erstellung von Expressionsvektoren für antivirale siRNA

Das Design der siRNA-Plasmide war der erste Schritt zum effektiven *Knock down* anti-apoptotischer Gene in infizierten humanen und aviären Zellen.

2.3.2.1 siRNA Design

Um Bereiche der Gene für eine RNA-Interferenz auszuwählen, wurden zunächst die offenen Leserahmen von CrmA-, F1L- und P28-Homologen verschiedener OPV mittels des ClustalW (Thompson, Higgins et al., 1994) Algorithmus verglichen. Innerhalb der entstandenen Konsensussequenz wurden hochhomologe Regionen ausgesucht und in Fällen von diskreten Polymorphismen wurde bei der Auswahl zugunsten der Sequenz von VACV Lister Elstree entschieden.

Als Regionen für den Einsatz der RNA-Interferenz wurden die „Reactive-loop-region“ von CrmA, die trans-Membran Domäne von F1L und die KIL-A-N Domäne von P28 ausgewählt. Anschließend wurden die Konsensussequenzen mit Hilfe des Promega siRNA Target Designers (Promega Corporation, 2003) auf geeignete Interferenzregionen hin untersucht. Die vom Programm vorgeschlagenen Sequenzen wurden mit Hilfe des blastn Algorithmus auf der

DNA Immunisation of Chicken for Straightforward Production of Poxvirus-specific IgY Antibodies“ (Witkowski, Bourquain et al., 2009).

2.4 Charakterisierung der Expression von Apoptose Modulatoren auf Transkriptebe

Die Charakterisierung der Expression erfolgte durch den Einsatz von quantitativer real-time PCR des TaqMan Formats.

2.4.1 Nukleinsäureextraktion

Nukleinsäuren wurden im Laufe des Projektes aus verschiedenen Gründen aufgereinigt. Virale DNA diente zur Feststellung der genetischen Information verschiedener Virusstämme und zur Quantifizierung der Genomäquivalente in gesammelten Proben von infizierten Kulturen. Weiterhin wurde DNA in Form von Plasmiden als PCR-Standard, zur Transfektion und für die DNA-Immunisierung verwendet.

Zur Extraktion von DNA wurden kommerziell erhältliche Kits der Firma Invitrogen in verschiedenen Maßstäben verwendet (PureLink HiPure Plasmid Kits und Genomic DNA Kits). Die Prozedur erfolgte durchgehend nach den Angaben des Herstellers.

RNA diente zur Erstellung von cDNA und Untersuchung der Expression unterschiedlicher viraler, humaner und aviärer Gene. Die Aufreinigung wurde mittels des RNeasy Mini Kits der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt.

Um falsch positive Messungen durch Kontamination mit viraler DNA in RNA-Proben zu minimieren, wurde nach der RNA-Extraktion ein DNase Verdau mit dem TURBO DNA-free System der Firma Ambion durchgeführt.

2.4.2 cDNA-Synthese

In der cDNA Synthese wird RNA unter Einsatz eines Oligonukleotidprimers durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT) in kodierende DNA (cDNA) umgeschrieben. Man kann eine bestimmte Sequenz mit Hilfe eines spezifischen Primers synthetisieren, oder sogenannte oligo-dT Primer verwenden, die selektiv an die Poly-A Schwänze aller mRNA Moleküle binden. Um die gesamte RNA sequenzunspezifisch umzuschreiben benötigt man eine Mischung aus kurzen, zufälligen Oligonukleotiden, sogenannten „Random Hexameren oder Oktameren“.

In dieser Arbeit wurde cDNA für die Durchführung von Expressionsprofilen verschiedener Gene generiert und somit ausschließlich oligo-dT Primer verwendet. Die gesamte cDNA Synthese wurde auf Eis pipettiert, wobei ein Ansatz mit RT (+RT) und einer ohne RT

(-RT/zus. 1 µl Wasser) vorbereitet wurde, um festzustellen wie viel DNA nach der RNA Präparation in den Proben verblieben war.

Tabelle 6: Zusammensetzung und Verlauf einer RT Reaktion		
Komponente	Endkonzentration	Volumen in µl
Oligo dT	25 µM	1,00
dNTP	100 µM	0,40
RNA	mind. 0,5 µg	1,00 – 11,60
Wasser		ad 13,00
5 min 65°C		
5x RT Puffer	1x	4,00
DTT		2,00
2 min 37°C		
RT/Wasser	1U	1,00
	Gesamtvolumen	20,00
50 min 42°C		
15 min 70°C		

Die angegebenen Reaktionsbedingungen (Temperatur, Zeit) können mit Hilfe eines PCR-Cyclers erreicht werden (Tabelle 6). Die gewünschte Konzentration an Template-RNA wird nach vorheriger Messung der optischen Dichte in jeder Probe eingestellt.

2.4.3 Real-time qPCR

Die real-time PCR ermöglicht durch den Einsatz von Sondenmolekülen eine online Verfolgung der Amplifikation im Verlauf der Reaktion und damit die Quantifizierung (Mackay, Arden et al., 2002)). In Tabelle 7 ist das angepasste Pipettierschema zu sehen.

Bei der Auswertung wurden Positivkontrollen mit bekannter Konzentration zur Erstellung von Eichgeraden genutzt. Die Geradengleichung konnte dann zur Ermittlung der Konzentration einer unbekannten Probe herangezogen werden.

Tabelle 7: Zusammensetzung einer real-time PCR

Komponente	Endkonzentration	Volumen in μl
Wasser		14,40
Puffer	1x	2,50
Mg	5 mM	2,00
dUTP	200 μM	1,00
Primer 1	300 nM	0,75
Primer 2	300 nM	0,75
Sonde	100 nM	0,25
ROX	1 μM	0,25
Taq Polymerase	1 U	1,00
	Mixvolumen	24,00
	Probenvolumen	1,00
	Gesamtvolumen	25,00

2.5 Immunologische Methoden zur Charakterisierung pockenviraler Apoptose Modulatoren

2.5.1 Generierung OPV-spezifischer IgY im Huhn

Für die Generierung von spezifischen Antikörpern gegen die viralen Proteine CrmA, F1L und P28 mussten die DNA-Vakzine zunächst computergestützt entworfen und dann molekularbiologisch über Klonierung in einen Expressionsvektor vorbereitet werden. Die darauffolgende Immunisierung von Hühnern erfolgte mittels einer Gene Gun. Angaben zur Methodik, soweit im folgenden Abschnitt nicht aufgeführt, sind veröffentlicht (Witkowski, Bourquain et al., 2009).

Eine Liste mit allen genutzten Antikörpern befindet sich im Materialteil unter 3.5.

2.5.1.1 Softwaregestütztes Antikörperdesign

Um potentiell immunogene und OPV-generische Epitope innerhalb der Sequenzen von F1L und p28 zu finden, wurden die Nukleotidsequenzen der Homologe aus prominenten OPV (*Variola virus* [VARV], *Vaccinia virus* [VACV], *Cowpox virus* [CPXV], *Camelpox virus* [CMLV] and *Ectromelia virus* [ECTV]) in einem Alignment zusammengefasst (BioEdit ver. 7.0.9).

Regionen mit hoher Homologie wurden auf Epitope mit hohem immunogenen Index und hoher Oberflächenwahrscheinlichkeit mittels der Lasergene 7.0 Protean Software ausgesucht (Witkowski, Bourquain et al., 2009).

2.5.1.2 Munitionspräparation für die Gene Gun

Um die ausgewählten Epitope direkt aus viraler DNA zu amplifizieren, wurden Primer generiert, die die Sequenzabschnitte “in-frame” mit der Kozak Sequenz des Vektors inklusive eines STOP-Codons flankierten (3.4). Nach erfolgter PCR wurden die Produkte mittels eines „PCR product purification kit“ (Invisorb Spin PCRapid Kit, Invitex, Berlin/Deutschland) aufgereinigt und in einen pcDNA3.1/V5-His-TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) kloniert. Auf der Basis eines Vivid Colors pcDNA6.2 YFP-GW/TOPO Vectors wurden transfizierbare Positivkontrollen geschaffen, die Homologe von F1L und p28 von CPXV enthielten.

Nach chemischer Transformation wurde die Plasmid-DNA über ein PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit (Invitrogen, Karlsruhe/Deutschland) Endotoxin-frei aufgereinigt, in Wasser aufgenommen und nach Sanger sequenziert. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei -20°C.

Die 0,8-1,5 µm großen Goldpartikel für die Herstellung der Munition wurden von der Firma Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe/Deutschland) bezogen. Das Beschichten der DNA fand nach den Vorgaben von Bio-Rad (München/Deutschland) unter Einsatz der Tubing Prep Station statt. Die fertige Munition bestand aus einem von innen mit DNA-beladenen Goldpartikeln beschichteten Schlauchstück mit einer Länge von 75 cm und einem DNA-Gehalt von 35 µg, welches in 1,25 cm lange Teile geschnitten wurde. Die Lagerung erfolgte im Exsikkator bei 4°C.

2.5.1.3 Versuchstierhaltung

Die Hühner zur Immunisierung wurden vom Spreenhagener Vermehrungsbetrieb für Legehennen GmbH in Bestensee, Deutschland bezogen und unter Einhaltung des gültigen Tierschutzgesetzes gehalten.

Es handelte sich dabei um 16 Wochen alte Tiere der Rassen “ISA Brown” (braune Federn) und “Lohmann Selected Leghorn” (weiße Federn), die jeweils zu zweit in einem Speziell für das Ernten von Eiern ausgelegten Käfig gehalten wurden.

Das Eierlegen begann meistens in einem Alter von ca. 24 Wochen, wonach bei den Hühnern die Immunisierung durchgeführt wurde. Die Eier wurden jeden Tag vom Tierpflegepersonal gesammelt und bis zur Aufreinigung der Ak bei 4°C gelagert.

2.5.1.4 Gene Gun Immunisierung

Der Vorgang der Immunisierung wurde, wie auch die Tierhaltung, in den Räumen der FEM durchgeführt. Die Tiere wurden von einem erfahrenen Tierpfleger liegend gehalten, um den Brustbereich zugänglich zu machen. Der Abstandshalter am Lauf der Gene Gun begrenzte den Bereich der Haut (ca. 2 cm²), auf den die Goldpartikel beschleunigt wurden. Die Immunisierung fand im Bereich der Federraine (Apteriae) statt, an denen die Haut gut zugänglich ist und keine Federn die Flugbahn der Goldpartikel beeinträchtigen können. Die Munition wurde durch einen Heliumimpuls mit einem Druck von 300 psi beschleunigt, wobei pro Tier auf jeder Brustseite zwei Anwendungen (insgesamt vier pro Tier) erfolgten. Die Gesamtmenge an DNA pro Immunisierung betrug 2,8 µg.

Der Vorgang dauerte pro Immunisierungstermin ca. 5 min. pro Tier und die Behandlung wurde außerhalb der Tierhaltungsräume durchgeführt, um den Stress für andere Hühner zu minimieren.

Die Immunisierungen wurden in Abständen von ca. 3-4 Wochen durchgeführt.

2.5.1.5 IgY Aufbereitung

Im Durchschnitt wurde von jedem Huhn ein Ei am Tag gelegt. Die Eier wurden gesammelt und bei 4°C gelagert, wobei jedes dritte Ei aufbereitet wurde.

Die IgY Extraktion basierte auf Präzipitation mit Polyethylenglycol (PEG) angepasst nach Polson (Polson, von Wechmar et al., 1980). Das Eigelb wurde dafür mit einem Eilöffel vom Eiweiß getrennt und 1:2 in PBS gelöst. Anschließend erfolgten drei aufeinanderfolgende Präzipitationsschritte mit steigenden Konzentrationen an PEG 6000 (3,5%, 8,5% und 12%), die von einer Dialyse gegen PBS (ÜN bei 4°C) in einem QuixSep System der Firma Roth (Karlsruhe/Deutschland) gefolgt wurden. Das Sammeln der Eier und die Aufarbeitung der IgY wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Schade durchgeführt.

Nach der Aufreinigung wurden die Ak 1:1 in Glycerin aufgenommen und in Aliquots bei -20°C gelagert. Die Proteinkonzentration in mg/ml wurde bei 280 nm photometrisch bestimmt nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet, unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten für IgY (1,33 (Polson, von Wechmar et al., 1980)).

2.5.2 Immunzytochemie zum Nachweis viraler Proteine

In diesem Abschnitt werden Methoden beschrieben, die zur Färbung von Zellen eingesetzt wurden, die sowohl immobilisiert waren (Objektträger), als auch in Suspension vorlagen (FACS). Je nach Fragestellung handelte es sich dabei um Färbungen, die die Expression bestimmter Proteine, den Infektionsgrad der Zelle, das Stadium der Apoptose oder bestimmte Zellkompartimente hervorheben sollten.

2.5.2.1 Fluoreszenzmikroskopie

Eine der häufig eingesetzten Methoden in dieser Arbeit war die Fluoreszenzmikroskopie. Zum Einsatz kamen ein Fluoreszenzmikroskop des Typs Axiovert 100 M (Carl Zeiss, Jena) und ein konfokales Laserscanning-Mikroskop des Typs LSM 510 (Carl Zeiss, Jena) ausgerüstet mit einem Metakopf.

2.5.2.1.1 IgY Titerbestimmung mittels IFT

Die Titerbestimmung der in Hühnern generierten Antikörper fand auf 12er Mikrotiterobjektträgern statt, auf denen HEp-2 Zellen kultiviert und daraufhin mit unterschiedlichen Orthopockenviren infiziert wurden (Beschreibung siehe Witkowski, Bourquain et al., 2009).

2.5.2.1.2 Färbung pockenviraler Proteine

Die Färbung pockenviraler Proteine CrmA, F1L und P28 fand auf Objektträgern oder 12mm Deckgläschen nach folgendem Protokoll statt:

- In Formalin eingelegte Präparate wurden zunächst 2x in PBS gewaschen
- Gefrorene Objektträger wurden aufgetaut
- WICHTIG: Während der gesamten Prozedur durften die Präparate nicht austrocknen. Die Inkubation erfolgte in einer „feuchten Kammer“.
- 10%iges Serum der Sekundärantikörperspezies wurde 30 min bei 37°C auf den Proben inkubiert
- Die Präparate wurden 1x mit PBS „ohne“ gewaschen
- Der Primärantikörper wurde 1h bei 37°C auf den Proben inkubiert
- Es wurde 3x mit PBS gewaschen und beim letzten Waschschrift 10 min bei RT inkubiert
- Der Sekundärantikörper wurde 1h bei 37°C auf den Proben inkubiert
- Optional wurde ein Kontrastfarbstoff gemeinsam mit dem Sekundärantikörper angewendet
- Es wurde 3x mit PBS gewaschen und beim letzten Waschschrift 10 min bei RT inkubiert
- Das Eindeckeln erfolgte mit DAKO Mounting Medium
- Die Proben wurden bis zum Mikroskopiervorgang bei 4°C gelagert

2.5.2.1.3 Antikörperfärbung zum Nachweis von Virus und Proteinen

Kombinierte Färbungen von Protein und Viruspartikeln wurden nach dem Protokoll für virale Proteine durchgeführt. Zusätzlich wurden entsprechende anti-Pocken-Ak verwendet, wobei

darauf geachtet wurde, dass sich die Emissionsspektren einzelner Fluorochrome nicht überlagern. Weiterhin wurde der Single Track Modus am cLSM zum Aufnehmen verwendet, um einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bei kolokalisierenden Targets auszuschließen.

2.5.2.1.4 Kaspasefärbung als Apoptose Nachweis

Neben dem Einsatz von klassischen Ak für den Nachweis von Kaspasen, wurden kommerziell erhältliche Kaspase-Inhibitoren, wie zum Beispiel VAD-FMK-FITC (BioCat).

Zur Kontrastierung der Färbungen wurden Kernmarker, wie DAPI oder To-Pro-3, Membranfarbstoffe, Mitochondrienmarker und Phalloidin zur Aktinfärbung verwendet. Die Marker sind in 3.5 zusammengefasst und wurden stets nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.5.3 Durchflusszytometrie zum Nachweis von Apoptose

Zum quantitativen Nachweis der Apoptose und auch der anti-apoptotischen Wirkung von Orthopockenproteinen wurden Zellen nach erfolgter fragespezifischer Färbung in einem Durchflusszytometer ausgezählt. Die Durchflusszytometrie erlaubt die Zuordnung von Zellen zu verschiedenen, durch Farbstoffe angezeigten, Eigenschaften. In dieser Arbeit wurden zumeist die Fragen nach der Stärke einer Pockeninfektion, dem Grad der Apoptose und zumeist auch nach der Rate einer Transfektion innerhalb einer Probe untersucht. Zum Einsatz kamen dabei Geräte der Firma BD Biosciences (FACSCalibur, LSRII).

Üblicherweise wurden die Zellen für Zytometrieversuche in 24-er Mikrotiterplatten kultiviert. Die Vorgehensweise zur Aufarbeitung begann mit dem Ablösen des Zellrasens, gefolgt von einem Waschschrift:

- Kulturmedium abziehen (1 ml) und in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführen
- 100 µl PBS auf die Zellen geben und in dasselbe Eppendorfgefäß überführen
- 200 µl Trypsin/EDTA auf die Zellen geben und 5 – 10 min bei 37°C inkubieren
- abgelöste Zellen inklusive Trypsin/EDTA und weiteren 200 µl PBS in das Eppendorfgefäß überführen
- Zellen 2x mit PBS waschen

2.5.3.1.1 Annexin V/PI Färbung

Diese Färbung ist die klassische Methode zum Apoptose Nachweis in der Durchflusszytometrie (Vermes, Haanen et al., 1995). Hierbei werden Phosphatidylserin (PS)-Reste auf der dem extrazellulären Raum zugewandten Seite der Zellmembran nachgewiesen. Exponiertes PS ist eines der ersten morphologischen Anzeichen für Apoptose.

- Annexin in Annexin Bindungspuffer 1:40 verdünnen und je 100 µl auf die aufgearbeiteten Zellen geben
- Bei RT 15 min unter Lichtausschluss inkubieren
- Zellen mit Annexin Bindungspuffer waschen
- Pellet in 500 µl Annexin Bindungspuffer aufnehmen und in ein FACS-Röhrchen überführen
- Kurz vor der Messung je 10 µl Propidiumiodid in die FACS-Röhrchen pipettieren und vortexen
- Proben am FACS messen

2.5.3.1.2 Kaspase Nachweis durch spezifische Inhibitoren

- Nach erfolgter Inkubation in Mikrotiterplatten das FITC-VAD-FMK direkt ins Medium geben
- 30 min unter Lichtausschluss bei 37°C inkubieren
- Zellen aufarbeiten (siehe 2.5.3)
- Pellet in 500 µl FACS-PBS aufnehmen und in ein FACS Röhrchen überführen
- Proben am FACS messen

2.5.4 Western Blot zur IgY-Charakterisierung

Das Western Blot (WB) Verfahren dient zur spezifischen immunologischen Detektion von Proteinen innerhalb einer Probe, die zuvor in einem denaturierenden eindimensionalen SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt wurden. Neben den immunzytochemischen Verfahren zur Bestimmung der Spezifität der im Huhn generierten IgY-Ak sollte der WB diese Spezifität anhand der Größe der markierten Proteine bestätigen.

Um Proteine aus eukaryontischen Zellen zu isolieren wurden ca. 1×10^5 Zellen mit RIPA-Puffer (Thermo Scientific) und Proteinase Inhibitor Cocktail (Fermentas) versetzt. Zuvor wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen zweimal mit kaltem PBS (4°C) gewaschen. Anschließend wurden 150 µl des kalten RIPA-Puffers (incl. Proteinase Inhibitor) auf die Zellen geben und die Zellkulturplatte auf Eis gestellt. Nach 5-10 min wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden gelöst und zentrifugiert (15 min, 14 000x g, 4°C), um die Zelltrümmer zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein frisches Mikrozentrifugengefäß überführt. Die Lagerung der extrahierten Proteine erfolgte bei -80°C.

Der BCA Test zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde nach Herstellerangaben (Fermentas) in Mikrozentrifugengefäßen durchgeführt. Bei hohen Proteinkonzentrationen wurden die Proben 1:5, 1:10 oder 1:50 in RIPA Puffer vorverdünnt. Zur Durchführung des BCA Tests wurden 200 µl working reagent (WR) pro Probe benötigt. Das WR besteht aus 50

Teilen BCA Reagenz A und einem Teil BCA Reagenz B und wird für alle Proben zu Beginn des Tests angesetzt. Es wurden 25 µl der Probe mit 200 µL des WR gemischt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurde die Absorption bei 562 nm an einem Photometer gemessen.

Zur Denaturierung der Proteine wurden diese vor Gebrauch in β-Mercaptoethanol-Probenpuffer (2:1) aufgenommen und für 5 min bei 95°C erhitzt (Zusammensetzung siehe 3.6).

2.5.4.1 SDS-Proteingelelektrophorese

Nach dem Aufbau der Elektrophoresekammer (Mini-Protean, Bio-Rad) wurden jeweils 15 µl Probe Zelllinien-Protein-Extrakt, bzw. 35 µl pCEF-Protein-Extrakt in die Taschen des Gels gefüllt. Als Negativkontrolle diente Protein aus nicht transfizierten bzw. nicht infizierten Zellen. Es wurden als Größenstandard 8 µl PageRuler Prestained Protein Ladder (Fermentas, 17-170 kDa) aufgetragen. Die SDS-PAGE erfolgte in 12% PAA Gelen (3.6) für 30-40 min bei 150V und war beendet, sobald die Laufront das untere Ende des Gels erreicht hatte.

2.5.4.2 Western Blot

Beim anschließenden Western Blot wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden vor dem Transfer (2 h, 15 V, 200 mA) 5 min in Transferpuffer equilibriert. Nach dem Transfer wurden die Membranen 3x5 min in 10 ml PBS-Tween (PBST, 0,1 %) gewaschen und anschließend für 1 h in Blocking-Puffer inkubiert. Die Membranen wurden ü.N. bei 4°C mit dem Primäantikörper in Blocking-Puffer inkubiert und anschließend gewaschen (3x5 min in 10 ml PBS-T). Die Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper erfolgte anschließend für 1 h bei RT. Nach dem Waschen erfolgte die Detektion mit dem SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Hierzu wurde die Nitrocellulosemembran für 5 min mit der Färbelösung inkubiert und in eine lichtdurchlässige Folie eingeschlossen. Die Auswertung erfolgte durch Auflegen eines Röntgenfilms und einer anschließenden Entwicklung in einer Curix 60 Entwicklertasche (AGFA).

3 Material

3.1 Allgemein

Verbrauchsmaterial des täglichen Laborbedarfs (wie zum Beispiel Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße oder Objektträger) wird nicht gesondert aufgeführt. Spezielle Kits oder Chemikalien sind in den Beschreibungen der einzelnen Methoden zu finden. Es folgt eine

Auflistung der wichtigsten Zelllinien, Viren, Oligonukleotide, Antikörper, Puffer, sowie Software, die für diese Arbeit verwendet wurden.

3.2 Zellen

pCEF Primäre Hühnereifibroblasten aus eigener Herstellung

HEK293 humane Embryonierenzellen; ATCC # CRL-1573

HeLa Zervix-Adenokarzinomzellen; ATCC # CLL-2

HEp2 humane Epithelzelllinie; ATCC # CCL-23

Vero E6-7 Meerkatzen Nierenzellen; ATCC # CRL-1586

3.3 Viren

Vaccinia Virus IHD-W (IHD-W); ATCC # VR-1441

Vaccinia Virus Lister Elstree (LE); ATCC # VR-1549

Vaccinia Virus Modified Vaccinia Ankara (MVA); ATCC # VR-1508

Vaccinia Virus Western Reserve (WR); ATCC # VR-1354

Camelpox-19 (CP19) Feldisolat (bereitgestellt von Hermann Meyer)

Cowpox GuWi (GuWi) Feldisolat (Kurth, Wibbelt et al., 2008)

Callithrixpox 2443 (2443) Feldisolat

3.4 Oligonukleotide

Tabelle 8: Übersicht der Primer und Sonden für die qPCR

Oligonukleotid	Sequenz	Funktion
C-myc up	gCC AgA ggA ggA ACg AgC T	Humanes Referenzgen
C-myc dn	ggg CCT TTT CAT TgT TTT CCA	
C-myc Sonde	Fam-TgC CCT gCg TgA CCA gAT CC-Q	
CrmA up	TgT CAA TgA AgA gTA TAC AgA AgC AgC	Apoptose Inhibitor
CrmA dn	Tgg AgA gCA ATA TCT ACC AAC gAA	
CrmA Sonde	Fam-ACA TgC CTA ATC ACA Tag ATg AAC ggA-Q	
F1L up	TgA AAT TgT TAT CAA TCT TAC ACC CAA	Apoptose Inhibitor
F1L dn	TAC TCg ATT ATC TAT CAA Cgg AAC g	
F1L Sonde	Fam-ATg TAA TgA Tgg CTg TTC-MGB	
P28 up	TAg ATA CTT Tgg TTT ATT ggA TTC gTg	Apoptose Inhibitor
P28 dn	ACg ggT ACg ACA TAT Agg ACA ATT ATC	
P28 Sonde	Fam-CAT gTT ATg CAA AAT ATA TgA-MGB	
galTBP up	ggA Tag TgC CAC AgC TAC AgA ATA	Galliformes Referenzgen
galTBP dn	CAG Tag TAC gTg gTT CTC TTA TCC TC	
galTBP Sonde	Fam-CgT gCC CgA AAT gCT gAA TAT AAT CCC A-Q	
P4A up	TAA TAC TTC GAT TGC TCA TCC AGG	Pockenvirale Referenzsequenz
P4A dn	ACT TCT CAC AAA TGG ATT TGA AAA TC	
P4A Sonde	Fam-TCC TTT ACG TGA TAA ATC AT-MGB	

Tabelle 9: Übersicht der Klonierungsprimer für die Erstellung der DNA-Vakzine

Oligonukleotid	Sequenz
CrmA pcDNA31 up	CCA TGG ATA TCT TCA GGG AAA TCG C
CrmA pcDNA31 dn	gCg ACA ATC AgT gAA gTC AAC Ag
CrmA pcDNA31S dn	TTA gCg ACA ATC AgT gAA gTC AAC Ag
F1L pcDNA31 up	CCA Tgg CgA TgT TgT CgA TgT TTA TgT gTA ATA ATA TCg
F1L pcDNA31 dn	ATC ATA CAT gAT ATT CAT gTC CCT ATT ATA ATC A
F1L pcDNA31S dn	TTA ATC ATA CAT gAT ATT CAT gTC CCT ATT ATA ATC A
P28 pcDNA31 up	CCA TGg TAA CAA TAT TAC AAT ACA TA _g AT _g AAC CAA AT _g
P28 pcDNA31 dn	gAT TgA ACA ATC ACA TC _g gTT ATC C
P28 pcDNA31S dn	TTA CgA TTg AAC AAT CAC ATC ggT TAT CC

Tabelle 10: Übersicht der Klonierungsprimer für die Erstellung der pcDNA 6.2 Plasmide

Oligonukleotid	Sequenz
crmA Kom up	ATg gAT ATC TTC Agg gAA ATC gCA TC
crmA Kom dn	gTT gTT ggA gAg CAA TAT CTA CCA ACg
F1L VACV Komp up	gAg ATg gAT ATg TTg TCg ATg TTT ATg TgT AAT AAT ATC g
F1L VACV Komp dn	CTA TCA TTA TCC TAT CAT gTA TTT gAg AgT TTT ATA TgT A
F1L CPXV Komp up	gAg ATg gAT ATg gAC AAT AgT ATg TTg TCg ATg TTT ATg
F1L CPXV Komp dn	CTA TCA TTA TCC TAT CAT gTA TTT gAg AgT CTT ATA TgT AgC
P28 VACV Komp up	gAT ATg gAA TTC gAT CCT gCC AAA AT
P28 Komp up	AAC TA _g CT _T ATA gAA CT _T gCT CAT TgT TAT gTT TC
P28 CPXV Komp up	gAT ATg gAA TTT gAT CCT ACC AAA ATC AAT

3.5 Antikörper und Marker

Tabelle 11: Übersicht der primären Ak und Marker

Primäre Antikörper und Marker	Spezies	Quelle
anti-CrmA-IgY	Huhn	diese Arbeit
anti-F1L-IgY	Huhn	diese Arbeit
anti-p28-IgY	Huhn	diese Arbeit
anti-OPV-IgY	Huhn	Zhang et al. (Zhang, Kurth et al., 2008)
anti-OPV-IgG (Omri Gam™)	Mensch	Omrix, Tel Aviv, IL
anti-GFP-IgG	Maus	Abcam, Cambridge, UK
anti-VACV-IgG	Kaninchen	Acris, Herford
anti-VACV-IgG FITC	Kaninchen	Acris, Herford
DAPI	---	Invitrogen, Karlsruhe
Propidium Iodid	---	Invitrogen, Karlsruhe
To-Pro-3	---	Invitrogen, Karlsruhe
VAD-FMK-FITC	---	Promega, Mannheim
VAD-FMK-SR	---	BioCat, Heidelberg

Tabelle 12: Übersicht der sekundären Ak und Marker

Markierte sekundäre Antikörper	Spezies	Quelle
anti-IgY-IgG FITC	Esel	Dianova, Hamburg
anti-IgY-IgG Cy3	Esel	Dianova, Hamburg
anti-IgY-IgG HRP	Esel	Dianova, Hamburg
anti-IgY-IgG AP	Esel	Dianova, Hamburg
anti-Kaninchen-IgG Cy3	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Mensch-IgG Cy3	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti-Mensch-IgG Cy5	Kaninchen	Dianova, Hamburg
anti-Mensch-IgG FITC	Kaninchen	Dianova, Hamburg

3.6 Puffer und Medien

Wachstumsmedium Zellkultur

1% L-Glutamin
5% FKS, inaktiviert
In D-MEM

IFT-Puffer

2,0% BSA
0,2% NaN₃
In PBS

Einfriermedium Zellkultur

10% DMSO
90% FKS

Annexin Bindungspuffer (0,5l; 10x)

0,1M Hepes
1,4M NaCl
25mM CaCl₂
In H₂O
steril filtriert

10x PBS

80,0 g NaCl
2,0 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄ x H₂O
2,4 g KH₂PO₄
1.000,0 ml (ad) H₂O
(pH 7,4 mit HCl)

Trenngel für SDS Gelelektrophorese (12%)

3.750,0 µl H₂O
2.100,0 µl 2M Tris HCl (pH 8,8)
50,0 µl 20% SDS
3.960,0 µl Polymerisierungsansatz
(30% Acrylamid, 1% Bisacrylamid)
120,0 µl 10% APS
7,0 µl TEMED

Overlaymedium für Virustitrationen

1,6% Carboxymethylcellulose (CMC)
10,0% FKS
1,0% L-Glutamin
In D-MEM

Sammelgel für SDS Gelelektrophorese (5%)

3.500,0 µl H₂O
1.000,0 µl Tris HCl (pH 6,8)
37,5 µl 20% SDS
1.250,0 µl Polymerisierungsansatz
(30% Acrylamid, 1% Bisacrylamid)
1.750,0 µl 60% Saccharose
100,0 µl 10% APS
10,0 µl TEMED

Naphtol Blue Black Färbelösung

1,0 g Naphtol Blue Black
13,6 g Natriumacetat
60,0 ml Eisessig
1.000,0 ml (ad) H₂O

TAE-Puffer für Gelelektrophorese

40,0 mM Tris/Essigsäure (pH 8,0)
2,0 mM EDTA

Ladepuffer für WB

2,5 ml	0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
2,0 ml	20% SDS
2,0 ml	Glycerin
1,0 ml	0,1% Bromphenol-Blau
2,1 ml	H ₂ O

Transferpuffer für WB

3,3 g	Tris Base
14,4 g	Glycin
100,0 ml	Methanol
1.000,0 ml (ad)	H ₂ O

10x Laufpuffer für WB

30,25 g	Tris Base
14,40 g	Glycin
10,00 g	SDS
1.000,00 ml (ad)	H ₂ O

Ponceau-Rot für WB

0,1 g	Ponceas S
5,0 ml	Eisessig
100,0 ml (ad)	H ₂ O

3.7 Software

Tabelle 13: Zur Auswertung und Datenverarbeitung genutzte Software

Software	Funktion
<i>Adobe Creative Suite 3</i>	Bildbearbeitung
<i>AxioVision LE 4.5</i>	Bearbeitung und Export von mikroskopischen Fluoreszenzaufnahmen
<i>BioEdit 7.0.9</i>	Sequenzanalyse
<i>FlowJo</i>	Datenanalyse von FACS Messungen
<i>Lasergene 8</i>	Sequenzanalyse
<i>LSM Image Browser 3.5</i>	Bearbeitung und Export von konfokalen Fluoreszenzaufnahmen
<i>Microsoft Office</i>	Datenbearbeitung und Tabellenkalkulation
<i>Prism 5</i>	Tabellenkalkulation
<i>Reference Manager 11</i>	Literaturdatenbank Verwaltung
<i>SPSS Sigma Plot 11.0</i>	Tabellenkalkulation
<i>xCELLigence Software</i>	Datenanalyse von xCELLigence Messungen

4 Ergebnisse

4.1 Expression der Apoptose Modulatoren auf Transkriptebene in Zelllinien nach Infektion

Um den Verlauf einer pockenviralen Infektion auf die Expression von Apoptose Modulatoren hin zu untersuchen wurden HEp-2 und HEK293 Zellen mit verschiedenen OPV einer MOI von 1 infiziert. Es folgte eine Probennahme von Zellen, gefolgt von RNA-Extraktion, sowie cDNA-Synthese und qPCR mit spezifischen Oligomeren für CrmA, F1L und P28. Parallel wurde als Referenzgen zelluläres c-Myc gemessen. In Abbildung 6 sind beispielhaft die Expressionsprofile von VACV - LE und - MVA, CMLV und CPXV dargestellt.

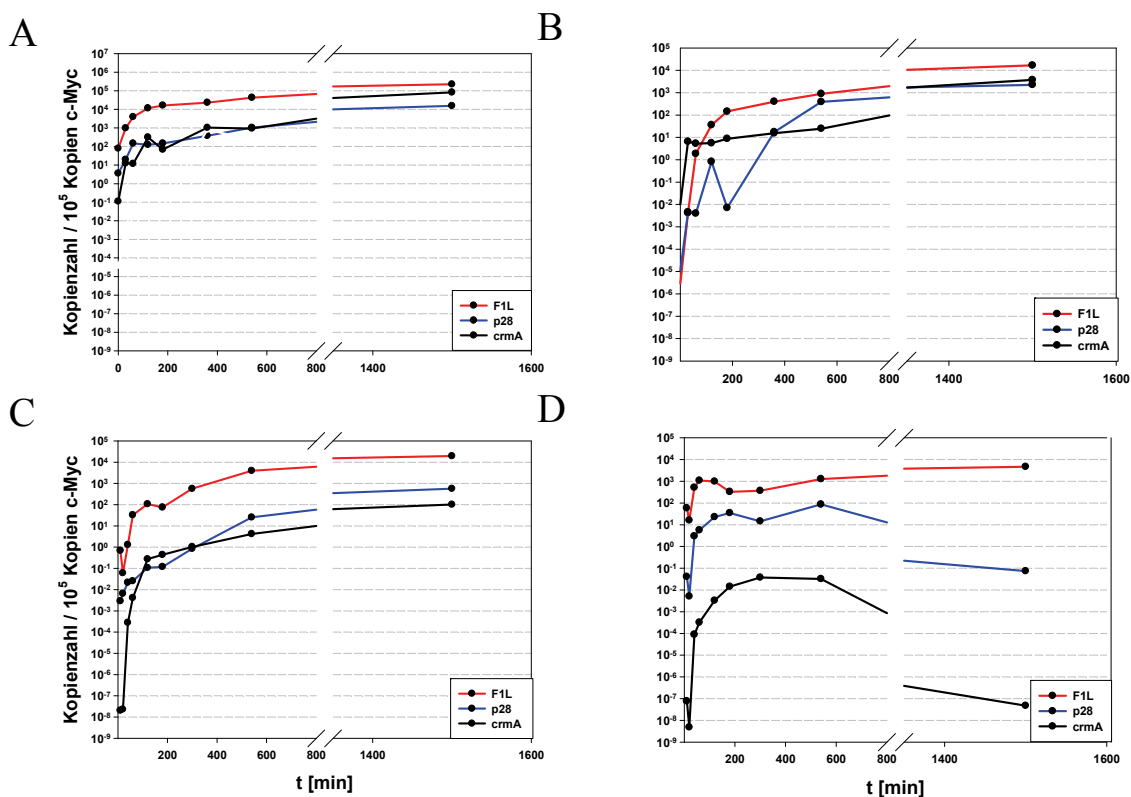


Abbildung 6: Expression von CrmA, F1L und P28 bezogen auf zelluläres c-Myc. Die Probenentnahme erfolgte nach Infektion mit VACV - LE (A), CMLV (B), CPXV(C) und VACV - MVA (D) mit einer MOI von 1. (n=3, MW)

Alle Infektionen ähnelten sich unter dem Gesichtspunkt des Zeitpunktes der Expression der immun-modulatorischen Gene. Die untersuchten Viren exprimierten bereits Minuten nach der Infektion mRNA aller drei Proteine, wobei in allen Fällen, bezogen auf die Expression von c-Myc, ein exponentieller Anstieg innerhalb der ersten 30 – 60 min. zu beobachten war. Der Anstieg der Expression war bis zum Ende der Messungen nach 1.500 min erkennbar, wobei das VACV – MVA eine Ausnahme bildete. In diesem Fall bewegte sich das Expressionsniveau von CrmA und P28 nach 600 min wieder nach unten. Ein weiterer Unterschied zeigte sich in der Expressionsstärke der einzelnen Gene, wobei die mRNA von

F1L stets die höchste Expression aufwies, während, mit Ausnahme von MVA, CrmA und P28 vergleichbar stark exprimiert wurden. Im Fall der MVA Infektion wies CrmA eine deutlich schwächere Expression auf als P28. Grundsätzlich war die Expression der Immunmodulatoren bei VACV - LE mit $10^4 - 10^6$ Kopien/ 10^5 Kopien c-Myc nach 24h am stärksten und bewegte sich bei CMLV und CPXV im mittleren Bereich zwischen 10^3 und 10^4 Kopien, während sie bei VACV – MVA mit $10^{-2} - 10^3$ Kopien pro 10^5 Kopien c-Myc am geringsten war.

Die Expression der Immun-Modulatoren wurde nach dem gleichen Prinzip für infizierte HEK293 Zellen getestet. Es zeigte sich, dass auch HEK293 Zellen alle drei pockenviralen Proteine exprimieren und dass die Ergebnisse weitgehend auch auf diese Zelllinie übertragbar sind.

4.1.1 Unterschiede in der Expression zwischen pathogenen und nicht-pathogenen OPV

Bei den in Abbildung 6 gezeigten Ergebnissen fällt das als Impfstamm stark attenuierte VACV MVA auf. Da das Virus in der Lage ist Zellen zu infizieren, jedoch nicht neue Virionen aus den Zellen zu entlassen, kommt es im Fall von P28 und CrmA zu einer rückläufigen Entwicklung der auf die Kopienzahlen von C-Myc bezogenen mRNA Mengen. Die Expression von F1L bleibt als einzige auf einem stabilen Niveau auch nach 1.500 min. Unter den anderen drei untersuchten Viren ist CMLV als einziges bisher noch nicht als Humanpathogen aufgetreten. Hierbei ist festzustellen, dass der Anstieg der Expression, wie bei VACV und CPXV, zu Beginn der Infektion charakteristisch exponentiell ist. Am Ende des Messintervalls sind die Kopienzahlen bezogen auf C-Myc bei CMLV infizierten Zellen für F1L und CrmA nahezu um 2 Logstufen niedriger als bei VACV LE, während sich die Expression von P28 auf einem vergleichbaren Niveau befindet. Das untersuchte CPXV lag bei der Expression noch unter dem für CMLV gemessenen Niveau für die mRNA von P28 und CrmA. Da auch CPXV humanpathogen ist, konnte kein Hinweis dafür gefunden werden, dass mit zunehmender Expression der untersuchten Proteine auch die Pathogenität steigt.

4.2 Existenz von mRNA für Immun Modulatoren in VACV und CPXV Virionen

Um zu zeigen, ob OPV Partikel für früh exprimierte Proteine bereits mRNA mitführen, wurden OPV-Partikel aus infizierten Hep2 Zellen über Ultrazentrifugation durch ein Zuckerkissen aufgereinigt. Nach erfolgter RNA-Aufreinigung wurden die Proben mehreren, sukzessiven DNase-Verdauschritten ausgesetzt. Nach jedem Verdau wurden Proben für die quantitative real-time PCR entnommen. Als Kontrollen wurden (-)RT-Ansätze (cDNA-

Syntheseansätze ohne Reverse Transkriptase) zum Ausschließen von DNA-Kontaminationen mitgeführt.

Die aus den Viruspräparationen von VACV (IHDW) und CPXV (81/02) erhaltenen cDNA zeigten in spezifischen TaqMan qPCR positive Reaktionen für alle drei untersuchten Gene, die zwischen 22,0 und 32,5 c_T lagen. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, traten positive Signale für (-)RT-Kontrollen bei CrmA-CPXV und P28-CPXV auf und lagen zwischen 36,9 und 41,0 c_T . CPXV Virionen enthalten demnach im Vergleich mehr mRNA für CrmA und P28, während VACV Virionen mehr mRNA enthalten, die für F1L kodiert.

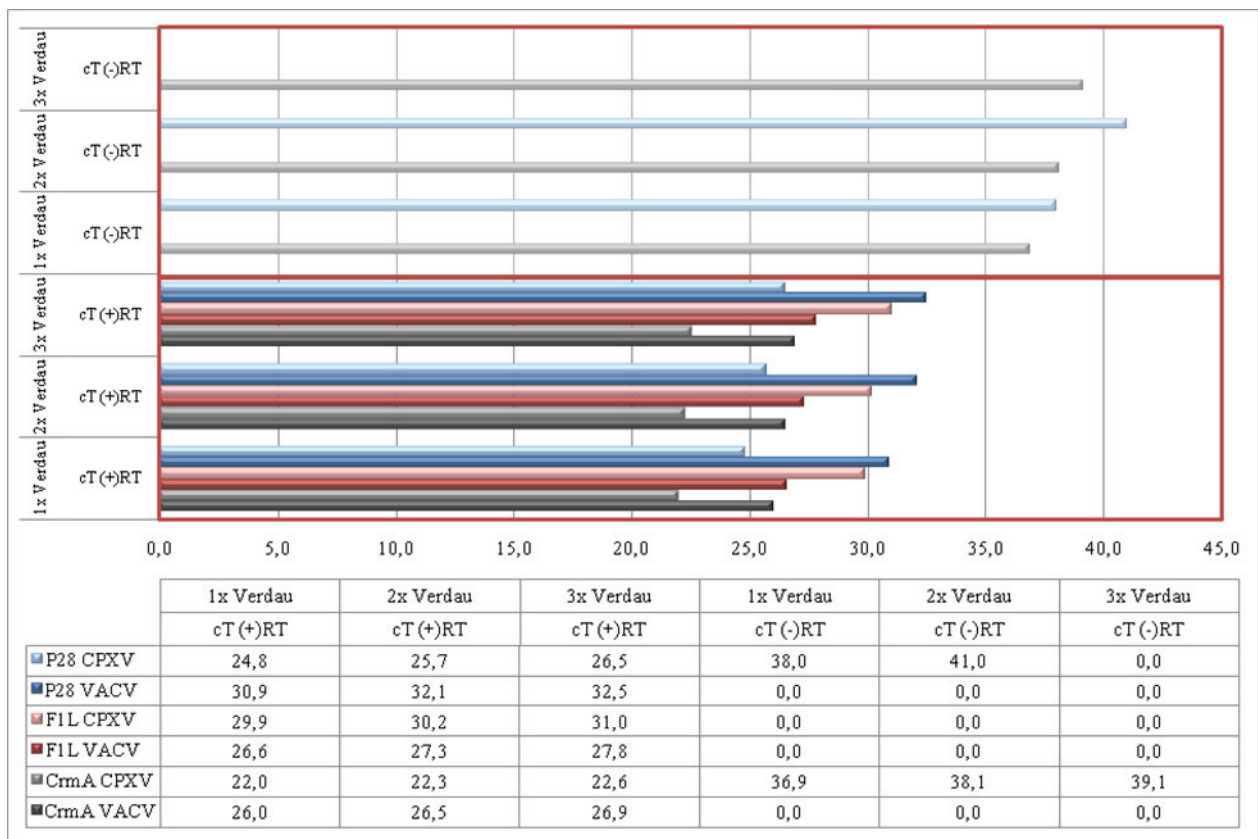


Abbildung 7: Untersuchung von OPV Virionen auf mRNA mittels qPCR. Die c_T -Werte der spezifischen qPCR mit aufgereinigter Virion-cDNA nach mehrfachem DNase-Verdau sind tabellarisch dargestellt. (-)RT steht für Kontrollansätze ohne RT. Ein Balkendiagramm verdeutlicht den Verlauf der c_T -Werte nach den einzelnen DNase Verdau Schritten.

4.3 Expression der Immun-Modulatoren nach dem Einsatz spezifischer siRNA

Nach der Optimierung der Transfektionmethodik mit Lipofectamine 2000 wurden Transfektionsraten von 30-60% auf HEK293 Zellen erreicht. Für eine Auswertung des Einflusses der RNAi auf Expressionsebene und Virusvermehrung wurden Transfektionsansätze mit mindestens 50% eGFP-positiven Zellen ausgewählt.

Eine Darstellung der *Knock down* Effekte auf VACV LE infizierte Zellen ist in Abbildung 8 dargestellt. Da in Vorversuchen ermittelt wurde, dass sich der Einfluss der siRNA nach 24h

nicht mehr signifikant verändert, wurden alle Proben nach dieser Zeit gesammelt (siehe auch (Dash, Tiwari et al., 2008)). Zudem nimmt die Qualität des *Knock downs* in Zellkulturen aufgrund des transienten Charakters der Transfektion mit der Zeit ab (Tuschl & Borkhardt, 2002; Amarzguioi, Holen et al., 2003).

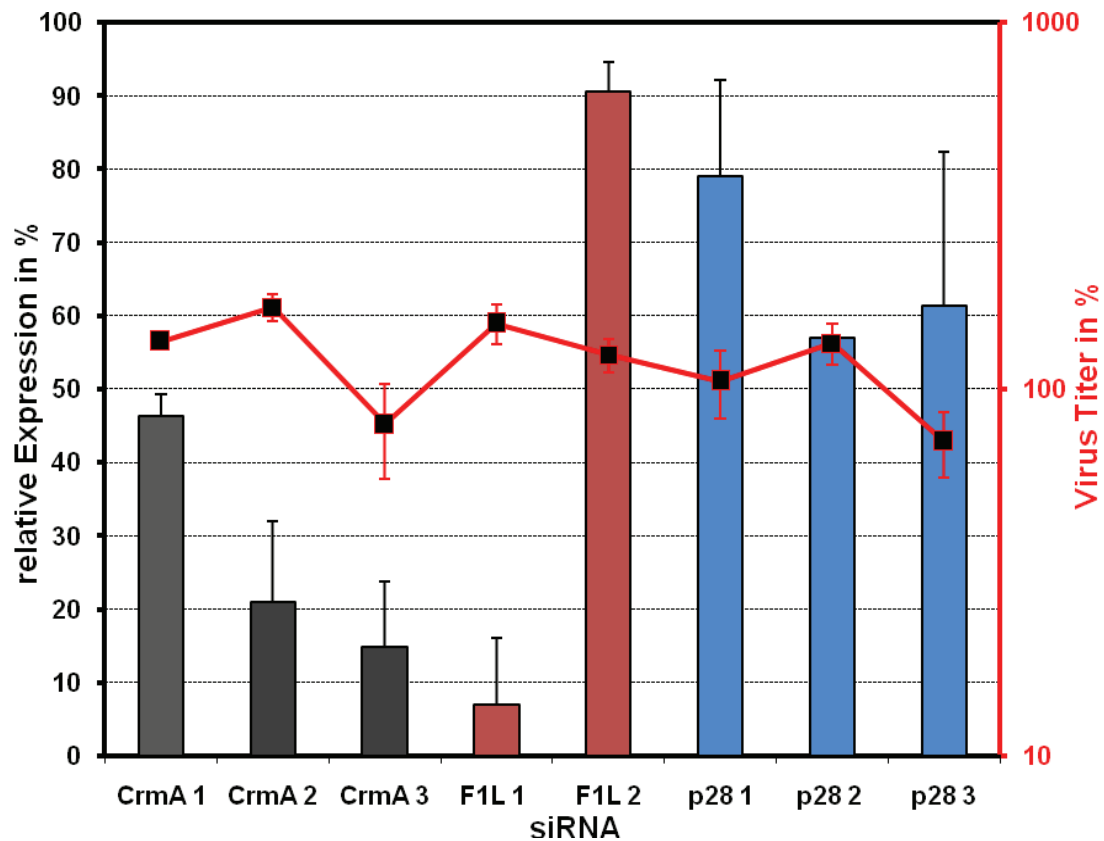


Abbildung 8: Einfluss der siRNA auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen. Das Bild zeigt die auf Scrambled Kontrollen bezogene, relative, virale mRNA, gemessen mittels qPCR. Auf der Sekundärachse ist der mittels Plaquetest bestimmte Virustiter verzeichnet (rote Kurve). Transfiziert wurde mit einzelnen siRNA-Plasmiden. n=3, + Standardabweichung

Die Transfektion mit siRNA gegen einzelne Targets führt zu einer unterschiedlich ausgeprägten unterdrückenden Wirkung auf die Expression der Apoptose Modulatoren. Die höchsten *Knock down* Raten wurden mit den siRNAs „CrmA 3“ (85%), „F1L 1“ (93%) und „p28 2“ (43%) erreicht, wobei die *Knock down* Rate den relativen Einfluss auf die Expression bezogen auf die „Scrambled“-transfizierten Kontrollen angibt. Die Entwicklung der ebenfalls auf die Scrambled-transfizierten Kontrollen bezogenen Virustiter lässt sich als stetig beschreiben – die Titer schwanken mit geringer Amplitude um 100%. Die relativen Titer schwankten leicht um den Wert 100%.

Um zu überprüfen, ob Kombinationen aus siRNA-Vektoren für dasselbe Protein (z.B.: „CrmA 1“ – „CrmA 3“) einen synergistischen Effekt haben, wurden siRNA Kombinationen

eingesetzt (Abbildung 9). Die *Knock down* Raten für die Apoptose Inhibitoren lagen bei 56% für CrmA, 57% für F1L und 81% für P28. Die relativen Virustiter bewegten sich im Bereich von 100%. Die Effektivität der Kombinationen ist somit im Vergleich zu einzeln eingesetzten siRNA geringer.

Um den Einfluss des Fehlens aller drei anti-apoptotischen Proteine zu untersuchen, wurde eine Kombination der besten siRNAs aus den Einzelversuchen transfiziert („CrmA 3“ + „F1L 1“ + „P28 2“). In Abbildung 10 sind die Ergebnisse für Versuche mit HEK293 Zellen dargestellt. Diese zeigten für die verwendeten Viren eine niedrigere Effektivität der siRNA. Abbildung 11 Zeigt die Ergebnisse des gleichen Ansatzes auf pCEF Zellen, wobei die Expressionsraten hier bis auf F1L-LE und CrmA-WR deutlich höher lagen.

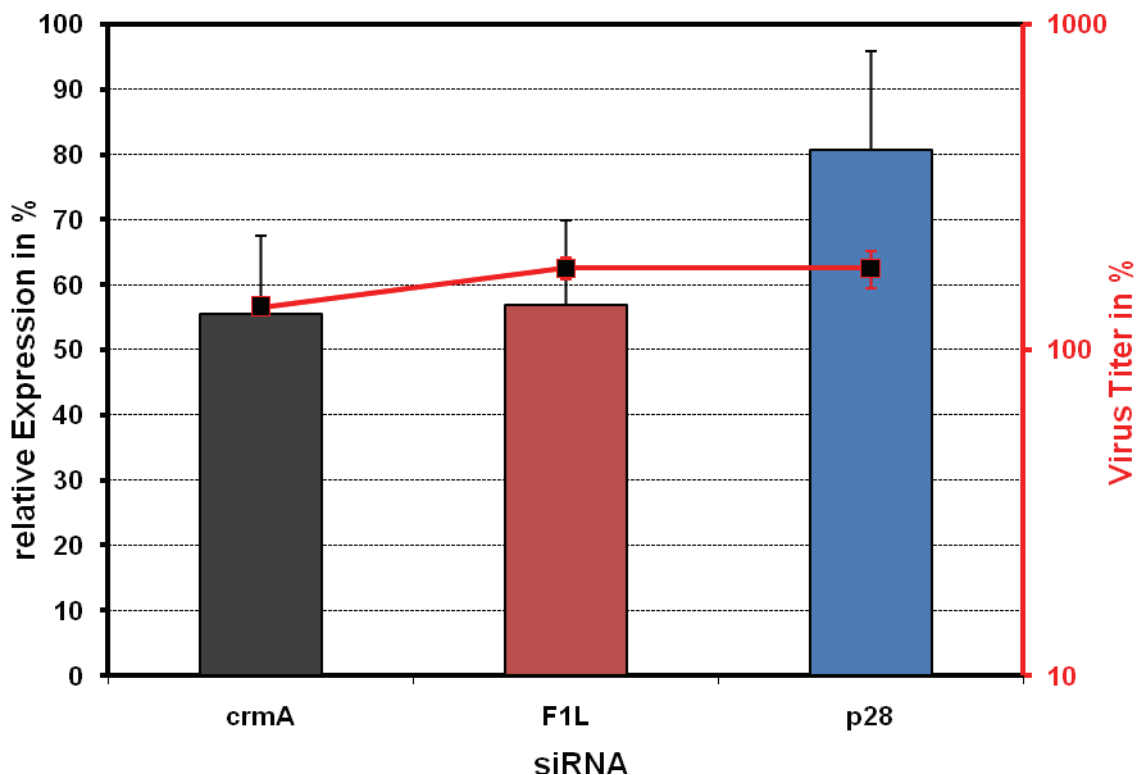


Abbildung 9: Einfluss der siRNA Einzelgen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen. Das Bild zeigt die auf Scrambled Kontrollen bezogene, relative, virale Genexpression auf mRNA-Ebene, gemessen mittels qPCR. Auf der Sekundärachse ist der mittels Plaquetest bestimmte Virustiter verzeichnet (rote Kurve). Transfiziert wurde mit Kombinationen aller siRNA-Plasmide für das jeweilige Gen (z.B.: „anti-CrmA 1-3“). n=3, + Standardabweichung

In Abbildung 12 ist zu sehen, wie sich die zytometrische Anreicherung siRNA-transfizierter Zellen auf die Effektivität des Gen *Knock downs* in der qPCR Messung auswirkte. Die relative Expression der pockenviralen Gene konnte im Fall von P28 für VACV auf 21% und für CMLV auf 11% reduziert werden. Die Anreicherung wurde mittels eines FACS-Sortierers

auf GFP-positive Zellen hin durchgeführt, wobei eine Reinheit von 95% erreicht wurde. Aufgrund der hohen Beanspruchung der sortierten Zellen war es jedoch nicht möglich transfierte und sortierte pCEF längere Zeit weiter zu kultivieren und zu infizieren.

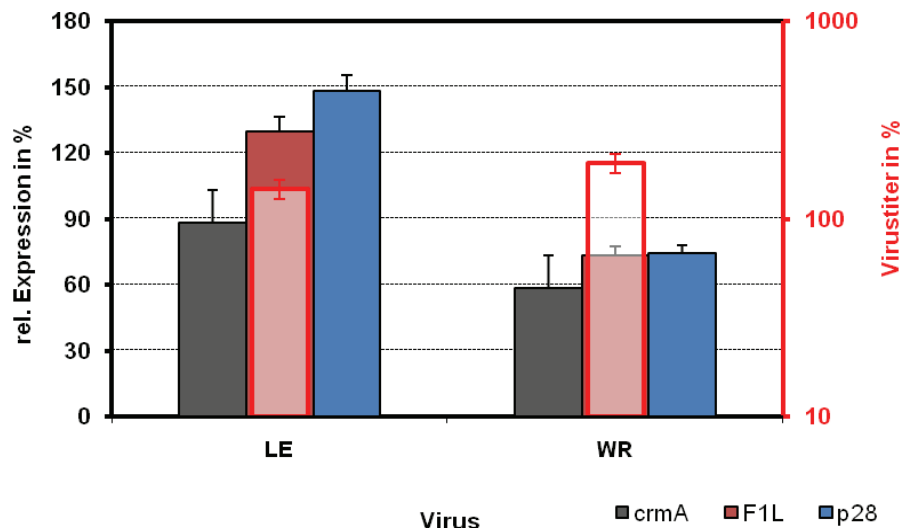


Abbildung 10: Einfluss der siRNA Multigen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen. Ein Vergleich der besten siRNA gegen jedes Gen, genutzt in Kombination auf LE und WR infizierten Zellen (MOI=1). Das Bild zeigt die auf Scrambled Kontrollen bezogene, relative, virale Genexpression, gemessen mittels qPCR. Auf der Sekundärachse ist der mittels Plaquetest bestimmte Virustiter verzeichnet (rote Balken). n=3, + Standardabweichung

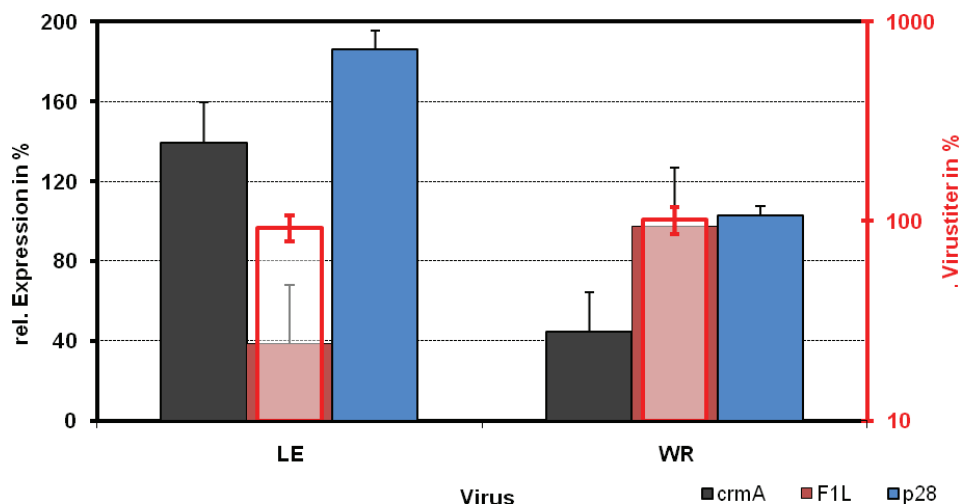


Abbildung 11: Einfluss der siRNA Multigen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in pCEF Zellen. Ein Vergleich der besten siRNA gegen jedes Gen, genutzt in Kombination auf LE und WR infizierten Zellen (MOI=0,5). Das Bild zeigt die auf Scrambled Kontrollen bezogene, relative, virale Proteinexpression auf mRNA-Ebene, gemessen mittels qPCR. Auf der Sekundärachse ist der mittels Plaquetest bestimmte Virustiter verzeichnet (rote Balken). n=3, + Standardabweichung

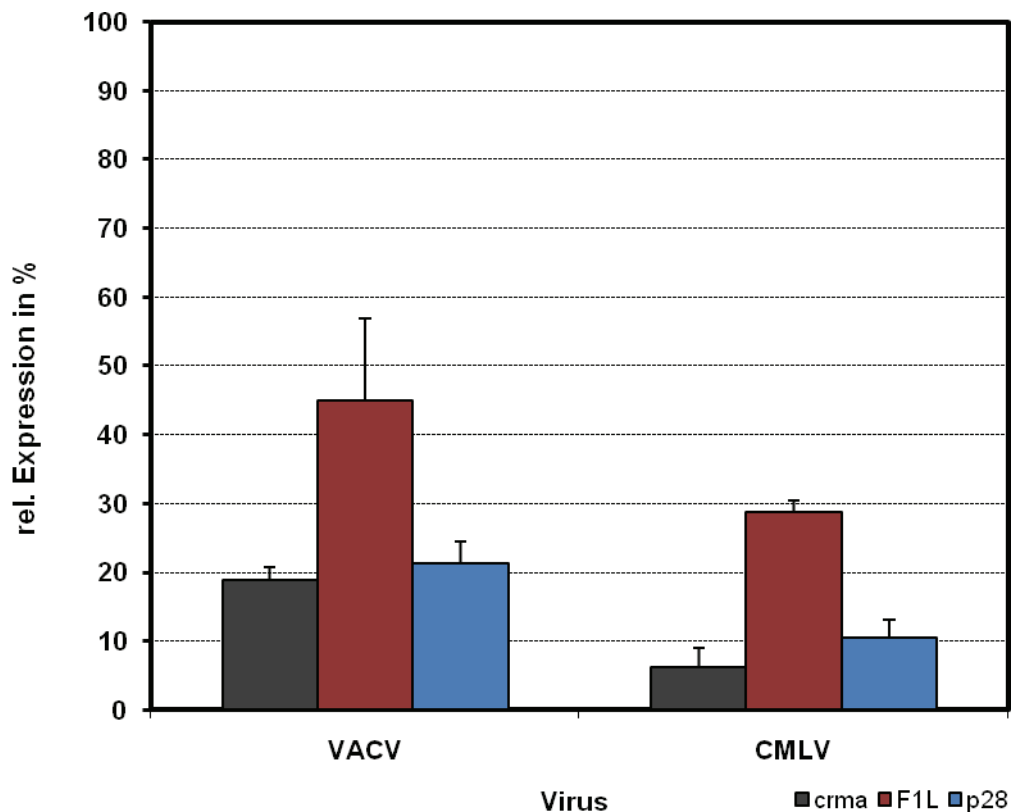


Abbildung 12: Genexpression nach der Infektion von FACS aufgereinigten, transfizierten HEK 293 Zellen. Das Bild zeigt die auf Scrambled Kontrollen bezogene, relative, virale Proteinexpression auf mRNA-Ebene, gemessen mittels qPCR. Nach der Transfektion mit der Kombination aus den besten siRNA wurden die Zellen im Durchflusssortierer selektioniert und mit einer MOI von 1 infiziert. n=3, + Standardabweichung

4.4 Untersuchung des Einflusses des siRNA Knock downs auf die Virusvermehrung

Die Virustiter in den siRNA Versuchen, die mithilfe einer Plaque-Titration ermittelt wurden, sind auf den Sekundärachsen der Abbildungen 8-11 dargestellt. Der höchste ermittelte Einfluss mit einer relativen Anzahl an PFU von 72% wurde nach einer P28 3 Transfektion auf HEK293 Zellen gemessen. Der Virustiter in den pCEF Zellen wurde auf bis zu 80% der relativen PFU Anzahl reduziert.

4.5 Einfluss der siRNA-Sequenz auf deren Interferenzwirksamkeit

Um den Einfluss der siRNA-Sequenz auf die Interferenz mit der mRNA zu interpretieren, wurden Sequenzen der betroffenen Immunmodulatoren mit den entsprechenden siRNA verglichen. Eine Darstellung der Sequenzhomologien ist in Abbildung 13 dargestellt.

Die Effektivität der anti-CrmA-siRNA wird durch nur im Fall von VACV WR von Sequenzunterschieden bestimmt. Bei beiden siRNA gegen F1L sind die betroffenen

Sequenzbereiche komplett homolog, während anti-P28-3 im mittleren Bereich eine Base Unterschied zum VACV LE Gen aufweist.

```

CPXV GuWi  GATGTCAATGAAGAGTATACAGAAGCAGCTGCAGCAACTTCTGTACTAGTGGCAGACTGTGCATCAACAGTTACAAATG
VACV LE    GATGTCAATGAAGAGTATACAGAAGCAGCTGCAGCAACTTCTGTACTAGTGGCAGACTGTGCATCAACAGTTACAAATG
VACV WR    GATGTCAATGAAGAGTATACAGAAGCAGCTGCAGCAACTTCTGTACTAGTGGCAGACTGTGCATCAACAGTTACAAATG
CrmA 1     -----GATGTCAATGAAGAGTATACAGAA-----GACTGTGCATCAACAGTTACA-----
CrmA 2     -----GTCAATGAAGAGTATACAGAA-----GTGGCAGACTGTGCATCAACA-----
CrmA 3     -----GTGGCAGACTGTGCATCAACA-----

VACV LE    CTATATGAGTAAACAACGTTTAGACGACTTG~~~~CATGTATGATATGGCATCTACAAAATCAT
VACV WR    CTATATGAGTAAACAACGTTTAGACGACTTG~~~~CATGTATGATATGGCATCTACAAAATCAT
CPXV GuWi  CTATATGAGTAAACAACGTTTAGACGACTTG~~~~CATGTATGATATGGCATCTACAGAATCAT
F1L 1      -----ATGAGTAAACAACGTTTAGAC-----TGATATGGCATCTACAGAATC-----
F1L 2      -----TGATATGGCATCTACAGAATC-----

VACV LE    AGGGACTATATGACTAACTTATCTAGAGATACAGGAATACAACAATC~~~~~GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT
VACV WR    AGGGACTATATGACTAACTTATCTAGAGATACAGGAATACAACAATC~~~~~GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT
CPXV GuWi  AGGGACTATATGACTAACTTATCTAGAGATACAGGAATACAACAATC~~~~~GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT
p28 1      -----AGGGACTATATGACTAACTTATCTAGAGATACAGGAATACAACAATC~~~~~GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT
p28 2      -----AGGGACTATATGACTAACTTATCTAGAGATACAGGAATACAACAATC~~~~~GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT
p28 3      -----GGACTATATGACTAACTTAT-----AGATACAGGAATACAACAAT-----GGGTTGGTAAATTGGTACATAGCT

```

Abbildung 13: siRNA Sequenzalignments. Das Bild zeigt Sequenzbereiche von CrmA (A), F1L (B) und P28 (C), in denen siRNA Interferenz auftritt. Sequenzabweichungen zwischen Virusgenom und siRNA wurden durch weiße Kästchen markiert. Der Verlauf der dargestellten Genabschnitte ist nicht durchgehend (gewellte Linien zeigen an, dass an der Stelle ein Teil der Sequenz zu Darstellungszwecken entfernt wurde). Die Darstellung wurde mit BioEdit 7.0.9 Software erstellt.

4.6 Charakterisierung der in Hühnereiern generierten IgY-Ak

4.6.1 Anstieg der spezifischen IgY Titer in Hühnereiern nach DNA Immunisierung

Nach erfolgter DNA-Immunisierung der Hühner mittels Gene Gun wurden die Eier, wie im Methodenteil beschrieben, gesammelt und aufgereinigt. Die ersten Charakterisierungsschritte bestanden aus der Verifizierung und Messung des Gehalts an IgY im Eidotter.

Die IgY Extraktion wurde mittels SDS-Gelelektrophorese kontrolliert, wobei Ak-Präparationen aus „prä-immunen“ und „post-immunen“ Eiern verwendet wurden. Abbildung 14 zeigt die Proteinzusammensetzung im Eidotter nach IgY Aufreinigung.

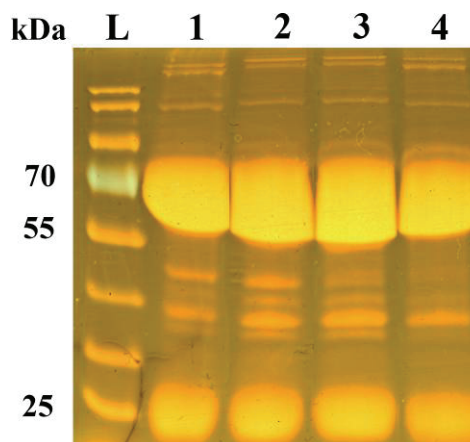


Abbildung 14: Proteinzusammensetzung im aufgereinigten Eidotter. Das Coomassie gefärbte SDS-Acrylamidgel zeigt die Zusammensetzung des Eidotters. L markiert die aufgetragene Größenleiter und 1-4 die Probenspalten, wobei 1-2 Proben des anti-F1L-IgY an den Tagen 35 und 110 nach der Immunisierung zeigen. Die Spalten 3-4 zeigen Proben von anti-P28 an den Tagen 35 und 65. Die jeweils zwei größten Banden in allen Proben zeigen die schweren (60 kDa) und leichten (25 kDa) Ketten des aufgereinigten IgY. Da sich der

Gesamtgehalt an IgY nicht signifikant ändert, muss sich die jeweilige Zusammensetzung der einzelnen IgY im Gemisch verändern und somit das Verhältnis von spezifischen zu unspezifischen Ak.

Die aufgetragenen Proben zeigten eine Auftrennung der IgY Moleküle in schwere (60 kDa) und leichte (25 kDa) Ketten (Warr, Magor et al., 1995).

Der Gehalt an Gesamt-IgY in den gesammelten Eiern wurde durch eine photometrische Messung bestimmt. Gemessen wurden Werte zwischen 15,7 mg/ml und 32,1 mg/ml, wobei der Mittelwert aller untersuchten Proben bei 24,7 mg/ml lag. Da pro Ei 2 ml Ak aufgereinigt wurden, geht man von einem durchschnittlichen IgY Gehalt von 49,4 mg pro Ei aus. Bei 350 gesammelten Eiern im Jahr würde man eine durchschnittliche Menge von 17,5 g Ak pro Ei erhalten. Obwohl jedes Huhn im Durchschnitt ein Ei am Tag legte, wurde nur jedes dritte für eine Aufreinigung aufgehoben. Die Proben wurden bis zu 120 Tage nach der Immunisierung gesammelt, beginnend mit Tag 31.

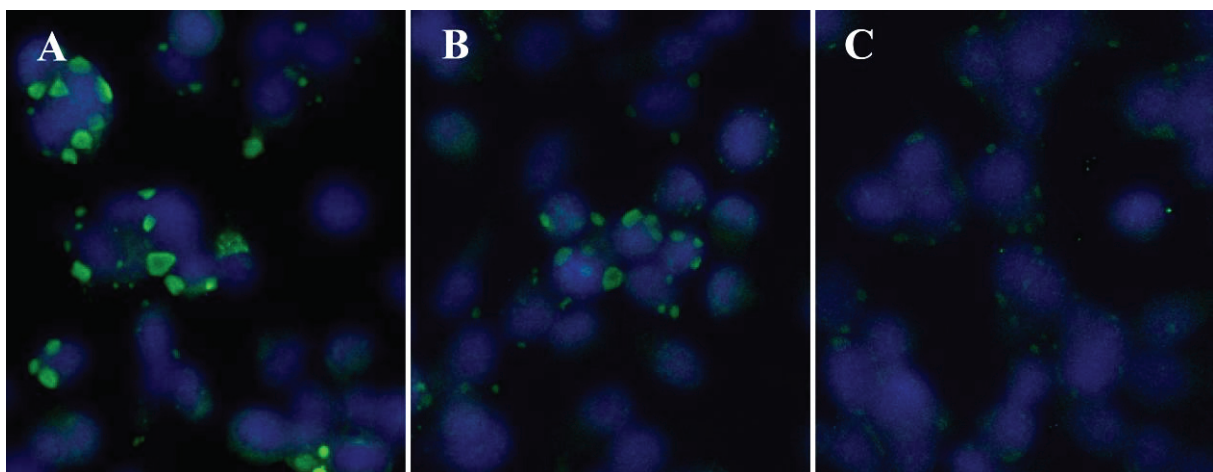


Abbildung 15: Beispiel einer IgY Verdünnungsreihe. Das Bild zeigt die Färbung ECTV-infizierter Hep2 Zellen mittels anti-P28-IgY (grün) und DAPI (Nukleus/blau). Es wurden folgende IgY-Verdünnungen verwendet: **A:** 1:20 (positiv), **B:** 1:200 (positiv), **C:** 1:2000 (negativ).

Abbildung 15 zeigt beispielhaft den Ausschnitt einer IgY Verdünnungsreihe, in dem zu sehen ist, wie der Ak-Titer bestimmt wurde. Die Verdünnungen 1:20 und 1:200 zeigten noch deutliche grüne Signale und wurden als positiv gewertet, während bei der 1:2000 Verdünnung die nur noch sehr schwache Färbung bereits als negativ galt. Der in Abbildung 15 gezeigte Ak hatte somit einen Titer von 1:200.

Abbildung 16 zeigt den aufgrund von einzelnen Titerbestimmungen erstellten Verlauf der IgY-Titer in den gesammelten Eiern für alle generierten IgY Ak. Die Sammlung der Proben begann für anti-Crma am Tag 20 und für anti-F1L und anti-P28 am Tag 31 nach der Immunisierung.

Der anti-CrmA-Ak war bereits nach 20 Tagen mit einem hohen Titer von 1:2.000 detektierbar und stieg in kurzer Zeit auf ein Maximum von 1:20.000 nach 30 Tagen an. Weiterhin sank er über Werte von 1:2.000 am Tag 50 bis 1:20 am Tag 82 und verblieb auf diesem niedrigen Niveau bis zum Abschluss des Experimentes detektierbar. Der anti-F1L-Ak war nach 31 Tagen nachweisbar (1:20) und stieg kontinuierlich über Titer von 1:2.000 nach 60 Tagen bis zu 1:80.000 nach 100 Tagen (3. Vakzination an Tag 90) und sank bis auf 1:40.000 am Ende der Überwachungsperiode (Tag 120). Die Immunisierung mit dem P28-Plasmid führte bis zum 60. Tag zu einem sehr ähnlichen Titerverlauf wie für anti-F1L, wobei der anti-P28 Titer nach 70 Tagen rapide sank und nach Tag 87 trotz einer weiteren Vakzination nicht mehr detektiert werden konnte.

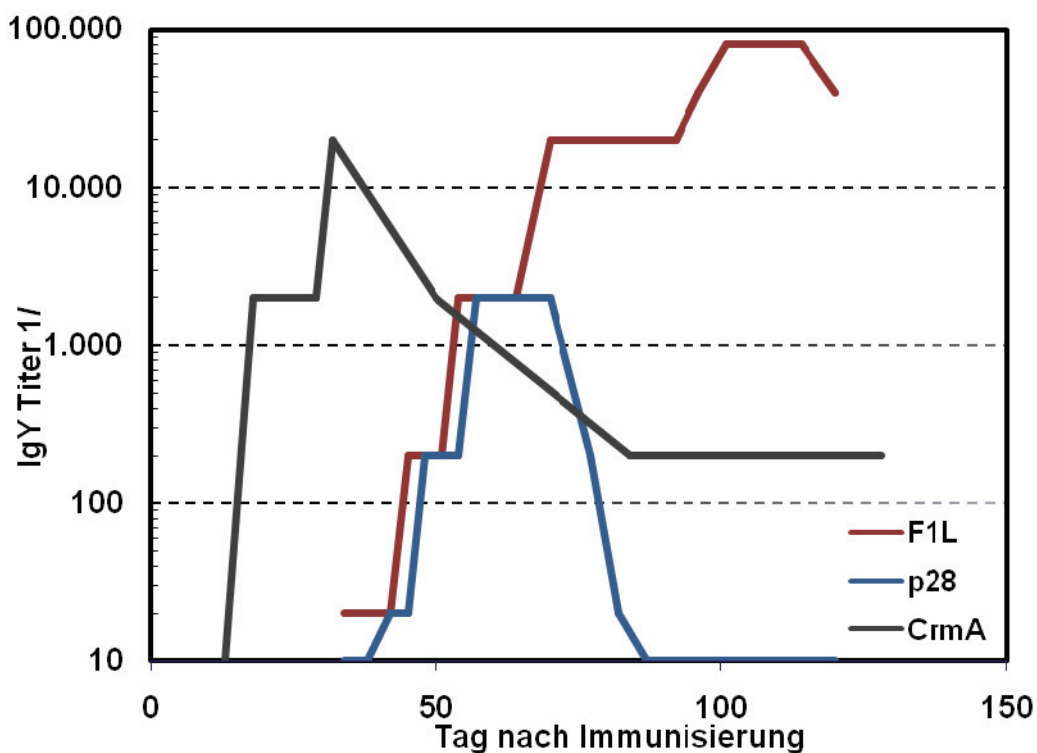


Abbildung 16: Titerentwicklung spezifischer IgY in Hühnereiern nach DNA-Immunisierung. Das Bild zeigt die Ergebnisse von IgY Titrationen mittels Immunzytochemie. Es sind die spezifischen Titer für anti-CrmA (schwarz), anti-P28 (blau) und anti-F1L (rot) dargestellt.

4.6.2 Charakterisierung der IgY mittels Immunzytochemie

Transfizierte Zellen exprimierten OPV Apoptose Modulatoren, die an YFP fusioniert waren und wurden genutzt, um die Spezifität der generierten IgY zu überprüfen. Abbildung 17 zeigt Aufnahmen der mit den entsprechenden Proteinen transfizierten Zellen, die die Spezifität der Ak für die jeweiligen Proteine durch eine ko-Lokalisation der Signale verdeutlichen.

Weiterhin wurden mit verschiedenen OPV infizierte Zellen genutzt, um die Generik der IgY für möglichst viele Homologa der pockenviralen Proteine zu überprüfen. Abbildung 18 zeigt

mit unterschiedlichen OPV infizierte Zellpräparate, die mit den generierten IgY gefärbt wurden. Negativkontrollen (transfiziertes rpo18 Protein) und Sekundärantikörper Kontrollen blieben in Vorversuchen negativ, genauso, wie IgY-Präparationen aus Eiern vor dem ersten Immunisierungstermin. Es zeigte sich, dass alle Antikörper OPV-infizierte (VACV WR, CPXV, ECTV) Zellen anfärbten. Eine Ausnahme bildete VACV LE, welches ein stark trunkiertes P28 besitzt, das nicht vom anti-28-IgY erkannt wurde (Daten nicht gezeigt). Auffällig war, dass die Färbungen von VACV eher diffus im Zytoplasma infizierter Zellen verteilt waren, während bei CPXV und ECTV hauptsächlich Virusfabriken angefärbt wurden. Allerdings kamen je nach Virusspezies auch Mischformen dieser Färbemuster vor.

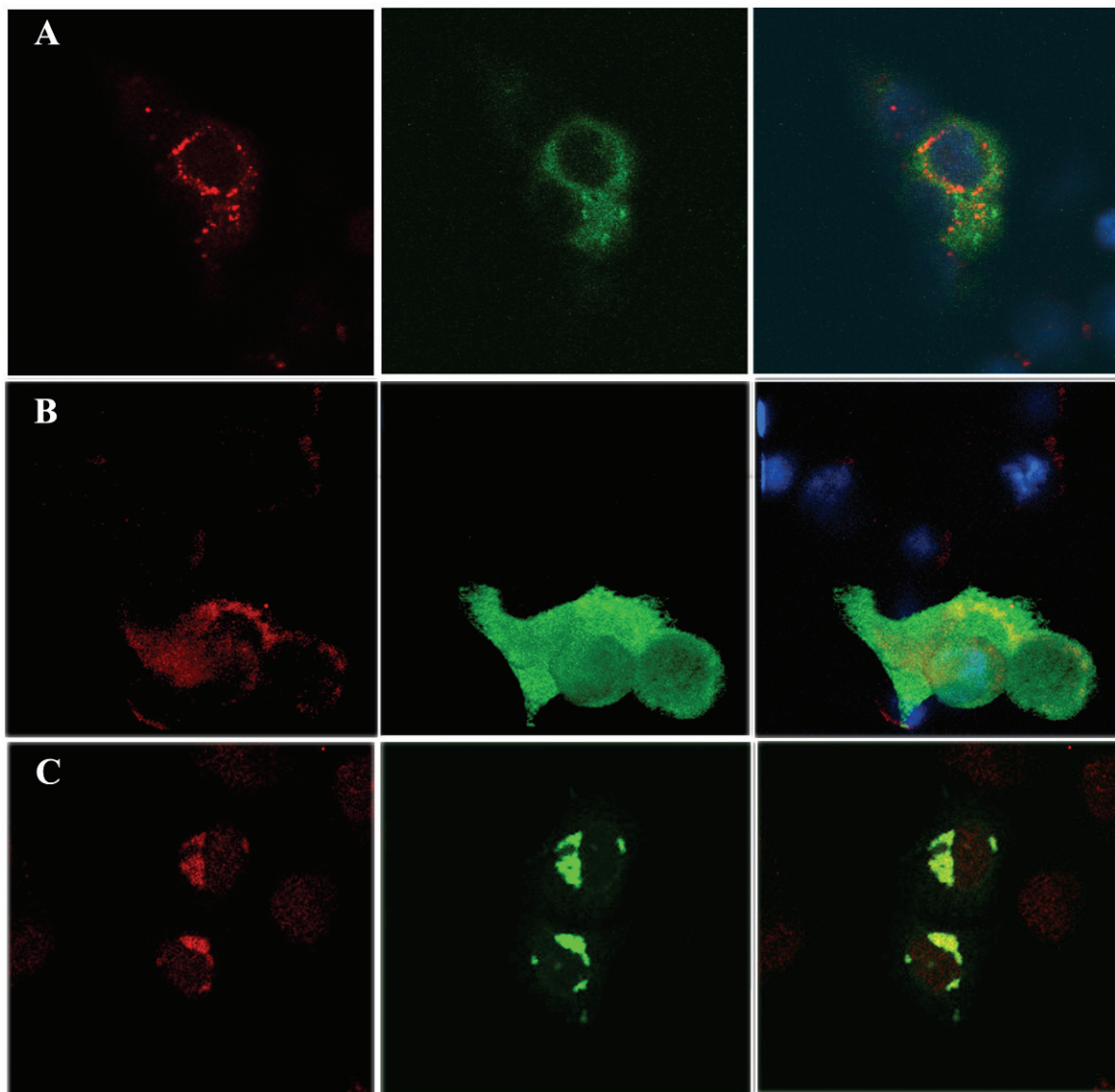


Abbildung 17: Spezifitätsnachweis der generierten IgY. HEK293 Zellen wurden mit pcDNA6.2 Expressionsplasmiden transfiziert, die YFP-gekoppelte Homologa der OPV Apoptose Modulatoren exprimierten: **A:** P28 exprimierende Zellen markiert mit anti-P28-IgY (rot), Fusioniertem eGFP (grün) und

DAPI (Nukleus/blau) Zeile, **B**: CrmA exprimierende Zellen markiert mit anti-P28-IgY (rot), Fusioniertem eGFP (grün) und DAPI (Nukleus/blau) Zeile, **C**: F1L exprimierende Zellen markiert mit anti-P28-IgY (rot), Fusioniertem eGFP (grün) und DAPI (Nukleus/blau) Zeile.

Die einzigen kommerziell erhältlichen Ak gegen CrmA (Promega) konnten nicht erfolgreich für eine Färbung eingesetzt werden.

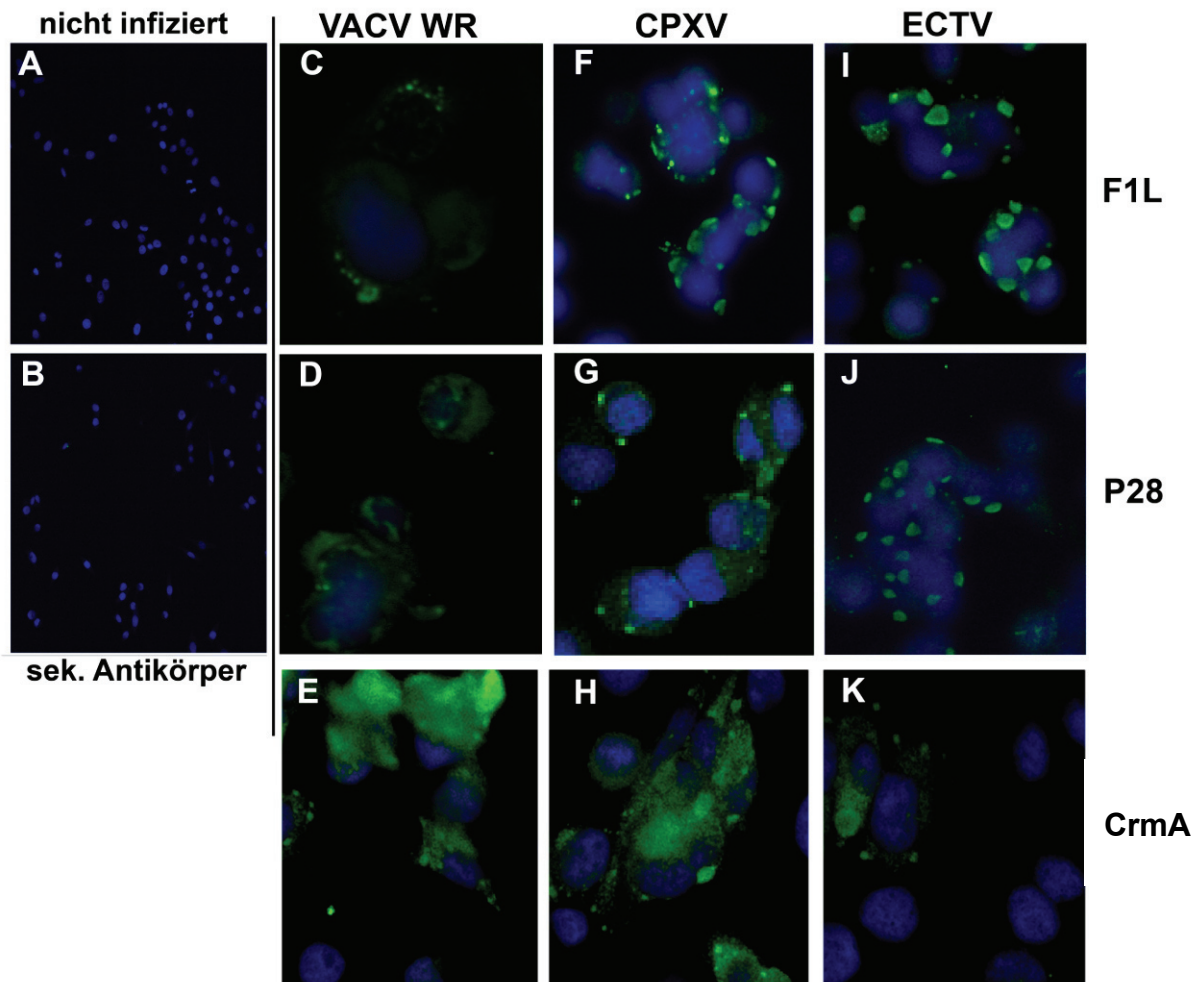


Abbildung 18: Testung der Spezifität der IgY-Ak. Als Kontrolle des generischen Charakters der Ak für OPV wurden mit unterschiedlichen OPV infizierte HEP-2 Zellen immunozytochemisch gefärbt. Die Färbung wurde mit DAPI (Nukleus/blau) und einem FITC markierten anti-IgY-Ak (grün) durchgeführt. **A**: nicht-infizierte Kontrolle mit allen IgY, **B**: CPXV-infizierte Zellen als Sekundär-Ak Kontrolle, **C, D und E**: VACV-WR-infizierte Zellen, **F, G und H**: CPXV-infizierte Zellen, **I, J und K**: ECTV-infizierte Zellen.

In Abbildung 19 ist beispielhaft eine Z-Stapel Aufnahme von infizierten HEK293 Zellen gezeigt. Sie verdeutlicht die Lokalisation der Anfärbung von P28 mit dem entsprechenden IgY-Ak in den Virusfabriken, was durch zusätzliche Anfärbung mit einem polyklonalen anti-OPV-Ak verdeutlicht wird.

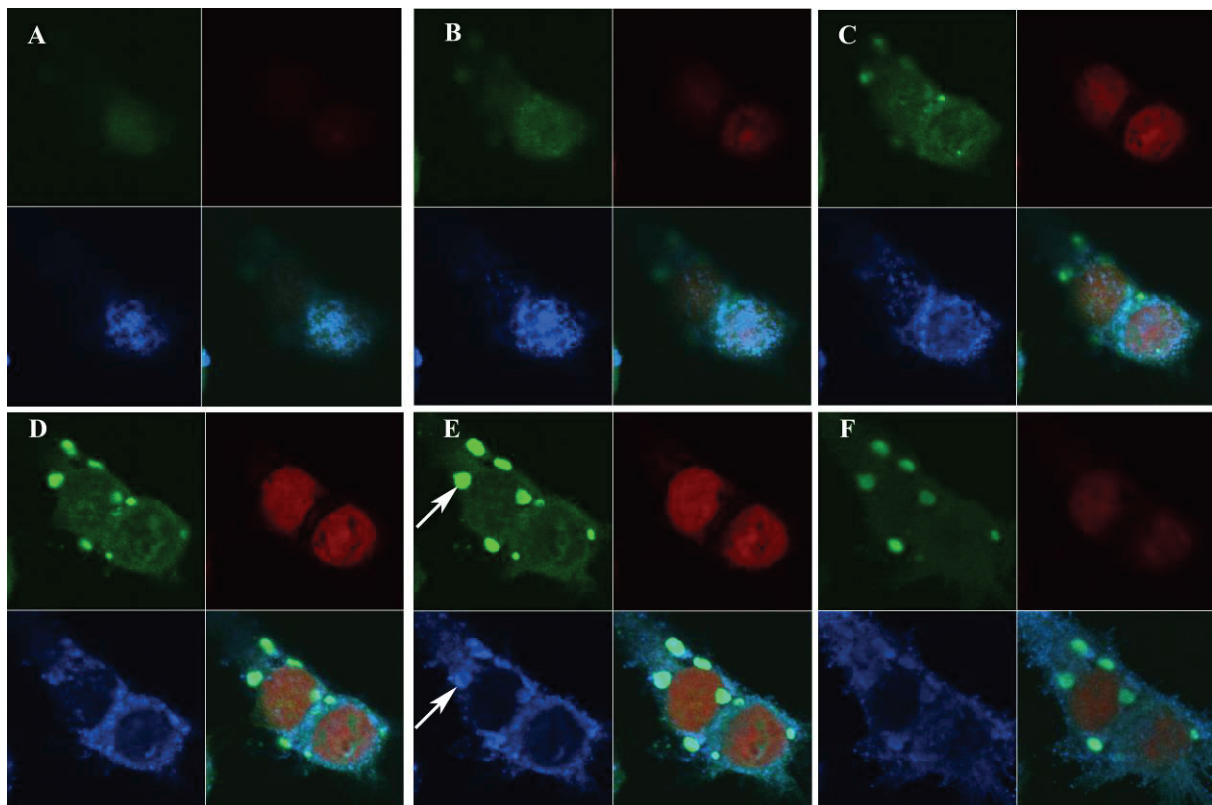


Abbildung 19: Visualisierung von Virusfabriken mittels Immunzytochemie mit anti-P28-IgY. Eine Z-Stapel Aufnahme von CPXV infizierten Zellen verdeutlicht die Anfärbung der Einschlusskörperchen durch die generierten Ak. IgY werden in grün dargestellt, PI als Kernfarbstoff in rot und polyklonale anti-Pocken-Ak in blau. Der Stapel beginnt mit **Bild A** und führt sequentiell durch das Präparat bis **Bild F**. Der Ebenenabstand beträgt 0,4 μm .

4.7 Expression der pockenviralen Apoptose Modulatoren auf Proteinebene in Zelllinien

Nach dem Nachweis der RNA-Expression der Apoptose modulatorischen Gene stellte sich die Frage nach der Proteinexpression der untersuchten OPV Proteine in infizierten Zellen. OPV infizierte Zellen ($\text{MOI} = 1$) wurden fixiert und mithilfe von spezifischen IgY auf die Existenz von CrmA, F1L und P28 hin mikroskopisch untersucht. Abbildung 20 und Abbildung 21 zeigen beispielhaft den Verlauf einer OPV Infektion nach einer Färbung mit anti-CrmA IgY und polyklonalen anti-OPV-Ak. Dabei fällt auf, dass die OPV Infektion bis 10h nur schwach und vereinzelt erkennbar ist. Die IgY Färbung (rot) zeigt ein positives Signal in infizierten Zellen und färbt zudem auch Zellen an, die keine Pockenfärbung aufweisen. Ab 12h p.I. sind deutlich Virusfabriken in infizierten Zellen erkennbar und nach 24h sind alle sichtbaren Zellen infiziert. Auch im IgY Kanal (rot) sind die sogenannten viralen Einschlusskörperchen bereits nach 12h p.I. deutlich erkennbar. Bei schwachen spezifischen Signalen ist eine Hintergrundfärbung des IgY zu sehen. Bei vergleichbaren Färbungen mit anti-F1L-IgY-Ak verlief die Infektion ähnlich wie zuvor, jedoch schien das IgY Signal zunächst um den

Zellkern herum aufzutreten. Nach 18h war auch eine Anfärbung der viralen Einschlusskörperchen zu erkennen.

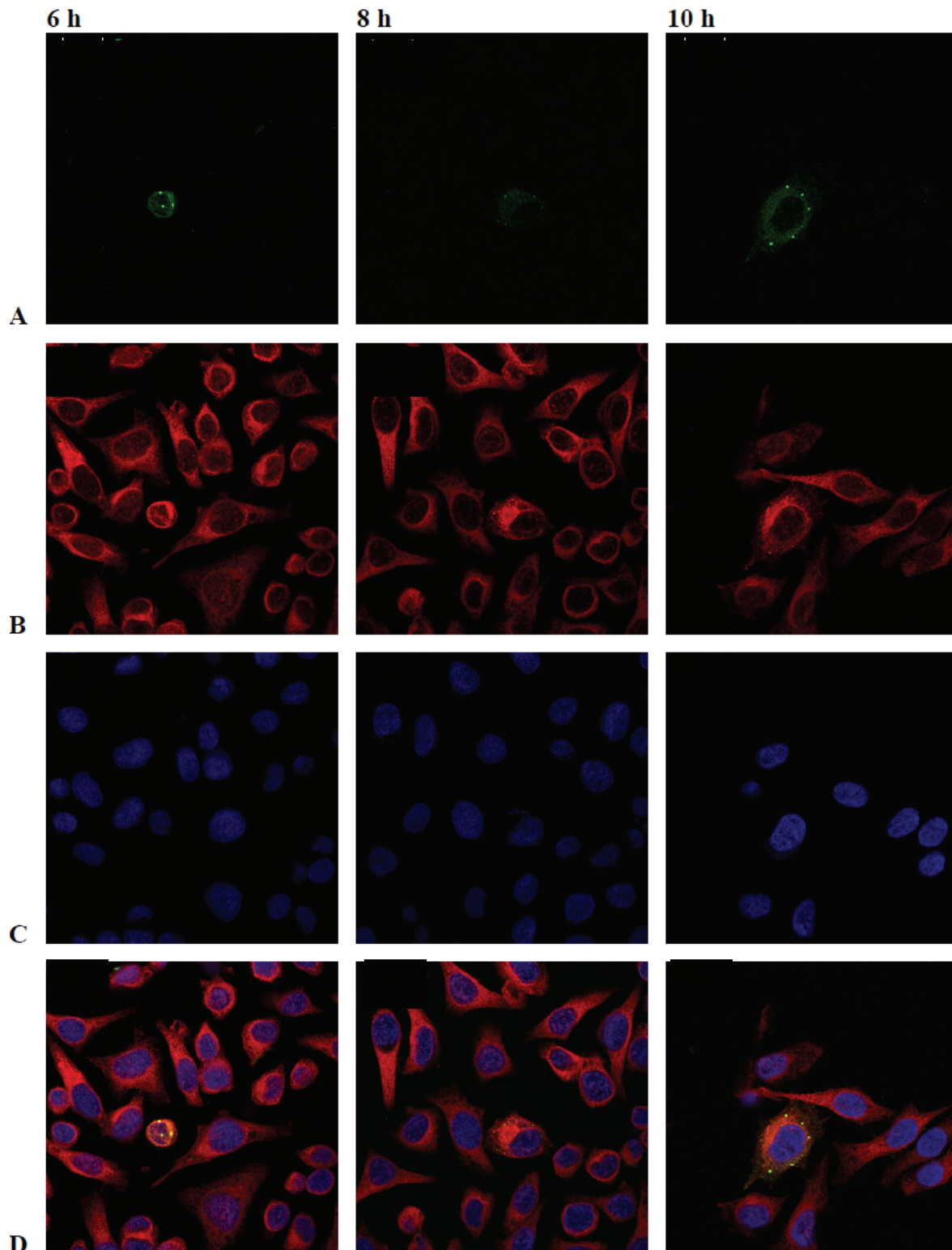


Abbildung 20: Expression von CrmA nach einer OPV Infektion (6-10 h). Das Bild zeigt VACV infizierte HEK293 Zellen, die mit anti-VACV-IgG (grün / Zeile A), anti-CrmA-IgY (rot / Zeile B) und To-Pro-3 (blau / Zeile C) gefärbt wurden. Die einzelnen Spalten zeigen bestimmte Zeitpunkte (6 – 10h) der Infektionskinetik. Zeile D zeigt alle Farbkanäle gemeinsam.

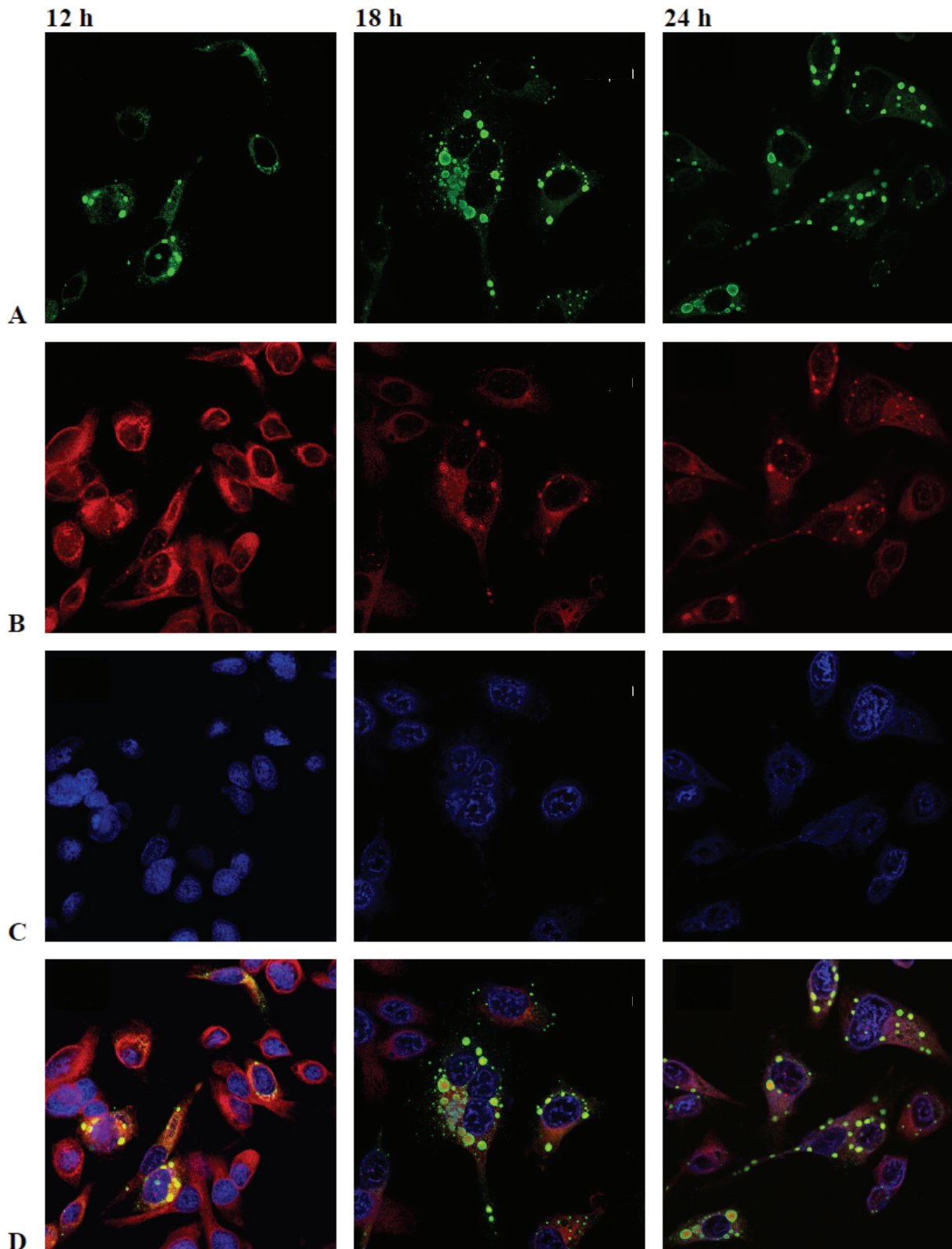


Abbildung 21: Expression von CrmA nach einer OPV Infektion (12-24 h). Das Bild zeigt VACV infizierte HEK293 Zellen, die mit anti-VACV-IgG (grün / Zeile A), anti-Crma-IgY (rot / Zeile B) und To-Pro-3 (blau / Zeile C) gefärbt wurden. Die einzelnen Spalten zeigen bestimmte Zeitpunkte (12 – 24h) der Infektionskinetik. Zeile D zeigt alle Farbkanäle gemeinsam

Dabei fiel auf, dass die IgY Einfärbung um den Kern herum bereits nach 6h an einigen nicht mit anti-VACV-Ak angefärbten Zellen zu erkennen war. Die Lokalisation des P28 Proteins war ähnlich wie die von F1L: Um den Kern infizierter Zellen herum erfolgte eine Anhäufung und wurde ab 12h mit dem Auftreten von Einschlusskörperchen diffuser. Die Einschlusskörperchen wurden vom Ak in diesem Fall nicht angefärbt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass infizierte Zellen spätestens zum Zeitpunkt des Auftretens von Einschlusskörperchen ein deutliches Signal für Immunmodulatoren zeigen. Außer P28 sind die Proteine auch in den Virusfabriken vorhanden. Einige Zellen zeigen 6-10h nach der Infektion Anzeichen eine Proteinexpression ohne vom polyklonalen anti-VACV-Ak angefärbt zu werden.

4.7.1 Etablierung eines quantitativen Virus Neutralisationstests im xCELLigence System zur weiteren Charakterisierung von IgY

Die als Vorversuch durchgeführte Virustitration im xCELLigence System sollte die grundsätzliche Eignung des Gerätes zur Unterscheidung verschiedener MOIs anhand des Zellindex (CI) aufzeigen. Die Ergebnisse der Titrationsversuche sind in Abbildung 22 und Abbildung 23 gezeigt.

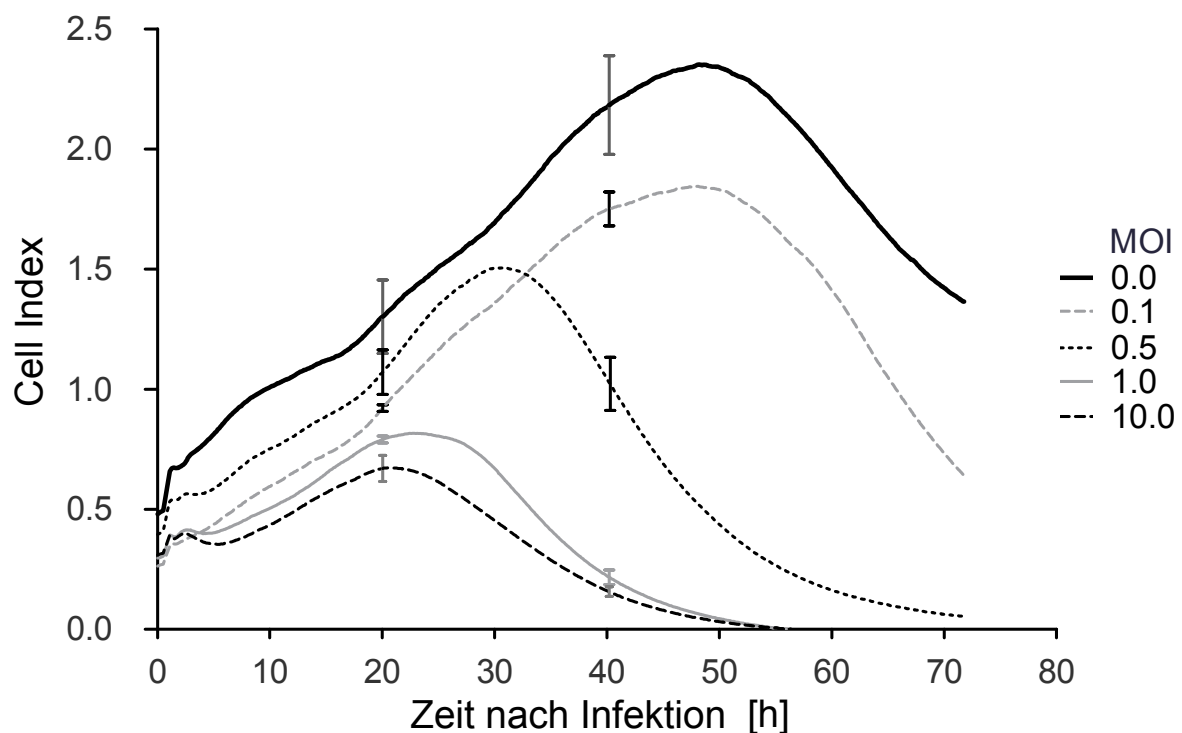


Abbildung 22: Virustitration im xCELLigence System. Auf jeweils 5000 HEK293 Zellen pro Kavität wurde VACV IHDW in den MOI 0,1; 0,5; 1,0 und 10,0 pipettiert. Der Zellindex wurde über einen Zeitraum von 72h nach der Infektion gemessen. Verlauf des CI über die Zeit (n=3, $\pm$ SD).

Die unterschiedliche Ausprägung des CI in Abhängigkeit von der MOI ist klar erkennbar. Mit steigender Virusmenge verschiebt sich das Maximum der CI-Kurve in Richtung des Koordinatenursprungs, als auch der Funktionswert des Maximums in Richtung CI=0. Das Maximum wird somit früher nach der Infektion erreicht. Eine hohe MOI bedeutet eine flache Kurve und einen schnellen Zelltod und im Gegensatz dazu bedeutet ein hohes Maximum eine hohe Interaktion von Zellen mit dem Untergrund der Kavität und damit eine höhere Fitness der Zellen. Zellen mit Virus-freiem Medium erreichten hohe CI Werte von $2,34 \pm 0,09$ nach 82,6 h. Kulturen mit der höchsten MOI zeigten eine niedrige Amplitude von $0,69 \pm 0,01$ CI und ein frühes Maximum nach 44 h.

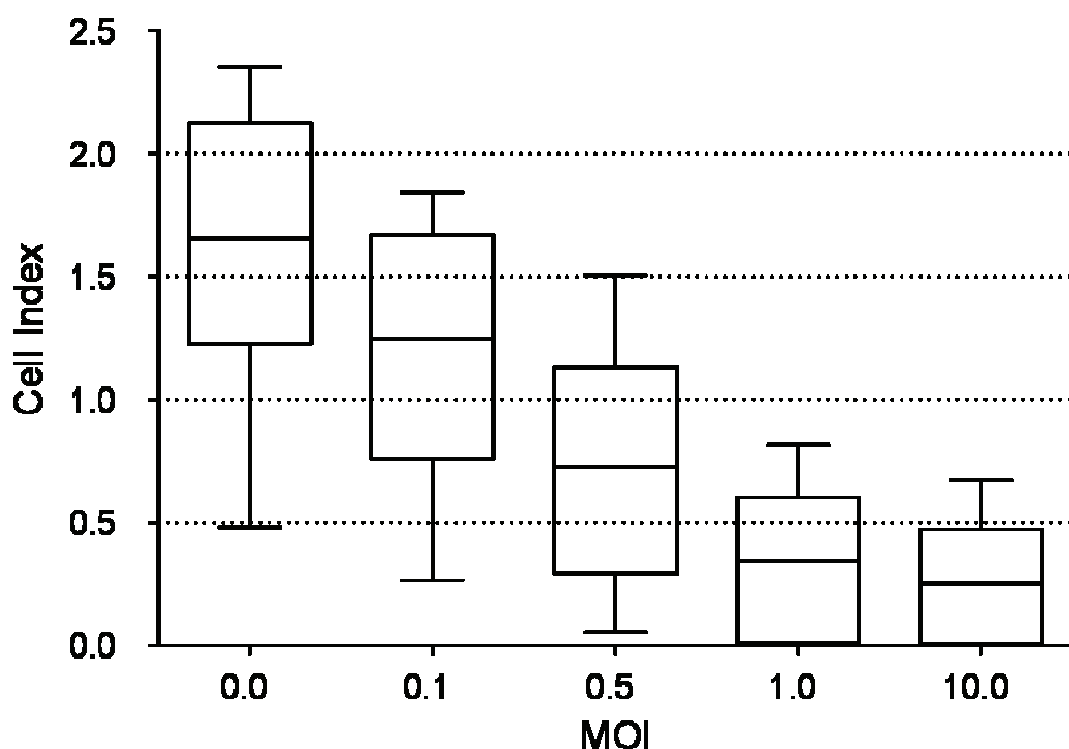


Abbildung 23: Virustitration im Box-and-whisker-Diagramm. Auf jeweils 5000 HEK293 Zellen pro Kavität wurde VACV IHDW in den MOI 0,1; 0,5; 1,0 und 10,0 pipettiert. Der Zellindex wurde über einen Zeitraum von 72h nach der Infektion gemessen (vgl. Abbildung 22). Verlauf der gesamten Zellindizes nach der Infektion für jede MOI in einem Box-and-whisker-Diagramm (Tukey Whisker). Die Kästchen stellen 95% der Daten über den gesamten zeitlichen Verlauf des Experiments dar. Die Linien in den Kästchen stehen für die Mediane und Balken zeigen die äußeren 5% der Meßpunkte an.

Nach der Etablierung der Virustitration wurden Neutralisationstests durchgeführt. Zunächst wurden Seren und Antikörperpräparationen im klassischen NT Test charakterisiert, um die Ergebnisse aus dem xCELLigence System bewerten zu können. Abbildung 24 zeigt beispielhaft den Verlauf eines NT-Tests im xCELLigence System. Dabei wurden zur Neutralisation IgY gegen OPV-Gesamtpartikel in Kombination mit VACV IHDW benutzt. Es ist zu erkennen, dass die CI-Kurve mit zunehmender Verdünnungsstufe an IgY immer flacher wurde und letztendlich bei einer Verdünnung von 1:5.120 dem Kurvenverlauf einer

infizierten Kultur entsprach. Die Kontrollzellen zeigten ein Wachstumsverhalten, welches bei Proben mit einer Ak-Verdünnung von bis zu 1:80 zu sehen war. Proben mit einem hohen Ak-Gehalt zeigten einen geringeren CI als unbehandelte Zellen. Dieser Effekt verschwand mit zunehmender Verdünnung, wobei Zellen mit einer Verdünnung von 1:20 den höchsten CI nach 24 h p.I. aufwiesen; ein Effekt, der bis zum Ende der Messung nach ca. 40 h p.I. zu beobachten war.

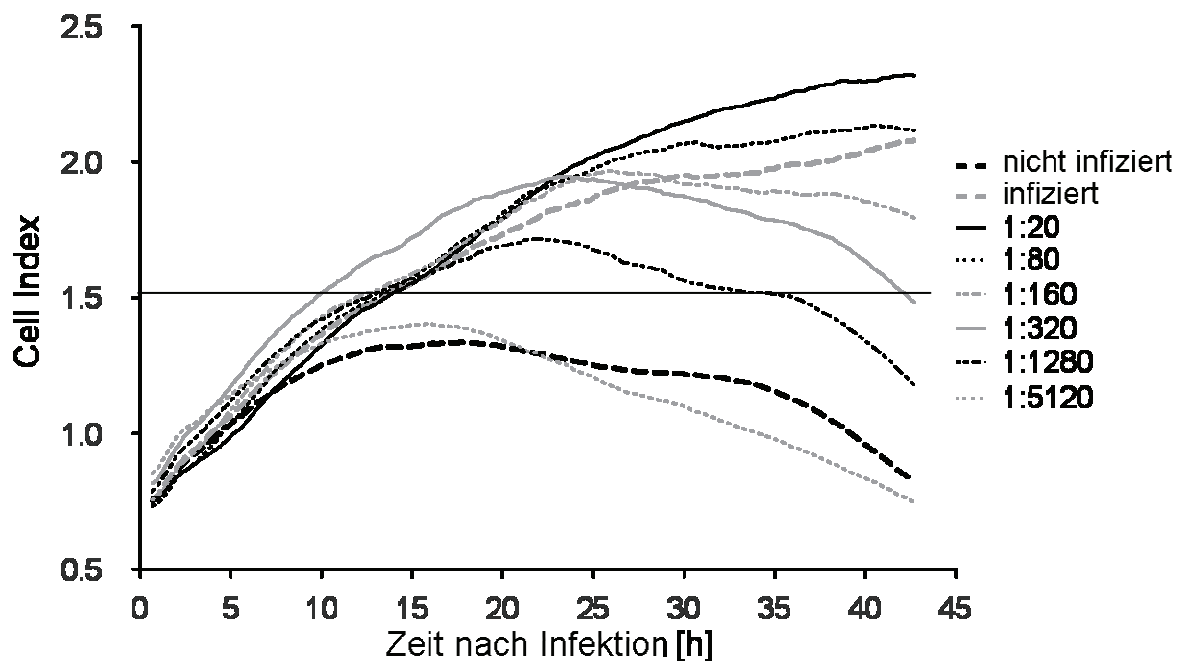


Abbildung 24: Verlauf eines qRTNT im xCELLigence System. Nach der Vorinkubation von VACV IHDW mit verschiedenen Verdünnungen des anti-Pocken-IgY wurden die Ansätze auf 5.000 HEK293 Zellen ausplattiert. CI in Abhängigkeit von der Zeit (aus Gründen der Übersichtlichkeit wird die Standardabweichung weggelassen, n=3). Die horizontale Linie verdeutlicht den NT₅₀ bei 50% der Differenz zwischen nicht infizierter und infizierter Kontrolle.

Die Darstellung im Whisker-Box-Diagramm in Abbildung 25 ermöglichte einen besseren Überblick über die generierten CI im gesamten Verlauf des Experiments nach der Infektion. Es war deutlich zu erkennen, dass ein hoher Gehalt (geringe Verdünnung) an IgY zunächst inhibitorisch auf die Zellen wirkte. Der Median verschob sich ab einer Verdünnung von 1:20 in den Bereich der unbehandelten Zellen und sackte weiter ab, wobei er bei einer hohen Verdünnung von 1:5120 annähernd den Wert der infizierten Zellen erreichte.

Nach einem Vergleich der Ergebnisse aus dem xCELLigence System mit den Daten aus klassischen NT-Tests wurde zunächst ein Auswertungsalgorithmus für den neuen Test entwickelt, der vergleichbare Ergebnisse liefert:

- 36-48 h nach der Infektion wurden die CI der nicht-infizierten (CI_{UT}) und der infizierten (CI_I) Kontrollen miteinander verglichen

- Der CI-Wert, der exakt zwischen CI_{UT} und CI_I lag, wurde berechnet, um die 50%ige Neutralisation zu beschreiben, wie es im klassischen NT der Fall ist

$$CI_{NT50} = \frac{1}{2}(CI_{UT} - CI_I) + CI_I \quad (1)$$

CI_{NT50} = Zellindex der zu 50% neutralisierenden Verdünnung

CI_{UT} = Zellindex der unbehandelten Zellen

CI_I = Zellindex der infizierten Zellen

- die Probe mit einem CI, der dem berechneten CI_{NT50} am nächsten lag ($CI_0 \leq CI_{NT50}$), besaß als Verdünnung den neutralisierenden Titer des getesteten Antikörpers

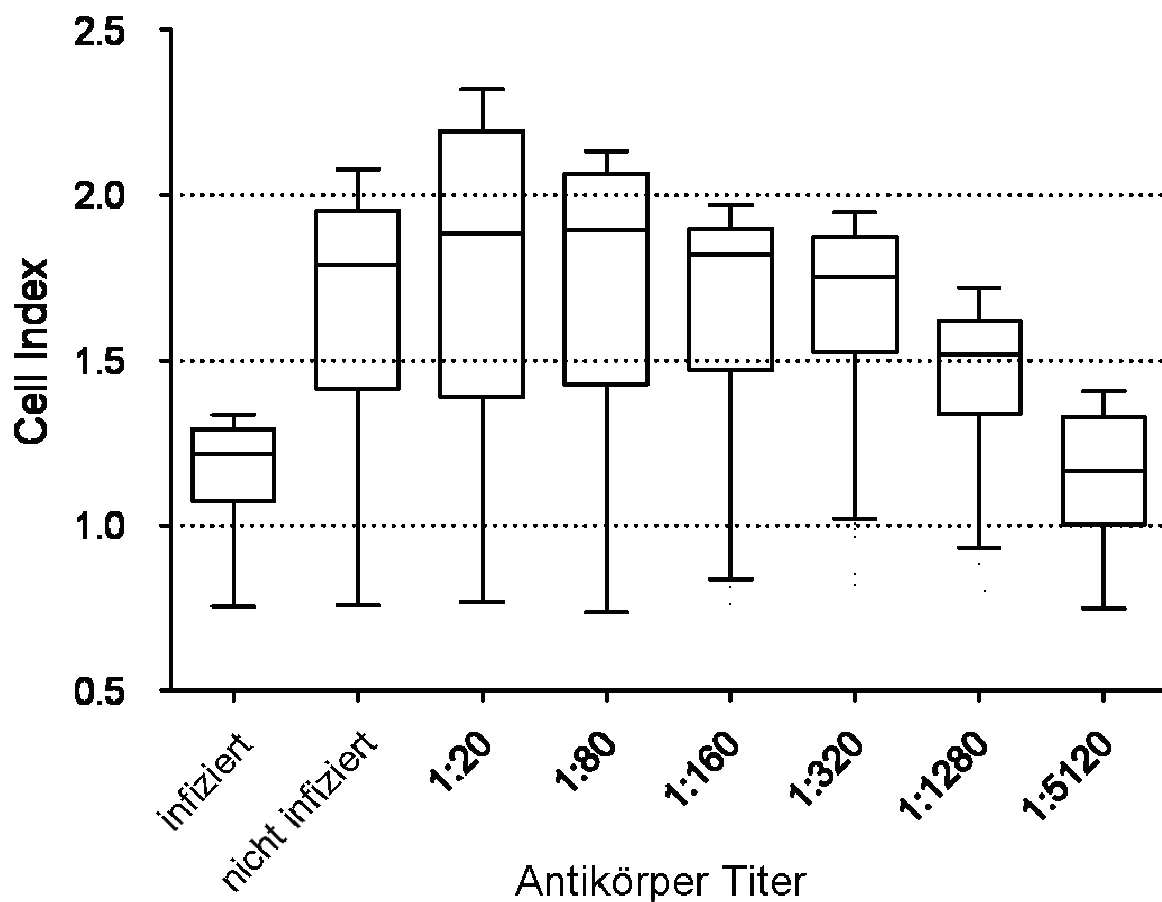


Abbildung 25: Verlauf eines qRTNT im Box-and-whisker Diagramm. Darstellung der Daten aus Abbildung 24 im Box-and-whisker Diagramm (Tukey Whisker). Die Kästchen stellen 95% der Daten über den gesamten zeitlichen Verlauf des Experiments dar. Die Linien in den Kästchen stehen für die Mediane und Balken zeigen die äußeren 5% der Meßpunkte an.

Diese Werte ermöglichten eine genaue Bestimmung des neutralisierenden Antikörpertiters (von nun an als quantitativer real-time neutralisierender Titer bei 50% Reduktion der Virusinfektion ($qRTNT_{50}$) bezeichnet), wobei zunächst der CI_{NT50} rechnerisch bestimmt werden musste, mit dessen Hilfe dann durch Ablesen oder Verwendung der

Geradengleichung der exakte $qRTNT_{50}$ ermittelt wurde (siehe Abbildung 26). Zunächst wurde die Geradengleichung der Steigung (2) mit Hilfe der Eulerschen Zahl transformiert:

$$CI = \text{Steigung} * \ln(Ak_Titer) + y - \text{Achsenabschnitt} \quad (2)$$

Nach der Transformation und dem Einsetzen von CI_{NT50} für CI und $qRTNT_{50}$ für den Ak Titer entstand Gleichung (3):

$$qRTNT_{50} = e^{\left(\frac{CI_{NT50} - y - \text{Achsenabschnitt}}{\text{Steigung}} \right)} \quad (3)$$

Die Berechnung von $qRTNT_{50}$ wird exemplarisch für anti-OPV-IgY in Gleichung (4) bis (5) gezeigt.

$$CI_{NT50(IgY)} = \frac{1}{2}(1,9991 - 1,0778) + 1,0778 = \underline{1,53} \quad (4)$$

$$qRTNT_{50(IgY)} = e^{\left(\frac{1,538 - 3,174}{-0,309} \right)} = \underline{199} \quad (5)$$

Der in der Formel abgelesene CI_{NT50} Wert gibt den Zellindex an, bei dem nach 36-48 h, innerhalb des jeweiligen Neutralisationstests, mittels der dazugehörigen Standardgeraden die zu 50% neutralisierende Virusverdünnung ermittelt werden kann.

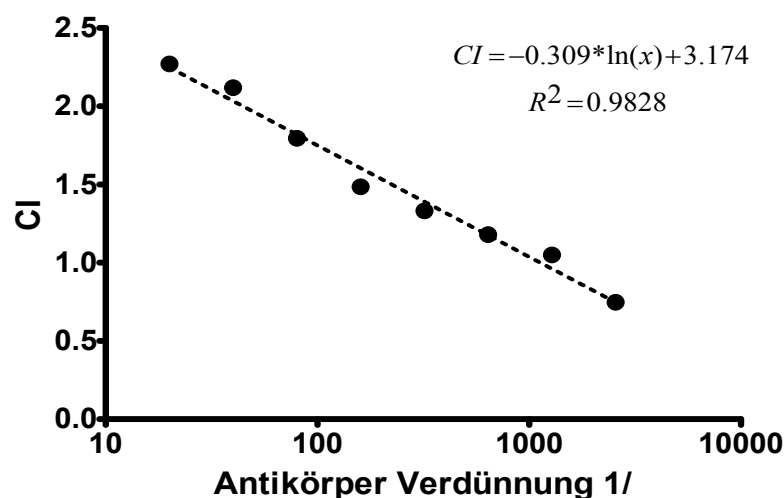


Abbildung 26: Standardgerade zur Bestimmung des exakten NT_{50} mit dem xCELLigence System. Der Zellindex CI ist in Abhängigkeit vom Ak-Titer aufgetragen. Der Datensatz entspricht dem aus Abbildung 24 und Abbildung 25. Die Abszisse ist im logarithmischen Maßstab dargestellt. In der oberen rechten Ecke sind die Geradengleichung und die Standardabweichung zu sehen.

Weitere Versuche wurden sowohl mit Seren von OPV-infizierten Ratten, Elefanten und Menschen durchgeführt, als auch mit IgY-Präparationen mit Ak gegen CrmA, F1L und P28. In Tabelle 14 ist eine Auflistung der genutzten Ak und Seren zu finden, sowie die Ergebnisse aus den Neutralisationstests, die mit der ermittelten Formel mit gemessenen Zellindizes nach 36h nach Infektion gemessen wurden. Weiterhin befinden sich in der letzten Spalte extrapolierte NT_{50} Werte (ab hier „ qNT_{50} “ für quantitativen NT_{50} genannt), die nach dem

Erstellen einer Standardgeraden für CI in Abhängigkeit von der Ak-Verdünnung abgelesen wurden (Abbildung 26).

Tabelle 14: Neutralisationstiter (NT₅₀) verschiedener, gegen OPV gerichteter, Antikörper nach Bestimmungsmethode sortiert.

Antikörper/Serum	NT₅₀ klassisch	RTNT₅₀	qRTNT₅₀
<i>Omrigam</i>	1:320	1:640	1:712
<i>humanes Patientenserum</i>	1:80	1:80	1:91
<i>Rattenserum</i>	1:160	1:160	1:178
<i>Elefantenserum</i>	1:80	1:40	1:48
<i>IgY gegen OPV</i>	1:320	1:160	1:199
<i>IgY gegen CrmA</i>	n. v.	n. v.	n. v.
<i>IgY gegen F1L</i>	n. v.	n. v.	n. v.
<i>IgY gegen P28</i>	n. v.	n. v.	n. v.

4.8 Apoptose Modulation durch Pockenvirale Proteine

In Vorarbeiten wurde durch Apoptose Induktion in OPV infizierten adhären Zellen (HEK293, HEp-2) gezeigt, dass eine pockenvirale Infektion den Anteil apoptotischer Zellen *in vitro* reduziert. Darauf basierend stellte sich die Frage nach dem Effekt auf einen apoptotischen Stimulus, der durch einzelne, transient exprimierte pockenvirale Apoptose Inhibitoren ausgelöst wird.

4.8.1 Apoptose Induktion in Zelllinien

In unterschiedlichen Zelllinien wurde durch ausgewählte Apoptose Induktoren gezielt Apoptose ausgelöst, um Bedingungen für eine Induktion zu charakterisieren. Später sollten ausgesuchte Stimuli verwendet werden, um in transfizierten Zellen Apoptose zu induzieren und die Wirkung von CrmA, F1L und P28 zu bestimmen. Es wurden auf Peptidbasis wirkende Fluorochrom markierte Kaspaseinhibitoren zur Darstellung der apoptotischen Zellen verwendet (2.5.3).

In Abbildung 27 ist der prozentuale Anteil apoptotischer, nekrotischer und spät-apoptotischer Zellen an der Population grafisch dargestellt. Lediglich die kombinierte Behandlung mit TNF- α und Cycloheximid führte zu einer starken Zunahme der relativen Anzahl apoptotischer Zellen auf 73 %. Verwendung von Cycloheximid allein bewirkte einen geringen Anstieg der Apoptoserate auf 12 %. Der Anteil apoptotischer Zellen bei Verwendung von TNF- α allein entspricht mit 7 % dem der unbehandelten Zellen. Die Anzahl nekrotischer Zellen ist sowohl bei unbehandelten, als auch bei behandelten Zellen gering (< 4 %). Induktion mit Cycloheximid, bzw. mit TNF- α und Cycloheximid bewirkt eine geringe Zunahme des Anteils

spät-apoptotischer Zellen auf 6 % bzw. 7 %. Bei Behandlung mit TNF- α allein ist der Anteil spät-apoptotischer Zellen mit 3 % geringer als bei den unbehandelten Zellen mit 5 %.

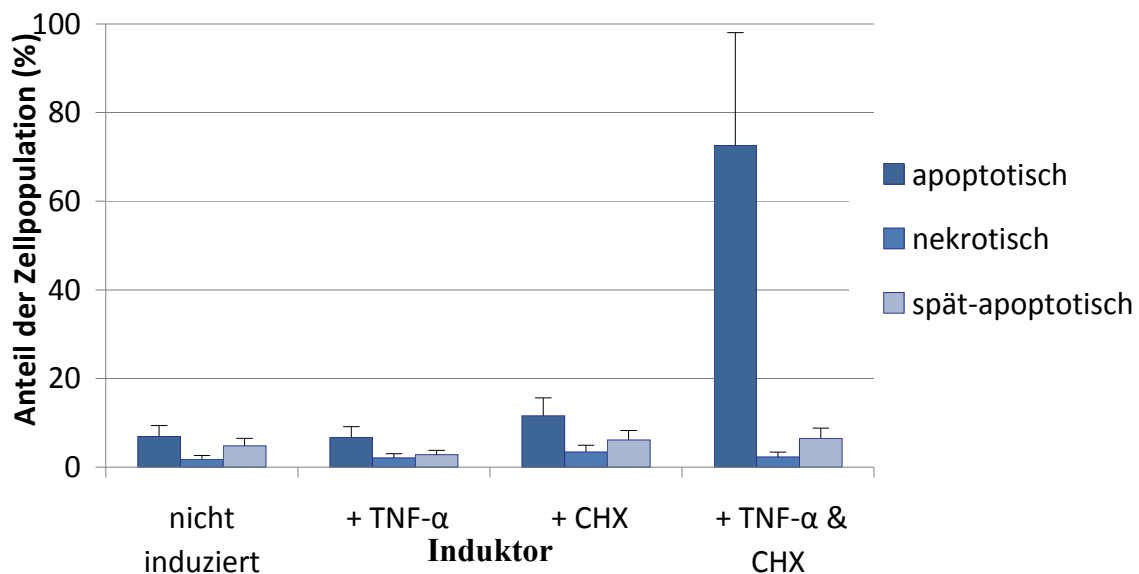


Abbildung 27: TNF induzierte Apoptose. Die Apoptoserate wurde nach 4h Induktion in HEK293 Zellen mittels FLICA Test am FACS bestimmt. (n=3, +SD)

4.8.2 Induktion von Apoptose mittels intrinsischer und extrinsischer Induktoren *in vitro* nach Transfektion mit pockenviralen Apoptose Inhibitoren

Zur Identifizierung eines Apoptose modulierenden Effekts der exprimierten OPV Proteine auf die mit TNF- α und Staurosporin induzierte Apoptose wurde die Apoptoserate unter den, das jeweilige Protein exprimierenden, Zellen bestimmt. Der Anteil apoptotischer Zellen an den, das jeweilige Fusionsprotein exprimierenden Zellen ist in Abbildung 28 grafisch dargestellt.

Im Mittel lag der Anteil apoptotischer Zellen nach extrinsisch wirkender Induktion mit **TNF- α** bei den N-YFP-Rpo18 exprimierenden Zellen bei 51% im Vergleich zu 9% in der nicht induzierten Kultur. Das sehr gut charakterisierte CrmA, das in diesen Versuchen die Funktion einer Positivkontrolle hatte erreichte eine Apoptoserate von 34% im Vergleich zu 15% bei nicht induzierten Zellen. Bei den N-YFP-P28 exprimierenden Zellen betrug der Anteil apoptotischer Zellen 29 - 45%. Unter den anderen OPV Protein exprimierenden Zellen waren nach der Induktion 18 – 34% apoptotisch. Bei der Expression der OPV Proteine mit N-terminaler YFP-Fusion wurden nach der Induktion durch TNF- α im Vergleich niedrigere Aapoptoseraten gemessen als beim Kontrollplasmid mit Rpo18 Homolog. Dabei war zwischen induzierten und nicht induzierten transfizierten Zellen ein Unterschied von fast 50 Prozentpunkten festzustellen. Den höchsten protektiven Effekt erzielte im Vergleich das

CPXV F1L, welches einen Anstieg von 3 Prozentpunkten bei den apoptotischen Zellen erlaubte.

Eine intrinsisch wirkende Induktion mit **Staurosporin** führte zu einer Apoptoserate in transfizierten Zellen von 71% in Kontrollzellen (Rpo18 Transfektion) und einem Anteil von 42% in CrmA transfizierten Zellen. Der Anteil in F1L exprimierenden Zellen war ebenfalls höher im Vergleich zur TNF Induktion (35% bei CPXV und 41% bei VACV). Auffällig war die durch P28 Expression verringerte Apoptoserate von 20% bei P28 WR und 24% bei P28 CPXV – wogegen das trunkierte P28 Homolog des VACV LE einen Anteil von 45% zuließ.

Ohne Apoptose Induktion wurde bei allen Proben eine Apoptoserate von durchschnittlich 10% für Rpo18 und P28 gemessen. Die F1L exprimierenden Zellen lagen hierbei zwischen 14% und 19%.

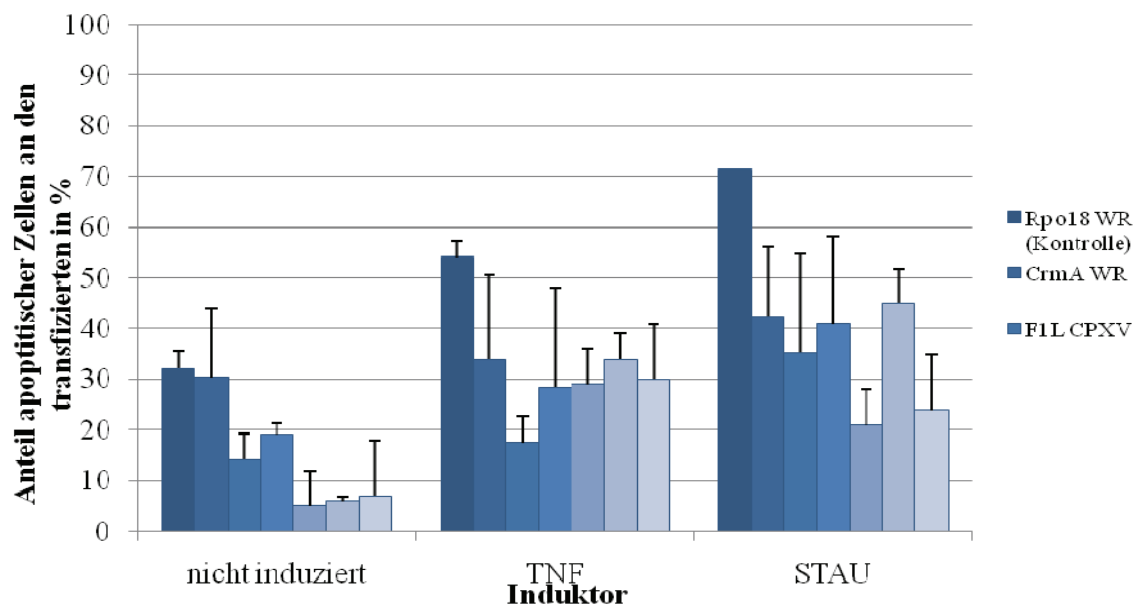


Abbildung 28: Apoptose Induktion in transfizierten Zellen. HEK293 Zellen wurden nach Transfektion mit Apoptose Inhibitoren mit TNF- α (4 h) und Staurosporin (6 h) behandelt. Die Apoptoserate wurde im FLICA Test bestimmt. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen an den transfizierten ist für jede Art der Induktion angegeben.

5 Diskussion

5.1 Apoptose Modulation durch OPV

OPV nutzen eine Menge unterschiedlicher immunmodulatorischer Mechanismen, wodurch sie für jeden Wirt eine Herausforderung darstellen. Eine der viralen Strategien die Wirtsabwehr zu umgehen, ist die Möglichkeit Apoptose zu inhibieren oder zumindest zu verlangsamen, die in infizierten Zellen zu einem antiviralen Status führen soll.

Nach erfolgreicher Infektion einer Zelle werden virale Antigene an der Zelloberfläche durch MHC I Moleküle präsentiert und durch zytotoxische T Lymphozyten (CTL) detektiert. CTL beginnen mit dem Abbau der Zelle durch Interaktion mit dem Fas-Rezeptor und der Sezernierung von Granzym B (Edwards, Davis et al., 1999). OPV haben für diesen Fall Tarnmechanismen entwickelt, die die Expression von MHC-Molekülen bewirken (Nash, Barrett et al., 1999; Everett & McFadden, 2002). Außerdem sind Zytokine, wie Interferon (IFN) und der Tumor Nekrose Factor (TNF) weitere Effektor Moleküle, die einen antiviralen Status in einer infizierten Zelle in Form des programmierten Zelltods auslösen (Benedict & Ware, 2001; Barber, 2001). OPV exprimieren sogenannte „Köder“ Moleküle, die Effektor Proteine des Wirts durch Rezeptor Mimikry abfangen (Smith, Symons et al., 1998). Schließlich nutzen OPV Serpine (Serin Protease Inhibitoren), welche direkt die Aktivität von Kaspasen inhibieren (Alcami & Koszinowski, 2000; Moss & Shisler, 2001).

Apoptose Inhibition als Möglichkeit der Immunevasion von OPV wird durch eine Reihe wichtiger Proteine, wie CrmA, F1L und P28, vermittelt. Neben dem erst kürzlich entdeckten v-GAAP (Gubser, Bergamaschi et al., 2007) sind diese als Virulenzfaktoren mit nur zum Teil aufgeklärten Wirkungsmechanismen bekannt.

Der *Cowpox virus Cytokine response modifier A* (CrmA), ist als ein Inhibitor von Granzym B und Kaspase-1 bekannt, und wurde als Protein beschrieben, welches vor Fas-induzierter Apoptose schützt (Komiya, Ray et al., 1994a; Tewari, Telford et al., 1995; Smith, Strasser et al., 1996b; Dbaiho & Hannun, 1998). Es ist ein Beispiel für einen Inhibitor des extrinsischen apoptotischen Signalweges.

F1L, welches ursprünglich in VACV gefunden wurde, interagiert mit dem mitochondrialen (intrinsischen) Teil der Apoptose Kaskaden aufgrund seiner Zielsequenz für mitochondriale Membranen am C-Terminus des Gens. Es unterbindet die Destabilisierung der Membran und so die Freisetzung des Zytochrom C und die Bildung des Apoptosoms (Stewart, Wasilenko et al., 2005; Wasilenko, Banadyga et al., 2005; Postigo, Cross et al., 2006; Taylor, Quilty et al., 2006).

Das 28 kDa Protein P28 des ECTV ist das am wenigsten untersuchte Genprodukt aus der oben genannten Liste der Apoptose Modulatoren. Soweit bekannt, interagiert es aufwärts von Caspase-3 mit der Apoptose Kaskade, wo es vor UV-induziertem Zelltod schützt. Es besitzt eine C-terminale Zink bindende RING-finger Domäne und zudem eine E3 Ubiquitin Ligase Aktivität (Brick, Burke et al., 2000; Huang, Huang et al., 2004; Nerenberg, Taylor et al., 2005). Zudem wurde es als wichtiger Virulenzfaktor in Mäusen bestätigt (Senkevich, Koonin et al., 1994).

Selbst wenn Apoptose Modulation durch diese Proteine bekannt oder zumindest angenommen wird, ist wenig über ihre Auswirkungen auf die Virusreplikation unter diversen Bedingungen bekannt.

5.2 Expression der Apoptose Modulatoren

5.2.1 Generierung OPV spezifischer real-time PCR und Messung der Expression von Apoptose Modulatoren

Aus der Literatur ist bekannt, dass OPV verschiedene Arten von Promotoren verwenden, um die Expression spezialisierter Proteine je nach Stadium des Replikationsstatus zu aktivieren (Broyles, 2003). So sind sogenannte frühe Promotoren für die Expression der Proteine für DNA Replikation, Nukleotid Biosynthese und intermediäre Gentranskription zuständig (Hruby & Ball, 1982; Sanz & Moss, 1999). Intermediäre und späte Promotoren steuern die Aktivität von Genen für die Virion Morphogenese und Assemblierung (Rosel & Moss, 1985). Die cDNA von früh exprimierten Genen ist zum Teil schon wenige Minuten nach der Infektion in einer Zelle nachweisbar (Kates & McAuslan, 1967). Es wird eine *in vivo* Expression nach einer Infektion innerhalb der Virus *Cores* postuliert (Kates & Beeson, 1970), wobei eine RNA Polymerase Aktivität in Virionen nachgewiesen werden konnte (Munyon, Paoletti et al., 1967) und außerdem gezeigt wurde, dass virale DNA das *Core* während der Infektion nicht verlässt (Mallardo, Leithe et al., 2002).

Durch den Einsatz von real-time PCR sind quantitative Aussagen über Genexpression möglich (Bustin, 2004; Arya, Shergill et al., 2005). Die in dieser Arbeit generierten PCR-Nachweismethoden erlaubten eine sehr schnelle Einschätzung der Genaktivität der untersuchten Immunmodulatoren. Alle drei Proteine wurden bereits wenige Minuten nach einer Infektion auf mRNA-Ebene in hohem Maße exprimiert. Diese Tatsache erlaubt die eindeutige Eingruppierung der drei Gene als sogenannte „early“ Gene, die von dem ersten der hintereinander geschalteten OPV-Promotoren reguliert werden (Broyles, 2003). Der frühe Anstieg des mRNA Gehaltes verdeutlicht die Wichtigkeit der untersuchten Proteine im

Bereich der Immunmodulation, wenn auch durch die Messung der mRNA Menge keine eindeutige Aussage über die tatsächliche Proteinexpression und Funktionalität in infizierten Zellen gemacht werden kann (Alberts, Johnson et al., 2002).

Da durch den hohen Gehalt an spezifischer mRNA die Voraussetzung für eine frühe und starke Expression gegeben ist, stellt sich die Frage nach der Expression auf Proteinebene, die nur durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden kann.

5.2.2 Existenz viraler mRNA in Viruspartikeln

Aufgrund der Tatsache, dass virale mRNA früh detektierbar ist, stellt sich im Fall der OPV zunächst die Frage nach der Existenz von viraler mRNA im *Core* bereits vor der Infektion und ob sie unter Umständen die früh exprimierten Apoptose Modulatoren kodiert. Nach der Aufreinigung von OPV Virionen aus Zellkulturmaterial und einer mRNA-spezifischen cDNA Synthese, konnte in der qPCR gezeigt werden, dass mRNA für alle drei untersuchten OPV Proteine in Virionen vorhanden ist. Sowohl CPXV als auch VACV enthielten spezifische cDNA, während in nur zwei Fällen Kontrollansätze ohne reverse Transkriptase bei C_T zwischen 37 und 41 positive Signale erbrachten. Im Vergleich zu den Proben mit reverser Transkriptase hatten die Kontrollen im Durchschnitt 15,7 Zyklen Abstand zueinander, was zu einem mengenmäßigen Unterschied von ca. $5,7 \times 10^5$ fachen an Ausgangskopien führt. Somit ist das positive Signal wahrscheinlich auf eine unvollständige Verdau der Virion-DNA durch die zuvor eingesetzte DNase zurückzuführen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass OPV-Partikel mRNA für CrmA, F1L und P28 enthalten und diese direkt in die infizierte Zelle entlassen. Dies erspart den wichtigen Immunmodulatoren die Prozessierung durch virale *Capping* Enzyme und ermöglicht deren schnelle Expression. Die Tatsache, dass von Kates und Beeson eine *in vivo* Expression in Virionen postuliert wurde, könnte bedeuten, dass die mRNA in diesem Fall aus aktiven Virionen in infizierten Zellen extrahiert wurde. Da alle untersuchten Virionen zuvor durch eine Ultrazentrifugation aufgereinigt wurden ist dies jedoch sehr unwahrscheinlich.

5.2.3 Bedeutung von mRNA früher Gene für die OPV Infektion

In Anbetracht der Tatsache, dass die untersuchten viralen Proteine in so kurzer Zeit nach der Infektion exprimiert werden, wird ihre Bedeutung für den Replikationszyklus *in vivo* deutlich. Innerhalb der ersten 30 min p.I. werden 61 Gene von VACV transkribiert, nach 1h 32 weitere und nach 24h 192 Gene insgesamt (93%) (Assarsson, Greenbaum et al., 2008). CrmA, F1L und P28 gehören somit zu den ersten 30 von ca. 200 Genen. Wie die Daten zeigen, werden alle drei Gene auch im weiteren Verlauf der Infektion auf einem hohen Niveau exprimiert.

OPV weisen eine sehr hohe Bandbreite an Virus-Wirt-Interaktionen auf. So sind zum Beispiel VACV und CPXV häufig in der Lage viele unterschiedliche Organismen zu infizieren, während ECTV und CMLV sehr konservativ nur in Mäusen, bzw. Kamelen replizieren. Aufgrund dieser Unterschiede sind zumindest für die vom Wirtsbereich her stark eingeschränkten Viren Immunmodulatoren von großer Bedeutung, während sie in weniger „konservativen“ Viren wahrscheinlich einen redundanten Charakter besitzen.

Die Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass Wirtsbereichsfaktoren in der Zellkultur von Zelllinien und pCEF keine besonders große Bedeutung haben. Unterstützt wird diese Aussage durch den Einsatz verschiedener Viren, wobei keine Unterschiede zwischen OPV mit engem (CMLV) und breitem (VACV, CPXV) Wirtsbereich gezeigt werden konnten.

5.2.4 Nachweis pockenviraler Immun-Modulatoren auf Proteinebene

Zum Nachweis der auf Transkriptebene bereits gezeigten Expression der Immunmodulatoren auf Proteinebene wurden in dieser Arbeit spezifische IgY generiert und charakterisiert. Mittels dieser Ak wurden CrmA, F1L und P28 serologisch nachgewiesen.

5.2.4.1 Ballistische DNA Immunisierung von Hühnern zur schnellen Ak-Generierung

Die Forschung im Bereich der Proteine macht zumeist den Einsatz an Antikörpern notwendig, die nicht kommerziell erhältlich sind. Ak sind in medizinischer Diagnostik, Therapie und der Forschung unabdingbar (Carlander et al., 1999) und speziell Ak für neu entdeckte Proteine oder Targets müssen unter Umständen schnell zur Verfügung stehen.

Dabei wurden gezielt die Vorteile der IgY-Technologie und der DNA-Immunisierung erfolgreich vereint und auf tierfreundliche Art bei einer GeneGun Immunisierung verwendet - es war wichtig, die Methodik wenig invasiv zu gestalten.

Die Kombination aus GeneGun Einsatz und Ak Extraktion aus Eiern führte zu einer Stressreduktion der Versuchstiere, die durch die kurze Behandlungszeit noch weiter reduziert werden konnte. Ein anormales Verhalten oder Hinweise von Stress konnten bei den Tieren nicht beobachtet werden. Das Vakzin selbst hatte ebenfalls keinen negativen Einfluss auf das Tier und die Legekapazität.

Das Hauptziel dieses Projektes war es, gegen die nativen Formen der untersuchten Proteine zu immunisieren. Die Anwendung viraler DNA als Template und die direkte Transfektion in die Ak produzierenden Tiere führte zur Expression des nativen Proteins als immunogenes Molekül, wie durch den Nachweis der spezifischen IgY indirekt gezeigt.

Weiterhin war es möglich, durch den Einsatz von DNA als Vakzin eine aufwendige Proteinexpression und –Aufreinigung zu umgehen. Ein Vakzindesign auf der Basis von

Bioinformatik und die darauffolgenden Standardmethoden der Molekularbiologie, wie der PCR, Klonierung und DNA Extraktion führten bereits zu einem einsetzbaren Impfstoff.

Zudem ist der durchschnittliche Gehalt an IgY pro Ei von ca. 50 mg eine große Menge im Vergleich zu der Ausbeute nach einer Kaninchen- oder Mausimmunisierung (Jensenius et al., 1981; Kovacs-Nolan and Mine, 2004). Sogar nach dem Ausschluss aller Proben mit einem Ak-Titer $< 1:200$ wurden pro Huhn innerhalb von 70 Tagen 35 g anti-F1L-Ak und 28 g anti-CrmA-Ak gesammelt, für P28 waren es immer noch 10 g. Wenn von einer Spezifität von bis zu 10% des totalen IgY-Gehalts ausgegangen wird (Schade et al., 1991), so sind es immer noch bis zu 3,5 g; 2,8 g oder 1,0 g spezifischer Antikörper.

Die generierten Ak erkennen alle getesteten Proteinhomologe (außer des trunkierten P28 von VACV LE) als Folge einer Immunisierung mit konservierten Proteinuntereinheiten mit potentiell immunogenen Epitopen und sind somit wertvolle Werkzeuge für die weitere Forschung, da sie an native Proteine binden (Sakhatskyy et al., 2008).

Obwohl die DNA Vakzine eine Ak Bildung in den Hühnern induzieren konnten, war die Tatsache, dass anti-P28-Ak nur einen niedrigen Titer erreichten und anti-CrmA-Ak nur zu Beginn einen hohen Titer zeigten, nicht zufriedenstellend. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zu F1L relative niedrige Oberflächenwahrscheinlichkeit des gewählten Epitops sein. Die P28 RING-Domäne (C-terminal) schien für eine Immunisierung sinnvoller, ist jedoch in den trunkierten Varianten des Proteins, welches durch einige OPV exprimiert wird, nicht vorhanden und konnte aufgrund des gewünschten generischen Charakters der Ak nicht verwendet werden. Eine Ausdehnung der Untereinheit in 3'-Richtung hätte aufgrund der niedrigen Hydrophilität und des antigenen Index unterhalb von Aminosäure 100 wahrscheinlich keinen positiven Effekt gehabt. Die Implementierung eines früheren dritten Immunisierungsschrittes vor dem 60. Tag nach Erstapplikation hätte unter Umständen ein Absinken des Titers verhindert (Wang et al., 2008).

Für die Immunisierung wurden stark konservierte Regionen der DNA Sequenzen verwendet. Eine Software basierte Analyse des Codon Gebrauchs in OPV im Vergleich zur galliformen Codon Tabelle zeigte, dass 10% der genutzten Codon Kombinationen nicht optimal für die Immunisierung waren (Daten nicht gezeigt). Die Nutzung von OPV Codons ist in Mäusen effektiver, da Nagetiere mögliche Wirte für die verwendeten OPV darstellen. Somit hätte eine Codon Optimierung bei Hühnern zu höheren Titern führen können (Garmory et al., 2003; Liu et al., 2001). Ein Nachteil der Codon Optimierung ist die Notwendigkeit einer Gensynthese als Zwischenschritt vor der Klonierung, an Stelle einer PCR.

Die Färbung von CrmA-, F1L- und P28-exprimierenden Zellen nach einer Transfektion zeigte eine Ko-Lokalisation von IgY und des YFP-Fusionsproteins, wobei das YFP Signal in der Regel stärker war. Die Präsenz einer starken YFP Fluoreszenz im Vergleich zu dem Ak vermittelten Signal kann auf die Art der Fusion (N-Terminal) zurückgeführt werden. Der Fluoreszenz-Tag wird als erstes exprimiert und auch bei einer unvollständigen Expression des Fusionsproteins kommt es zu einer Fluoreszenz im grünen Bereich.

Abschließend kann man sagen, dass hier eine gut reproduzierbare Methode für DNA Immunisierung verfügbar wurde, die ohne komplexe Vorarbeiten realisierbar ist. Dabei wurden zum ersten Mal Hühner mit einem DNA Vakzin via GeneGun zu Herstellung von Ak immunisiert. Einzig die Haltung von Hühnern benötigt spezielle Einrichtungen, die jedoch keiner besonderen Ausstattung bedürfen (Scharmann, 1996). Nicht gezeigte Ergebnisse zu Vorversuchen mit linearer DNA (PCR Produkten) haben gezeigt, dass eine Immunisierung damit möglich ist, jedoch zu sehr geringen Titern führt.

Eine Aufgabe, die verbleibt, ist die Klärung der bestmöglichen Immunisierungsstrategie bezüglich der Kombination von Hühnern als IgY Quelle und der Applikation der GeneGun. Die Fragen nach der Anzahl und Frequenz der Immunisierungen, als auch der optimalen DNA Menge und Art der Nukleinsäuren bleiben von der Fachliteratur unbeantwortet und müssen geklärt werden.

5.2.4.2 Expression und Lokalisation der Proteine CrmA, P28 und F1L

Der Nachweis der viralen Proteine erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung und deren Auswertung im konfokalen Laserscanning Mikroskop. Zunächst wurden Plasmidkonstrukte zur heterologen Expression der einzelnen Proteine in nicht infizierten Zellen verwendet, wo ein fusioniertes YFP bereits ohne eine spezifische Färbung Aussagen über die Lokalisation im Virus-freien System erlaubte. Wie bereits in (4.7) beschrieben, war eine stärkere Fluoreszenz des YFP-Tags zu erkennen, was darauf zurückzuführen ist, dass das N-terminale Fusionsprotein als erstes exprimiert wurde. Die Lokalisation der heterolog exprimierten Modulatoren im Zytoplasma kann als verstärkt perinukleär bezeichnet werden, wobei CrmA und P28 im gesamten Plasmabereich zu finden waren, während F1L nur in Teilen zu erkennen war. Letzteres könnte aufgrund der mitochondrialen intra-Membran-Domäne verstärkt in Bereichen dieser Membranen akkumulieren.

In infizierten Zellen konnten die ausgesuchten OPV Proteine alle innerhalb der ersten 12 h p.I. spezifisch mittels IFT nachgewiesen werden. In diesem Zeitfenster war die Fluoreszenzintensität der Signale am stärksten. Die Tatsache, dass CrmA auf mRNA Ebene die höchsten Kopienzahlen besaß setzte sich auf Proteinebene fort, wo die Färbung des

Proteins die stärksten Signale aufwies. CrmA und P28 traten diffus verteilt im Zytoplasma als auch in den Virusfabriken auf, wobei CrmA 12 h p.I. nur in den Fabriken lokalisierte – P28 hingegen nicht. Die Lokalisation von F1L war mit der von P28 vergleichbar. Hier war jedoch keine verstärkte Akkumulierung um den Kern herum zu erkennen.

Zur Bestätigung der Spezifität der IgY für virale Proteine wurde (neben der Testung von Ko-Lokalisation von YFP-Tag und Ak-Färbung für transfizierte Zellen) in infizierten Kulturen zusätzlich mit einem polyklonalen Ak gegen OPV gefärbt. Die Daten aus dem IFT und der qPCR stimmen insofern überein, dass die höchsten Werte für die Expression auf mRNA und Proteinebene nach 12 h erreicht werden. Somit setzt sich die frühe Expression der Apoptose Modulatoren in ihrer Translation fort. Aussagen zu späteren Zeitpunkten der Infektion werden aufgrund der zunehmenden Asynchronität der Replikationszyklen innerhalb der Kultur immer mit ihrem Verlauf schwieriger.

5.2.4.3 Einsatz von IgY in Western Blot Analysen

Neben IFT wurden in dieser Arbeit auch WB-Analysen von Proteinlysaten infizierter Zellen durchgeführt. Der Nachweis von OPV Proteinen war in Vorversuchen mittels polyklonalen Ak aus verschiedenen Quellen erfolgreich. Allerdings zeigte sich, dass trotz variierender Methodik bezüglich auf Pufferung, Blockierung, Gelzusammensetzung, Membranbeschaffenheit und Nachweissystem keine Immunmodulatoren im WB infizierter oder transfizierter Zellen nachgewiesen werden konnten.

Da die Methodik des Nachweisverfahrens sehr intensiv moduliert wurde, ist davon auszugehen, dass die hier generierten IgY nur in der Lage sind native Formen der untersuchten Proteine zu erkennen. Durch den Denaturierungsprozess während der Probenaufbereitung sind unter Umständen Proteinmodifikationen, wie Glykosylierungen, verloren gegangen. Dennoch ist für IgY gegen komplett verabreichte, durch Hitze inaktivierte, OPV Partikel aus einer anderen Arbeit gezeigt worden, dass diese im WB einsetzbar sind (Zhang, Kurth et al., 2008). Möglicherweise lag in der dafür genutzten inaktivierten Pockensuspension eine Mischung aus denaturierten und teilweise nativen Proteinen vor, die IgY auch für WB anwendbar machte, während die hier genutzten IgY gegen *in vivo* exprimierte Proteindomänen generiert wurden.

5.3 Folgen des Knock outs von Immunmodulatoren

Wie bereits beschrieben sind vor allem OPV mit engem Wirtsspektrum vom Fehlen bestimmter Apoptose Modulatoren betroffen. So ist zum Beispiel von ECTV bekannt, dass es in seinem natürlichen Wirt Maus nach P28 Deletion stark attenuiert ist (Senkevich, Koonin et

al., 1994). Durch den Einsatz reverser Genetik sind nach dem Ausschalten einzelner Gene Studien zu deren Funktionsweise möglich.

5.3.1 Klassische *Knock out* Mutanten

Funktionelle Deletionsmutanten des Vacciniavirus werden häufig über homologe Rekombination des viralen Genoms mit einer Kasette konstruiert, welche in die infizierten Zellen eingebracht wird. Diese besteht aus einem Reportergen, welches von Nukleotidsequenzen flankiert wird, die dem zu deletierenden Gen homolog sind. Durch die homologe Rekombination wird das virale Gen durch die Kasette ersetzt. Deletionsmutanten werden anschließend durch Selektion auf das Reportergen identifiziert und isoliert.

Die Selektion auf Rekombinanten erfolgt in Abhängigkeit vom verwendeten Reportergen, z.B. auf Antibiotika Resistenz oder auf Fluorochrom Expression. Damit eine zufällige Integration des Reportergens in das Virusgenom ausgeschlossen werden kann, werden die gewonnenen rekombinanten Viren mittels spezifischer PCR-Analyse auf Genomebene untersucht. Im Anschluss erfolgt im Fall von Host-range Genen eine Charakterisierung der Wirtstropismus-Defekte konstruierter Vacciniavirus Mutanten in verschiedenen Umgebungen. Das beschriebene Vorgehen liefert vollwertige Deletionsmutanten, jedoch kann die Generierung in ungünstigen Fällen mehrere Monate bis Jahre dauern. Um kurzfristig die Einflüsse einer Reduktion der Expression von OPV Immunmodulatoren zu beurteilen, wurde auf die Erstellung von *Knock out* Mutanten verzichtet und die siRNA Technik verwendet.

5.3.2 Einsatz von siRNA für Gen *Knock down*

In dem dargelegten Zusammenhang ist die RNA Interferenz (RNAi) ein wertvolles Werkzeug, welches selektives Gen *Knock down* und so die Untersuchung der entsprechenden Funktion ermöglicht. RNAi umgeht die Notwendigkeit der direkten Mutagenese und der Produktion von *Knock out* Mutanten. In dieser Arbeit wurden kurze interferierende RNA (*short interfering RNA*; siRNA) genutzt, um die Expression von CrmA, F1L und P28 gezielt zu unterdrücken und so die Notwendigkeit der Proteine *in vitro* und ihren Einfluss auf die Virusreplikation zu testen. In der experimentellen Planung wurde klar zwischen Zelllinien und primären Zellen unterschieden, da regulatorische Mechanismen in immortalisierten Zellen oft dereguliert sind, was sie weniger anfällig für die virale Immunmodulation macht.

siRNA kann kurzfristig eingesetzt werden. Nach Software basiertem Design (siehe auch Abbildung 13, 4.5), der Klonierung und Transfektion können siRNA exprimierende Zellen je nach System durch Fluoreszenz oder eine Antibiotikaresistenz selektioniert werden. In diesem Fall handelte es sich um das siSTRIKE U6 hairpin cloning system des Anbieters Promega (für

Mechanismus siehe Abbildung 5), welches gegenüber synthetischer siRNA den Vorteil hat, dass es direkt *in situ* exprimiert wird (Fuchs, Welk et al., 2004). Dabei entstehen weitaus niedrigere Kosten, da die siRNA zunächst in Form von kleinen Nukleotiden (60bp) synthetisiert wird und nach einer Klonierung viele Varianten getestet werden können. Außerdem neigt synthetische siRNA dazu abgebaut zu werden und nach der Zugabe aufgrund des starken Konzentrationsanstiegs die RNAi Maschinerie der Zelle zu überladen. Synthetische siRNA hat jedoch den Vorteil, dass sie in großen Mengen verfügbar ist und nicht während des Experiments erst noch exprimiert werden muss.

Nach der Klonierung und der auf Transfektion basierenden Applikation wird die spezifische siRNA exprimiert und führt im Idealfall zur Degradation der Ziel-mRNA (Caplen & Mousses, 2003), wobei dsRNA von der RNase Dicer erkannt und in siRNA der Länge 21-23 Nukleotide geschnitten wird (Elbashir, Lendeckel et al., 2001; Bernstein, Denli et al., 2001; Agrawal, Dasaradhi et al., 2003; Hammond, 2005). Außerdem wird die entstehende siRNA in einen als RISC (RNA-induced silencing complex) bekannten RNAi Zielkomplex inkorporiert. Dieser Komplex zerstört mRNA Homologe durch enzymatische Spaltung in der Mitte der Zielsequenz (Elbashir, Lendeckel et al., 2001) und unterdrückt so die Expression.

Von RNAi erhofft man sich weitestgehend den Einsatz im Bereich antiviraler Therapie und gegen neoplastische, degenerative und metabolische Erkrankungen. Das größte Problem dabei stellt die effektive und spezifische Zuführung der siRNA dar. Obwohl virale Vektoren in dieser Hinsicht sehr effektiv sind, stören dabei auftretende Nebenwirkungen. Nackte DNA hingegen kann durch intramuskuläre Injektion oder in Hepatozyten durch hydrodynamische Injektion verabreicht werden (Zender & Kubicka, 2004). *In vivo* Tiermodelle sind bekannt, so zum Beispiel der Einsatz von RNAi zur Apoptose Inhibition in der Mäuseleber (Song, Lee et al., 2003) oder als anti-apoptotisches Adjuvanz für ein Tumorstark (Dharmapuri, Aurisicchio et al., 2009). Die örtliche Anwendbarkeit im anti-apoptotischen Kontext in Tiermodellen kann jedoch nicht mit dem Einsatz am Menschen verglichen werden. Ein Grund dafür ist die Notwendigkeit von großen Volumina, um entsprechende siRNA Mengen zu verabreichen. Außerdem ist die Halbwertszeit von siRNA im Körper nur gering und eine langfristige Gabe kann Nebeneffekte, wie Karzinogenese oder Autoimmunität (im Falle anti-apoptotischer RNAi) auslösen. Zurzeit wird innerhalb der Arbeitsgruppe an einer Lösung gearbeitet, den Transport der siRNA an ihren Wirkungsort durch eine Kopplung an spezifische Aptamere zu verbessern.

5.3.3 Einfluss der Sequenz auf die Interferenzwirksamkeit

Die *Knock down* Raten der genutzten siRNA waren sehr unterschiedlich und lagen zwischen recht niedrigen 7% und 91% der relativen Expression verglichen mit Scrambled Kontrollen. Da das Design in erster Linie auf Sequenzen von VACV LE abgestimmt war, wurden hier im Vergleich optimale Ergebnisse erreicht.

Anti-Crma-3 war die effektivste siRNA in VACV LE (85% rel. Inhibition). Eine Sequenzanalyse zeigte, dass an Position 4 eine Fehlbase zu VACV WR auftrat (4.5). Der inhibitorische Effekt bei VACV WR betrug nur noch 30%. Anti-FIL-2 erreichte die für dieses Gen niedrigste Expressionsreduktion und wurde wiederholt auf Fehlbasen in der Region hin untersucht. An Position 17 wurde eine Fehlbase in der Homologie zu VACV LE/WR gefunden, die zunächst in der Sequenzierung mit einfacher Coverage unentdeckt blieb. Anti-P28-1 zeigte die niedrigste Interferenz Effektivität für P28, obwohl die Sequenz zu 100% übereinstimmte. Anti-P28-2 hatte für dieses Gen den höchsten inhibitorischen Effekt von 55%. Da VACV LE P28 ein trunkiertes Homolog von P28 ist, besitzt es innerhalb der DNA-Sequenz ein zusätzliches, frühes STOP-Codon an Position 133 (unveröffentlichte Daten). Da anti-P28-2/3 an den Positionen 212 und 118 von P28 binden ist der Interferenzort relativ gesehen näher am Transkriptionsstart als der von Anti-P28 -1 (Position 352). VACV WR-P28 besitzt eine höhere Homologie zum ECTV-P28 Gen und eine Trunkierung an Position 554. Wie in multiplexen Transfektionsansätzen und FACSorting – Experimenten gezeigt, war der Einfluss auf P28 Expression in VACV WR Infektionen höher.

Die Einflüsse von Sequenzunterschieden können durch die von Hamada und Amarzguioui gezeigten Daten erklärt werden (Hamada, Ohtsuka et al., 2002; Amarzguioui, Holen et al., 2003). So wirken sich Sequenzdiskrepanzen innerhalb der ersten Nukleotide am 5'-Ende der siRNA nicht so negativ aus, wie Fehlbasen am 3'-Ende, die die Effektivität der siRNA deutlich reduzieren. Dieser Effekt entsteht durch die Existenz einer „ruler“ Region, die durch den RISC-Komplex zur Sequenzerkennung genutzt wird (Elbashir, Martinez et al., 2001). Diese Theorie bestätigt die Ergebnisse im Fall von anti-Crma-3, wobei ein Sequenzunterschied an Position 4 nicht zu einem kompletten Verlust der Funktion der siRNA führt. Es wird klar, dass der Mechanismus der RNAi, wenn auch verstanden, keine exakten Voraussagen über die Effektivität von entworfenen siRNA erlaubt.

Interessanterweise war der Effekt von siRNA, die in multiplexen Ansätzen eingesetzt wurde, immer geringer, als der im Einzelansatz. In der Literatur wird in einigen Fällen die Effektivität von Multiplex-siRNA als in geringem Maße effektiver dargestellt (Dave, McGettigan et al., 2006). Es wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass eine Kombination

von siRNA, die für ein Gen spezifisch sind, nicht so effektiv sein kann, wie die beste siRNA einzeln eingesetzt, solange es sich um einen transfektionsbasierten siRNA Einsatz handelt. Die Tatsache, dass jede Zelle mit allen Plasmiden transfiziert werden muss, was statistisch unwahrscheinlich ist – führt zu einer Art kompetitivem Verhalten der einzelnen siRNA. Sobald in einer Zelle unterschiedliche Kombinationen an Plasmiden vorliegen, ist die Effektivität der Inhibition schwer vorherzusagen. Einen Ausweg könnte eine Expressionskassette liefern, die die Expression aller möglichen siRNA von einem Plasmid erlaubt. Somit ist für den Einsatz von siRNA durch Transfektion ein optimales Plasmid einer Kombination vorzuziehen.

Ein Nachteil des Einsatzes von siRNA durch Transfektion ist die Abhängigkeit von der Güte der Transfektion selbst. In jedem durchgeführten Experiment wurde zu Beginn die Transfektionseffizienz überprüft, wobei nur Experimente mit einer Transfektionsrate von > 40% weitergeführt wurden. Während der Datenauswertung wurden die Ergebnisse auf die gesamte Zellpopulation bezogen, so dass der putative Effekt der Interferenz durchaus als höher einzuschätzen ist (im Fall einer 50% Transfektionseffizienz als doppelt so hoch), als in den Ergebnissen gezeigt. Im Fall der HEK293 Zellen sind diese Annahmen unkompliziert, jedoch nicht im Fall der pCEF, wo die Transfektionseffizienz bei 10-15% lag. Diese Tatsache ermöglicht zumindest die Annahme, dass die für pCEF angenommene RNAi Effektivität weitaus höher liegt, als durch die Relation zu c-myc gezeigt wurde. Durch Berücksichtigung des siRNA Effektes um den Faktor 5-10 könnte der Effekt bei einer höheren Transfektionsrate geschätzt werden, wobei eine Überprüfung nur durch erhöhte Transfektionseffizienz oder Anreicherungstechniken erreicht werden kann. Die schlechte Transfizierbarkeit, als auch die sehr niedrige Überlebensrate der pCEF nach einer FACS Sortierung, erlaubte jedoch keine weiteren Aussagen. Zusammenfassend kann also von einem stärkeren Effekt in primären Zellen ausgegangen werden, wobei zunächst die Transfektionseffizienz verbessert werden muss. Die Annahme wird von Fluoreszenz Aufnahmen bestätigt, in denen siRNA transfizierte Zellen schwächer durch polyklonale anti-VACV-Ak markiert wurden, als Kontrollzellen.

5.3.4 Pockenvirale Apoptose Modulatoren als Virulenzfaktoren in der Zellkultur

Nachdem in der Zellkultur die Expression aller drei Gene für VACV LE um mindestens 50% herunter reguliert werden konnte, stellte sich als nächstes die Frage nach einer möglichen Auswirkung auf die Virusreplikation in transfizierten Zellen. Bei den verwendeten HEK293 Zellen handelt es sich um immortalisierte Embryonierzellen, die mit dem 5'- Ende des

Adenovirus 5 (Ad5) Genoms transformiert wurden (Shaw, Morse et al., 2002). Die inserierte Sequenz kodiert die Proteine E1A und E1B, wobei E1A ein adenoviraler Transkriptionsfaktor und E1B ein Apoptose Inhibitor ist (Homolog von Bcl-2) (Kim, Kim et al., 2007). E1A ist außerdem dafür bekannt, dass es die Transkription zellulärer Gene, wie hsp70 aktivieren kann (Modrow, Falke et al., 2003). Da HEK293 Zellen also zum Teil ausgeschaltete Regulationsmechanismen besitzen, ist es möglich, dass sie auf eine OPV Infektion empfänglicher reagieren, wobei pockenvirale Immunmodulatoren überflüssig werden. OPV wie VACV oder CPXV weisen einen breiten Wirtsbereich auf und ein hohes zoonotisches Potential *in vivo*, und erfahren damit eine hohe Permissivität in Tumorzelllinien (McFadden, 2005). Aus diesen Gründen war ein starker Einfluss auf die virale Replikation in HEK293 Zellen nach RNAi nicht zwingend erwartet worden. Aus den erhaltenen Daten geht hervor, dass der relative Virustiter nicht unter 80% gefallen ist (4.3). Dieser Effekt ist bei weitem nicht so hoch, wie die durch die Inhibition von wichtigen Strukturproteinen oder Polymerasen erreichten Werte, die bis zu 1% relativer Viruslast im Fall des Chikungunya Virus reichen (Jun, Nam et al., 2008; Rothe, Werk et al., 2008; Dash, Tiwari et al., 2008).

Aufgrund der niedrigen Transfektionsraten in pCEF ist die Einschätzung des inhibitorischen Effekts auf die Virusreplikation schwierig. Es wird angenommen dass Primärzellen im Vergleich zu Zelllinien keine defekten Regulationsmechanismen besitzen - so können sie OPV Infektionen eher mit apoptotischen Kaskaden entgegenwirken. Unbekannt ist jedoch, in wie fern pCEF unter Umständen andere Regulationswege fehlen. Somit wurde ein Effekt auf die Virusreplikation durchaus erwartet, bevor sich die Transfektionseffizienz als problematisch erwiesen hat. Der siRNA Einsatz zeigte eine relative Titerreduktion von maximal 20% in VACV infizierten Zellen.

Als eine Methode zum Umgehen der Notwendigkeit der Herstellung von *Knock out* Mutanten hat sich die siRNA Technik teilweise bewährt. Die siRNA Technik war in der Zellkultur (hohe Transfektionsraten vorausgesetzt) schnell und effektiv. Im besten Fall konnte die relative Expression bis auf 7% heruntergesetzt werden. Aus der Literatur ist bekannt, dass die meisten Schwierigkeiten der RNAi Technologie im Bereich der Applikation liegen, vor allem bei Anwendungen an Versuchstieren (Bernstein, Denli et al., 2001; Juliano, Alam et al., 2008). Die Anwendung auf primäre Zellen könnte den Bedarf an Versuchstieren reduzieren, solange die Aufreinigung transfizierter Zellen optimal funktioniert. Hier könnte eine magnetische Sortierung oder eine Selektion durch Antibiotika in Frage kommen.

Nach dem *Knock down* der Apoptose Modulatoren auf Transkript-Ebene stellt sich die Frage nach einer möglichen Inhibition auf Proteinebene. Regulationsmechanismen können dem

RNAi Effekt entgegenwirken, bzw. der effektive Transport der siRNA an ihren Wirkungsort kann, wie bereits erwähnt, eine Schwachstelle darstellen. Durch den Einsatz von spezifischen Ak, die gegen OPV Proteine gerichtet sind, könnte unter Umständen durch eine neutralisierende Wirkung ein antiviraler Effekt auftreten. Dies wurde für die im Huhn generierten IgY in einem neu etablierten, auf Impedanzmessung basierenden, System getestet.

5.3.5 Neutralisierende Eigenschaften von IgY

Von IgY ist bekannt, dass ihre Affinität gegenüber Antigenen und auch ihre neutralisierenden Eigenschaften im Vergleich zu Säuger IgG schwächer sind (Davison, Kaspers et al., 2008). Es stellte sich somit die Frage in wie fern IgY im Vergleich zu Seren von infizierten Probanden oder Tieren neutralisierende Eigenschaften besitzen und ob die Spezifität gegenüber immunmodulatorischen Proteinen sich neutralisierend auf OPV auswirken kann. Von der Zusammensetzung eines humanen polyklonalen Serums gegen OPV ist bekannt, dass dort Ak gegen Oberflächenproteine (vor allem die reifer Virionen) dominieren (Benhnia, McCausland et al., 2008). Ak gegen A33 und A27 werden in 93 – 100% Fällen nach einer VACV Impfung in Menschen gefunden, weiterhin finden sich noch Ak gegen L1 und B5 (Lawrence, Lottenbach et al., 2007). Diese Immunglobuline wirken größtenteils neutralisierend, und es stellte sich die Frage, in wie fern IgY gegen Immun-Modulatoren neutralisierend wirken können, da es sich nicht um Strukturproteine handelt.

Die Ergebnisse aus den NT haben gezeigt, dass IgY gegen Gesamtvirionen durchaus neutralisierend wirken und der NT₅₀ den Seren aus Säugern ähnelt. Außerdem wurde deutlich, dass IgY-Ak gegen immunmodulatorische Proteine *in vitro* keine neutralisierenden Eigenschaften gegenüber OPV-Partikeln haben. Diese Ergebnisse ergänzen und unterstützen die Aussagen der RNAi Versuche, die gezeigt haben, dass auch der *Knock down* dieser Proteine keine Auswirkungen auf die Virusreplikation in der Zellkultur hat.

5.4 Etablierung des xCELLigence Systems für virologische Fragestellungen

5.4.1 Anwendbarkeit des Systems

Die Vorteile von RT-CES in der Zellkultur wurden in technischen Publikationen oft dargestellt. Die Haupt-Einsatzgebiete sind die Überwachung von Wachstum und die Qualitätskontrolle in der Zellkultur (Atienza, Zhu et al., 2005; Kirstein, Atienza et al., 2006; Huang, Xie et al., 2008), Zytotoxizitätstests (Xiao, Lachance et al., 2002; Boyd, Huang et al., 2008), Aktivierung von Zellen des Immunsystems (Abassi, Jackson et al., 2004) und auch Zellmigration (Giaever & Keese, 1991).

In dieser Arbeit wurde das RT-CES für Applikationen in der Virologie evaluiert. Da der CI Informationen über Zellgröße, -Anzahl und –Adhäsionsstärke liefert, war anzunehmen, dass das Verfolgen eines viral induzierten CPE möglich ist. Die in dieser Arbeit verwendeten OPV induzieren nach Infektion eine Plaquebildung und sind in der Lage schweren Schaden in der Zellkultur zu verursachen (Brown, Mayyasi et al., 1959; Bernkopf, Nishimi et al., 1959; Appleyard, Zwartouw et al., 1964).

Da das Zellwachstum in den durch RT-CES genutzten E-Plates Unterschiede zu klassischen 96er Kulturplatten aufweisen könnte, war es notwendig für jede neu verwendete Zelllinie Wachstumskurven zu erstellen. Nach anfänglicher Charakterisierung und Titration konnte das System (technisch gesehen) ohne weitere Modifikationen für virologische Arbeiten genutzt werden.

Nach einer OPV Infektion konnte eine MOI-abhängige Abnahme der Impedanz gemessen werden, wodurch eine erstmalige Anwendbarkeit für eine Virustitration gezeigt werden konnte. Interessanterweise hatte die nicht-infizierten Kultur ihr CI Maximum nach ca. 50 h p.I., genauso wie mit einer MOI von 0,1 infizierte Zellen. Allerdings war die Amplitude dieses Maximums in der infizierten Kultur um ca. 0,5 CI niedriger. Es ist anzunehmen, dass der CI der nicht infizierten Kultur aufgrund von Mediumverbrauch und Metabolitinhibition abzunehmen begann. Die kontinuierliche Überwachung des Zellstatus in einem real-time System erlaubte weiterhin Einsichten in eventuelle Kurzzeiteffekte nach einer viralen Infektion, die durch Endpunkt-Messungen nicht sichtbar werden. Dies war ein entscheidender Vorteil des xCELLigence™ Systems als real-time Gerät.

Der PRNT, genauso wie der RTNT, nutzen Virustitration als Basisprinzip. Entstehende Plaques werden gezählt und die Reduktion der Plaqueanzahl aufgrund der Aktivität der neutralisierenden Ak wird bestimmt. Der Hauptvorteil von RT-CES für die NT Bestimmung war zunächst die Möglichkeit der Quantifizierung. Die neutralisierenden Titer konnten sehr exakt bestimmt werden und die Werte waren nicht auf die Verdünnungsstufen der Ansätze beschränkt, während bei einem klassischen NT durch die geringe Auflösung nur ein bestimmter, durch den Experimentator gewählter, Bereich angezeigt werden kann. Die hier etablierte Methodik erlaubt quantitative real-time NT, die den NT als quantitativen RTNT₅₀ oder „qRTNT₅₀“ beschreibt.

Weitere Vorteile von RT-CES für die Virologie sind die Geschwindigkeit der Durchführung (48 h inklusive Infektion im Vergleich zu 3-5 d beim PNRT), so wie die Möglichkeit der Automatisierung und Einsparungen der Arbeitslast, da das Gerät im Verlauf des Experiments keine weitere Aufmerksamkeit erfordert. Weiterhin sind die gute Messbarkeit von

Mehrfachproben und die Applikation des CI als Parameter Gründe für eine Reduzierung von möglichen Fehlerquellen und gestalten die Auswertung weniger subjektiv. Die Durchführung der Virus Neutralisation im 96er Format erlaubt eine Reduktion der Probengröße, da die Auswertung nicht mehr visuell erfolgt.

Anzumerken ist, dass in den Randbereichen der E-Plates in manchen Fällen die Verdunstung des Mediums sehr stark war und zur Verfälschung der Ergebnisse führte. Eine Anwendung von PBS im Inter-Kavitätenraum reduzierte diesen Effekt, sollte aber beim Berücksichtigen der Kosten einer E-Plate nicht außer Acht gelassen werden. Ein weiterer Nachteil ist die schlecht durchführbare Beobachtung der Zellen im Durchlichtmikroskop.

Es sollte ferner immer berücksichtigt werden, dass der CI durch die Zellzahl, die Morphologie und durch Adhärenz der Zellen beeinflusst wird und auf diese Weise bisher vernachlässigte Vorgänge, wie das Zugeben von Nährmedium, oder die kurzzeitige Veränderung der Umgebungstemperatur, bereits starke Auswirkungen auf die Ergebnisse haben könnten.

5.5 Extrinsischen Apoptose Stimuli in Modulator exprimierenden Zellen

5.5.1 Heterologe Expression der YFP-Konstrukte in eukaryontischen Zellen

Alle bisherigen Versuche zur Bestimmung der anti-apoptischen Wirkung pockenviraler Apoptose Modulatoren basierten auf der Verwendung von *Knock out* Virusmutanten, oder dem Vergleich von trunkierten Homologen verschiedener Apoptose Modulatoren (Brick, Burke et al., 1998; Brick, Burke et al., 2000). Diese Versuche erlaubten jedoch nicht die Funktion der Proteine unbeeinflusst von den zahlreichen weiteren Modulatoren der Apoptose zu untersuchen, die von Pockenviren exprimiert werden (Barber, 2001; Seet, Johnston et al., 2003; Taylor, Quilty et al., 2006).

Insbesondere die Aussagekraft von Deletionsmutanten ist in Anbetracht der oft vielfältigen Strategien der Pockenviren zur Inhibition eines einzigen Signalweges der Apoptose fraglich. Beispielsweise sind mindestens zwei Wege der Inhibierung der TNF-induzierten Apoptose durch Pockenviren bekannt, die Verwendung löslicher TNF-Rezeptorhomologe (Schreiber & McFadden, 1994; Panus, Smith et al., 2002) und die direkte Inhibierung von Kaspasen durch Serpine (Tewari, Telford et al., 1995; Zhou, Snipas et al., 1997).

Um eine Charakterisierung des Einflusses der Proteine unabhängig von anderen viralen Proteinen zu ermöglichen, wurden Plasmide konstruiert, die eine Expression der Proteine in nicht infizierten eukaryontischen Zellen unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven CMV-Promotors ermöglichten.

Die Expression der Proteine nach transienter Transfektion der Expressionsplasmide in HEK 293 Zellen und ihre Lokalisierung in der Zelle wurde mittels konfokaler Laser-Raster Mikroskopie in Hinsicht auf YFP Signal und IgY Färbung bestätigt.

5.5.2 Schutz gegen Apoptose durch einzelne OPV-Proteine

Für die Apoptose Induktion in transfizierten Zellen wurde das exprimierte CrmA Protein als gut charakterisierte Kontrolle verwendet, da es am besten beschrieben ist und auf Ebene der Caspase Inhibition wirkt (Tewari & Dixit, 1995; Dbaibo & Hannun, 1998). Die Apoptose Induktion durch TNF- α und Staurosporin wurde anhand von Pan-Kaspase Markern verfolgt und quantifiziert. Es hat sich gezeigt, dass alle drei Proteine im Vergleich zur transfizierten Untereinheit der viralen RNA Polymerase einen deutlichen Einfluss auf die Apoptoserate in HEK 293 Zellen hatten. Das Niveau der Inhibition war bei allen Modulatoren ähnlich und die entsprechenden Mittelwerte bewegten sich zwischen 20% und 35%. Die Tatsache, dass der Anteil apoptotischer Zellen im Vergleich zur Kontrolle um 50% reduziert ist, macht deutlich, wie effektiv einzelne OPV Proteine in der Lage sind die Auswirkungen eines apoptotischen Stimulus zu negieren.

Man sollte zudem anmerken, dass die Mittelwerte der basalen Apoptoserate nach einer Transfektion mit OPV Proteinen zwischen 5% und 20% liegen, was bedeuten kann, dass die Zellen durch eine Überexpression und Anhäufung des jeweiligen Genproduktes ebenfalls geschädigt werden.

Davon ausgehend, dass OPV mindestens vier Apoptose Inhibitoren exprimieren und darüber hinaus weitere Immunmodulatoren, ist die Immunevasion dieser Viren hochgradig komplex und evolutionär sehr weit entwickelt. Die Betrachtung der Inhibitoren im Einzelnen ermöglicht durchaus Rückschlüsse auf deren Wirkmechanismen und so können zumindest Wirkprinzipien ausgeschlossen werden, die für neue Proteine postuliert wurden.

Hierbei ist insbesondere der Unterschied bei der Apoptose Inhibition nach Staurosporin Behandlung durch P28 deutlich. So kann ein komplettes P28 aus CPXV oder VACV WR den apoptotischen Anteil im Vergleich zur Kontrolle um 48, bzw. 52 Prozentpunkte reduzieren, während das trunkierte VACV LE Homolog lediglich eine Reduktion von 27 Prozentpunkten induziert. Da das trunkierte P28 eine verkürzte RING Zink Finger Domäne besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass diese für den anti-apoptotischen Mechanismus von Bedeutung ist.

Bei der *in vitro* Replikation in den meisten Zelllinien hat selbst die vollständige Deletion des P28 Gens keinen Einfluss. Eine Ausnahme bilden ruhende peritoneale Makrophagen, in denen Ektromelieviren ohne P28 nicht effektiv replizieren können. Die Blockade der Makrophagen,

welche für die Verbreitung des Virus im Organismus essentiell sind, wird als Ursache des stark attenuierten Infektionsverlaufs der P28 Deletionsmutante des Ektromelievirus angesehen (Senkevich, Wolffe et al., 1995). In Vacciniavirus infizierten HeLa Zellen verstärkt P28 die Inhibierung von UV induzierter Apoptose (Brick, Burke et al., 2000). Die Deletion des P28 Gens reduziert die Fähigkeit des Ektromelievirus in HeLa Zellen UV induzierte Apoptose zu inhibieren (Huang, Huang et al., 2004).

Innerhalb von ZBS1 wurden von Niedrig et al. (2009, unveröffentlichte Daten) verschiedene Wege der Apoptose Inhibition von P28 mittels spezifischer FLICA Reagenzien untersucht und ein Einfluss auf den bereits postulierten Typ II Weg der Apoptose upstream der Kaspase-9 festgestellt. Die hier gezeigten Daten unterstützen diese Aussagen im Hinblick auf die verstärkte intrinsische Inhibition nach Staurosporin Einsatz im Gegensatz zur TNF- α Induktion und deuten bei der Apoptose Inhibition verstärkt auf einen auf Ubiquitinierung basierenden Mechanismus der RING Domäne hin.

5.5.3 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst viele Werkzeuge geschaffen, um die Wirkmechanismen pockenviraler Apoptose Modulatoren zu untersuchen. Nach der Generierung von spezifischer qPCR, als auch IgY Ak wurden diese eingesetzt, um die Expression auf Transkriptom- und Proteom-Ebene zu untersuchen. Es konnten Aussagen über mRNA Level und Proteinlokalisierung in infizierten und transfizierten Zellen getroffen werden. Weiterhin wurden siRNA gegen die Apoptose Modulatoren entwickelt und eingesetzt, um eine schnelle Alternative zu *Knock out* Mutanten zu schaffen. Deren Einsatz hat gezeigt, dass die untersuchten Proteine nicht essentiell unter *in vitro* Bedingungen in Zelllinien und primären Zellen für die Virusreplikation sind. Letztendlich wurden einige Homologe der viralen Proteine in Zelllinien überexprimiert, um die Kultur vor einem apoptotischen Stimulus zu schützen und es konnte gezeigt werden, dass einzelne Proteine, aus dem Hintergrund der Infektion herausgelöst, in der Lage sind effektiv inhibitorisch auf apoptotische Prozesse zu wirken.

5.5.4 Ausblick

Zu den nächsten Vorhaben die auf dieser Arbeit aufbauend realisiert werden sollten gehören unter anderem:

- die Konstruktion sogenannter *Bacterial Artificial Chromosomes* (BACs) für OPV Genome
- die Erstellung von *Knock out* Mutanten für immunmodulatorische Proteine

- stabile Transfektion von Zelllinien zur Erleichterung der Arbeiten in der Zellkultur
- die genaue Ermittlung von Bindungspartnern für P28 durch Einsatz von 2D Gelelektrophorese gekoppelt an Massenspektrometrie, sowie ein Screening im *Yeast-2-Hybrid* (Y2H) System
- eine Verbesserung der Methodik zur IgY Generierung für eine besser definierte Herstellung von Ak

Im Einzelnen werden die möglichen Arbeiten ausführlicher vorgestellt.

Konstruktion von BACs verschiedener OPV und darauf folgende Generierung von Virusmutanten. Um spezifische Deletionsmutanten von VACV zu erstellen, sollten zunächst BAC einzelner Viren konstruiert werden. Ein bereits existierendes BAC von CPXV BR kann von einem Kooperationspartner für erste Arbeiten zur Verfügung gestellt werden. Ein BAC von VACV Stamm IHD-W, welches im Vergleich ein komplettes Arsenal an Immunmodulatoren besitzt, könnte als erstes erstellt werden und als Modellvirus für andere VACV dienen. Ein BAC von CMLV CP-19 würde aufgrund der hohen genetischen Homologie zu VARV Einblicke in die Immunmodulation von OPV mit engem Wirtsbereich liefern.

Die erstellten BACs können zur Generierung von Deletionsmutanten von P28 als auch anderer Immunmodulatoren verwendet werden. Die Charakterisierung sollte zunächst in humanen Zelllinien sowie primären Zellen aus verschiedenen Organen bezüglich Virusvermehrung erfolgen.

Analyse des Transkriptoms von Δ P28-OPV infizierten Zellen. Sollten signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp Viren und *Knock out* Mutanten auftreten, können detaillierte komparative Analysen des kompletten Transkriptoms mittels des Genome Sequencer FLX Systems durchgeführt werden. Das System steht am RKI zur Verfügung.

Analyse der Apoptose Modulation durch Δ P28-OPV. Die Apoptose Modulation in VACV infizierten Zellen wurde ausführlich behandelt. Es stellt sich die Frage nach dem Einfluss der Deletion von Apoptose Inhibitoren. Versuche hierzu könnten zunächst mit siRNA durchgeführt werden solange keine Deletionsmutanten vorhanden sind. Die Fähigkeiten der Mutanten im Vergleich zu Revertanten extrinsisch induzierte Apoptose zu inhibieren sollten untersucht werden. Versuchsanordnungen dieser Art können unerwartete Wirkmechanismen offenbaren.

Identifikation von zellulären Interaktionspartnern von P28, Etablierung eines Y2H Systems. Der Einsatz des Proteome Profiler Kits (R&D Systems) hat erste Hinweise auf mögliche Interaktionspartner von P28 geliefert. Mittels 2D-Gelelektrophorese vom

Gesamtprotein infizierter Zellen, gefolgt von einer MS Untersuchung ausgewählter Proteinbanden lassen sich Proteome mit unterschiedlichen OPV infizierter Zellen vergleichen. Schließlich können so erhaltene Hinweise zum Screening im Y2H-System verwendet werden, um die Interaktion auf molekularer Ebene nachzuweisen.

Optimierung der DNA Vakzinierung von Hühnern. Um weiteren Nutzen aus der unkomplizierten Produktion von IgY zu ziehen, sollte die Strategie der DNA-Immunisierung zur Produktion polyklonaler Ak im Huhn weiter optimiert werden. Damit kann eine Methode etabliert und standardisiert werden, die es ermöglicht, schnell und einfach spezifische Ak gegen beliebige Antigene zu erzeugen. Weiterhin sollen die Ergebnisse dieser Arbeit genutzt werden, das Immunsystem der Vögel bezüglich der Produktion von Ak besser zu verstehen, und diese neuen Erkenntnisse für die Herstellung von Ak und auch im Bereich der Veterinärmedizin zu nutzen. Als Anwendungsbeispiel könnten Ak gegen verschiedene relevante virale Proteine generiert werden, die sowohl in der Diagnostik als auch bei der Aufklärung von Pathogenese-Mechanismen notwendig und bislang nicht allgemein verfügbar sind. Das Spektrum an Modellviren könnte hierbei weiter ausgedehnt werden, um folgende Fragen zu beantworten:

Sind gegen die Oberflächenproteine von Viren hergestellte IgY-Ak funktional mit einem polyklonalen Mammalia-Immunsrum vergleichbar? Sind Gruppen von Viren durch die IgY-Ak feintypisierbar? Wie lassen sich Genus-spezifische Ak durch DNA-Immunisierung gewinnen? Wie groß kann der Anteil degenerierter Basen des DNA-Vakzins sein? Lassen sich Fusionskonstrukte oder Gemische verschiedener Expressionsplasmide für die Immunisierung verwenden?

Ein größeres Projekt, welches diese Fragestellungen experimentell klären soll, ist bereits in der Arbeitsgruppe geplant.

Abkürzungsverzeichnis

AIF	<i>apoptosis-inducing factor</i>	ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
Ak	Antikörper	kb	Kilobasen
AS	Aminosäure(n)	kDa	Kilodalton
ATP	Adenosintriphosphat	LE	Lister Elstree
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>	MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>	MOI	<i>multiplicity of infection</i>
Bax	<i>Bcl-2-associated X protein</i>	mRNA	<i>messenger RNA</i>
BCA	Bicinchoninsäure	MS	Massenspektroskopie
BH	<i>Bcl-2 homology domain</i>	MVA	<i>Modified Vaccinia Ankara</i>
BIR	<i>Baculovirus inhibitor of apoptosis</i>	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
bp	Basenpaar(e)	NK	Negativkontrolle
CAM	Chorioallantoismembran	NT	neutralisierender Titer
CARD	<i>caspase recruitment domain</i>	OD	optische Dichte
cDNA	<i>complementary DNA</i>	OPV	Orthopockenvirus
CHX	Cycloheximid	ORF	<i>open reading frame</i>
CI	<i>cell index</i>	PAA	Polyacrylamid
CMC	Carboxymethylcellulose	PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
CMLV	<i>Camelpoxvirus</i>	PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
CMV	Cytomegalievirus	pCEF	<i>primary chicken embryonic fibroblasts</i>
CPE	<i>cythopathic effect</i>	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
CPXV	<i>Cowpoxvirus</i>	PEG	Polyethylenglykol
CrmA	<i>caspase response modifier A</i>	PFU	plaque forming units
CTL	cytotoxische T Lymphozyten	PI	Propidiumiodid
DAPI	4',6-Diamino-2-phenylindol	PRNT	Plaque reduktions neutralisations Test
DED	<i>death effector domain</i>	PS	Phosphatidylserin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	qPCR	quantitative PCR
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>	RING	<i>really interesting new gene</i>
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	RIPA	<i>radio immuno precipitation assay</i>
dsRNA	<i>double strand RNA</i>	RNA	<i>ribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol	RNAi	<i>RNA interference</i>
ECTV	<i>Ectromeliavirus</i>	ROX	6-Carboxy-X-Rhodamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	RT	reverse Transkriptase
EEV	<i>extracellular enveloped virion</i>	RTNT	<i>real-time Neutralisationstest</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell scanning/sorting</i>	siRNA	<i>short interfering RNA</i>
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin	SPGF	<i>smallpox growth factor</i>
FKS	fötales Kälberserum	TRADD	<i>TNF-RI-associated death domain</i>
FLICA	<i>fluorochrome inhibitor of caspases</i>	TGF	<i>transforming growth factor</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>	TNF	Tumornekrosefaktor
GAAP	<i>golgi anti-apoptotic protein</i>	UV	ultraviolett
(e)GFP	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>	ü.N.	über Nacht
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>	ÜS	Überstand
IFN	Interferon	VACV	<i>Vacciniavirus</i>
IFT	Immunfluoreszenz Test	VARV	<i>Variolavirus</i>
IgG	Immunglobulin G	VETV	<i>Vacciniavirus early transcription factor</i>
IgY	Immunglobulin Y	VGF	<i>Vaccinia growth factor</i>
IL	Interleukin	WB	Western Blot
IMV	<i>intracellular mature virion</i>	WHO	<i>World Health Organisation</i>
		WR	Western Reserve
		Y2H	<i>yeast 2 hybrid</i>
		YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Systematische Einteilung der Poxviridae mit einem Schwerpunkt auf der Gattung Orthopoxvirus..	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Pockenvirus.	5
Abbildung 3: Vergleichende Darstellung von Nekrose und Apoptose	10
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Apoptose	14
Abbildung 5: Mechanismus der RNA Interferenz.....	20
Abbildung 6: Expression von CrmA, FIL und P28 bezogen auf zelluläres c-Myc.	50
Abbildung 7: Untersuchung von OPV Virionen auf mRNA mittels qPCR.	52
Abbildung 8: Einfluss der siRNA auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen .	53
Abbildung 9: Einfluss der siRNA Einzelgen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen.	54
Abbildung 10: Einfluss der siRNA Multigen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in HEK293 Zellen.	55
Abbildung 11: Einfluss der siRNA Multigen-Kombinationen auf die VACV Vermehrung und die virale Genexpression in pCEF Zellen	55
Abbildung 12: Genexpression nach der Infektion von FACS aufgereinigten, transfizierten HEK 293 Zellen.....	56
Abbildung 13: siRNA Sequenzalignments.....	57
Abbildung 14: Proteinzusammensetzung im aufgereinigten Eidotter	57
Abbildung 15: Beispiel einer IgY Verdünnungsreihe.....	58
Abbildung 16: Titerentwicklung spezifischer IgY in Hühnereiern nach DNA-Immunisierung.	59
Abbildung 17: Spezifitätsnachweis der generierten IgY	60
Abbildung 18: Testung der Spezifität der IgY-Ak.....	61
Abbildung 19: Visualisierung von Virusfabriken mittels Immunzytochemie mit anti-P28-IgY.....	62
Abbildung 20: Expression von CrmA nach einer OPV Infektion (6-10 h)	63
Abbildung 21: Expression von CrmA nach einer OPV Infektion (12-24 h)	64
Abbildung 22: Virustitration im xCELLigence System	65
Abbildung 23: Virustitration im Box-and-whisker-Diagramm	66
Abbildung 24: Verlauf eines qRTNT im xCELLigence System.....	67
Abbildung 25: Verlauf eines qRTNT im Box-and-whisker Diagramm.....	68
Abbildung 26: Standardgerade zur Bestimmung des exakten NT ₅₀ mit dem xCELLigence System	69
Abbildung 27: TNF induzierte Apoptose.....	71
Abbildung 28: Apoptose-Induktion in transfizierten Zellen	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung einer konventionellen PCR	33
Tabelle 2: Allgemeiner Ablauf einer konventionellen PCR	33
Tabelle 3: Zusammensetzung eines BigDye Sequenzierungsansatzes.....	35
Tabelle 4: Allgemeiner Ablauf einer BigDye Sequenzierungsreaktion	35
Tabelle 5: Sequenzangaben für verwendete siRNA Oligonukleotide	36
Tabelle 6: Zusammensetzung und Verlauf einer RT Reaktion	38
Tabelle 7: Zusammensetzung einer real-time PCR.....	39
Tabelle 8: Übersicht der Primer und Sonden für die qPCR	46
Tabelle 9: Übersicht der Klonierungsprimer für die Erstellung der DNA-Vakzine.....	47
Tabelle 10: Übersicht der Klonierungsprimer für die Erstellung der pcDNA 6.2 Plasmide	47
Tabelle 11: Übersicht der primären Ak und Marker	47
Tabelle 12: Übersicht der sekundären Ak und Marker.....	48
Tabelle 13: Zur Auswertung und Datenverarbeitung genutzte Software.....	49
Tabelle 14: Neutralisationstiter (NT ₅₀) verschiedener, gegen OPV gerichteter, Antikörper nach Bestimmungsmethode sortiert.	70

Literaturverzeichnis

- Abassi, Y. A., Jackson, J. A., Zhu, J., O'Connell, J., Wang, X., Xu, X., 2004. Label-free, real-time monitoring of IgE-mediated mast cell activation on microelectronic cell sensor arrays. *J.Immunol.Methods* 292, 195-205.
- Abouzid, K., Ndeboko, B., Durantel, S., Jamard, C., Zoulim, F., Buronfosse, T., Cova, L., 2005. Genetic vaccination for production of DNA-designed antibodies specific to Hepadnavirus envelope proteins. *Vaccine*. ..
- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., Akey, C. W., 2002. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol.Cell* 9, 423-432.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Sandybaev, N. T., Kerembekova, U. Z., Zaitsev, V. L., Kutish, G. F., Rock, D. L., 2002. The genome of camelpox virus. *Virology* 295, 1-9.
- Agrawal, N., Dasaradhi, P. V., Mohammed, A., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K., Mukherjee, S. K., 2003. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 67, 657-685.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science.
- Alcami, A., Ghazal, P., Yewdell, J. W., 2002. Viruses in control of the immune system. Workshop on molecular mechanisms of immune modulation: lessons from viruses. *EMBO Rep.* 3, 927-932.
- Alcami, A., Koszinowski, U. H., 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Mol.Med.Today* 6, 365-372.
- Alibek, K., 2004. Smallpox: A disease and a weapon. *Int.J.Infect.Dis.* 8 Suppl 2:S3-8., S3-S8.
- Amarzguoui, M., Holen, T., Babaie, E., Prydz, H., 2003. Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* 31, 589-595.
- Ameisen, J. C., 2002. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death.Differ.* 9, 367-393.
- Appleyard, G., Zwartouw, H. T., Westwood, J. C., 1964. A protective Antigen from the Pox-Viruses. I. Reaction with neutralizing Antibody. *Br.J.Exp.Pathol.* 45:150-61., 150-161.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., Patel, H. R., 2005. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 5, 209-219.
- Assarsson, E., Greenbaum, J. A., Sundstrom, M., Schaffer, L., Hammond, J. A., Pasquetto, V., Oseroff, C., Hendrickson, R. C., Lefkowitz, E. J., Tschärke, D. C., Sidney, J., Grey, H. M., Head, S. R., 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.
- Atienza, J. M., Zhu, J., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y., 2005. Dynamic monitoring of cell adhesion and spreading on microelectronic sensor arrays. *J.Biomol.Screen.* 10, 795-805.
- Baixeras, E., Cebrian, A., Albar, J. P., Salas, J., Martinez, A., Vinuela, E., Revilla, Y., 1998. Vaccinia virus-induced apoptosis in immature B lymphocytes: role of cellular Bcl-2. *Virus Res.* 58, 107-113.
- Barber, G. N., 2001. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death.Differ.* 8, 113-126.
- Benedict, C. A., Norris, P. S., Ware, C. F., 2002. To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat.Immunol.* 3, 1013-1018.
- Benedict, C. A., Ware, C. F., 2001. Virus targeting of the tumor necrosis factor superfamily. *Virology* 289, 1-5.

- Benhnia, M. R., McCausland, M. M., Su, H. P., Singh, K., Hoffmann, J., Davies, D. H., Felgner, P. L., Head, S., Sette, A., Garboczi, D. N., Crotty, S., 2008. Redundancy and plasticity of neutralizing antibody responses are cornerstone attributes of the human immune response to the smallpox vaccine. *J.Virol.* ..
- Bernkopf, H., Nishimi, M., Rosin, A., 1959. Effect of active and inactive vaccinia virus preparations on human amnion cell cultures. *J.Immunol.* 83:635-9., 635-639.
- Bernstein, E., Denli, A. M., Hannon, G. J., 2001. The rest is silence. *RNA.* 7, 1509-1521.
- Borner, C., 2003. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol.Immunol.* 39, 615-647.
- Boyd, J. M., Huang, L., Xie, L., Moe, B., Gabos, S., Li, X. F., 2008. A cell-microelectronic sensing technique for profiling cytotoxicity of chemicals. *Anal.Chim.Acta.* 615, 80-87.
- Brick, D. J., Burke, R. D., Minkley, A. A., Upton, C., 2000. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. *J.Gen.Virol.* 81, 1087-1097.
- Brick, D. J., Burke, R. D., Schiff, L., Upton, C., 1998. Shope fibroma virus RING finger protein N1R binds DNA and inhibits apoptosis. *Virology* 249, 42-51.
- Brown, A., Mayyasi, S. A., Officer, J. E., 1959. The toxic activity of vaccinia virus in tissue culture. *J.Infect.Dis.* 104, 193-202.
- Broyles, S. S., 2003. Vaccinia virus transcription. *J.Gen.Virol.* 84, 2293-2303.
- Brunetti, C. R., Paulose-Murphy, M., Singh, R., Qin, J., Barrett, J. W., Tardivel, A., Schneider, P., Essani, K., McFadden, G., 2003. A secreted high-affinity inhibitor of human TNF from Tanapox virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100, 4831-4836.
- Bustin, S. A., 2004. A-Z of Quantitative PCR. IUL Biotechnology.
- Caplen, N. J., Mousses, S., 2003. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1002:56-62., 56-62.
- Carlander, D., Stalberg, J., Larsson, A., 1999. Chicken antibodies: a clinical chemistry perspective. *Ups.J.Med.Sci.* 104, 179-189.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2003. Multistate outbreak of monkeypox-Illinois, Indiana, and Wisconsin, 2003. *MMWR Morb.Mortal.Wkly.Rep.* 52, 537-540.
- Chiou, V. Y., 2008. The development of IgY(DeltaFc) antibody based neuro toxin antivenoms and the study on their neutralization efficacies. *Clin.Toxicol.(Phila).* 46, 539-544.
- Cory, S., Adams, J. M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat.Rev.Cancer* 2, 647-656.
- Creagh, E. M., Martin, S. J., 2001. Caspases: cellular demolition experts. *Biochem.Soc.Trans.* 29, 696-702.
- Dash, P. K., Tiwari, M., Santhosh, S. R., Parida, M., Lakshmana Rao, P. V., 2008. RNA interference mediated inhibition of Chikungunya virus replication in mammalian cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 376, 718-722.
- Dave, R. S., McGettigan, J. P., Qureshi, T., Schnell, M. J., Nunnari, G., Pomerantz, R. J., 2006. siRNA targeting vaccinia virus double-stranded RNA binding protein [E3L] exerts potent antiviral effects. *Virology.* 348, 489-497.
- Davis, H. L., 1997. Plasmid DNA expression systems for the purpose of immunization. *Curr.Opin.Biotechnol.* 8, 635-646.
- Davison, F., Kaspers, B., Schat, K. A., 2008. *Avian Immunology.* Elsevier.

- Dbaibo, G. S., Hannun, Y. A., 1998. Cytokine response modifier A (CrmA): a strategically deployed viral weapon. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 86, 134-140.
- De, C. F., Pastoureau, P., Agnellet, S., Bonnet, J., Vanhoutte, P. M., 2001. Development of an enzyme-linked immunoassay for the quantification of YKL-40 (cartilage gp-39) in guinea pig serum using hen egg yolk antibodies. *J.Immunol.Methods* 252, 153-161.
- Denault, J. B., Salvesen, G. S., 2002. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem.Rev.* 102, 4489-4500.
- Dharmapuri, S., Aurisicchio, L., Biondo, A., Welsh, N., Ciliberto, G., La, M. N., 2009. Anti-apoptotic siRNA as potent adjuvant of DNA vaccination in a mouse mammary tumor model. *Hum.Gene Ther.*
- Di Giulio, D. B., Eckburg, P. B., 2004. Human monkeypox: an emerging zoonosis. *Lancet Infect.Dis.* 4, 15-25.
- Dixon, C. W., 1962. Smallpox. Churchill.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., Wang, X., 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Earnshaw, W. C., Martins, L. M., Kaufmann, S. H., 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.* 68, 383-424.
- Edwards, K. M., Davis, J. E., Browne, K. A., Sutton, V. R., Trapani, J. A., 1999. Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction. *Immunol.Cell Biol.* 77, 76-89.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., Tuschl, T., 2001. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 20, 6877-6888.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M., Bhardwaj, N., 1999. Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J.Immunol.* 163, 6762-6768.
- Esteban, D. J., Buller, R. M., 2005. Ectromelia virus: the causative agent of mousepox. *J.Gen.Virol.* 86, 2645-2659.
- Everett, H., Barry, M., Lee, S. F., Sun, X., Graham, K., Stone, J., Bleackley, R. C., McFadden, G., 2000. M11L: a novel mitochondria-localized protein of myxoma virus that blocks apoptosis of infected leukocytes. *J.Exp.Med.* 191, 1487-1498.
- Everett, H., McFadden, G., 2001. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. *Virology* 288, 1-7.
- Everett, H., McFadden, G., 2002. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr.Opin.Microbiol.* 5, 395-402.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z., Ladnyi, I. D., 1988. Smallpox and its Eradication. World Health Organization Geneva.
- Fischer, S. F., Ludwig, H., Holzapfel, J., Kvensakul, M., Chen, L., Huang, D. C., Sutter, G., Knese, M., Hacker, G., 2006. Modified vaccinia virus Ankara protein F1L is a novel BH3-domain-binding protein and acts together with the early viral protein E3L to block virus-associated apoptosis. *Cell Death.Differ.* 13, 109-118.
- Fu, C. Y., Huang, H., Wang, X. M., Liu, Y. G., Wang, Z. G., Cui, S. J., Gao, H. L., Li, Z., Li, J. P., Kong, X. G., 2006. Preparation and evaluation of anti-SARS coronavirus IgY from yolks of immunized SPF chickens. *J.Virol.Methods.* 133, 112-115.
- Fuchs, U., Welk, C., Borkhardt, A., 2004. Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr.Mol.Med.* 4, 507-517.

- Gassmann, M., Thommes, P., Weiser, T., Hubscher, U., 1990. Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4, 2528-2532.
- Gewies, A., 2003. Introduction to Apoptosis. ApoReview.
- Giaever, I., Keese, C. R., 1991. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88, 7896-7900.
- Grosjean, H., Fiers, W., 1982. Preferential codon usage in prokaryotic genes: the optimal codon-anticodon interaction energy and the selective codon usage in efficiently expressed genes. *Gene* 18, 199-209.
- Gubser, C., Bergamaschi, D., Hollinshead, M., Lu, X., van Kuppeveld, F. J., Smith, G. L., 2007. A new inhibitor of apoptosis from vaccinia virus and eukaryotes. *PLoS.Pathog.* 3, e17.
- Gubser, C., Hue, S., Kellam, P., Smith, G. L., 2004. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. *J.Gen.Virol.* 85, 105-117.
- Hamada, M., Ohtsuka, T., Kawaida, R., Koizumi, M., Morita, K., Furukawa, H., Imanishi, T., Miyagishi, M., Taira, K., 2002. Effects on RNA interference in gene expression (RNAi) in cultured mammalian cells of mismatches and the introduction of chemical modifications at the 3'-ends of siRNAs. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 12, 301-309.
- Hammond, S. M., 2005. Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 579, 5822-5829.
- Hengartner, M. O., 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hopkins, D. R., 2002. The Greatest Killer: Smallpox in History. The University of Chicago Press.
- Hruby, D. E., Ball, L. A., 1982. Mapping and identification of the vaccinia virus thymidine kinase gene. *J.Virol.* 43, 403-409.
- Huang, J., Huang, Q., Zhou, X., Shen, M. M., Yen, A., Yu, S. X., Dong, G., Qu, K., Huang, P., Anderson, E. M., niel-Issakani, S., Buller, R. M., Payan, D. G., Lu, H. H., 2004. The poxvirus p28 virulence factor is an E3 ubiquitin ligase. *J.Biol.Chem.* 279, 54110-54116.
- Huang, L., Xie, L., Boyd, J. M., Li, X. F., 2008. Cell-electronic sensing of particle-induced cellular responses. *Analyst.* 133, 643-648.
- Huang, Y., Park, Y. C., Rich, R. L., Segal, D., Myszka, D. G., Wu, H., 2001. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain. *Cell* 104, 781-790.
- Hughes, A. L., Friedman, R., 2005. Poxvirus genome evolution by gene gain and loss. *Mol.Phylogenet.Evol.* 35, 186-195.
- Humlova, Z., Vokurka, M., Esteban, M., Melkova, Z., 2002. Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J.Gen.Virol.* 83, 2821-2832.
- Jiang, Y., Yu, K., Zhang, H., Zhang, P., Li, C., Tian, G., Li, Y., Wang, X., Ge, J., Bu, Z., Chen, H., 2007. Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector. *Antiviral Res.* 75, 234-241.
- Juliano, R., Alam, M. R., Dixit, V., Kang, H., 2008. Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 36, 4158-4171.
- Jun, E. J., Nam, Y. R., Ahn, J., Tchah, H., Joo, C. H., Jee, Y., Kim, Y. K., Lee, H., 2008. Antiviral potency of a siRNA targeting a conserved region of coxsackievirus A24. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 376, 389-394.
- Kates, J., Beeson, J., 1970. Ribonucleic acid synthesis in vaccinia virus. I. The mechanism of synthesis and release of RNA in vaccinia cores. *J.Mol.Biol.* 50, 1-18.

- Kates, J. R., McAuslan, B. R., 1967. Messenger RNA Synthesis by a "coated" viral Genome. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 57, 314-320.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications it tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Kim, J., Kim, J. H., Choi, K. J., Kim, P. H., Yun, C. O., 2007. E1A- and E1B-Double mutant replicating adenovirus elicits enhanced oncolytic and antitumor effects. *Hum.Gene Ther.* 18, 773-786.
- Kim, M., Yang, H., Kim, S. K., Reche, P. A., Tirabassi, R. S., Hussey, R. E., Chishti, Y., Rheinwald, J. G., Morehead, T. J., Zech, T., Damon, I. K., Welsh, R. M., Reinherz, E. L., 2004. Biochemical and functional analysis of smallpox growth factor (SPGF) and anti-SPGF monoclonal antibodies. *J.Biol.Chem.* 279, 25838-25848.
- Kirstein, S. L., Atienza, J. M., Xi, B., Zhu, J., Yu, N., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y. A., 2006. Live cell quality control and utility of real-time cell electronic sensing for assay development. *Assay.Drug Dev.Technol.* 4, 545-553.
- Klimentzou, P., Paravatou-Petsotas, M., Zikos, C., Beck, A., Skopeliti, M., Czarnecki, J., Tsitsilonis, O., Voelter, W., Livaniou, E., Evangelatos, G. P., 2006. Development and immunochemical evaluation of antibodies Y for the poorly immunogenic polypeptide prothymosin alpha. *Peptides* 27, 183-193.
- Klotz, C., Gehre, F., Lucius, R., Pogonka, T., 2007. Identification of *Eimeria tenella* genes encoding for secretory proteins and evaluation of candidates by DNA immunisation studies in chickens. *Vaccine* 25, 6625-6634.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Salvesen, G., 1994b. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J.Biol.Chem.* 269, 19331-19337.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J., Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P., Salvesen, G., 1994a. Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition. *J.Biol.Chem.* 269, 19331-19337.
- Kovacs-Nolan, J., Mine, Y., 2004. Avian egg antibodies: basic and potential applications. *Avian and Poultry Biology Reviews* 15, 25-46.
- Kurth, A., Wibbelt, G., Gerber, H. P., Petschaelis, A., Pauli, G., Nitsche, A., 2008. Rat-to-Elephant-to-Human Transmission of Cowpox Virus. *Emerg.Infect.Dis.* 14, 670-671.
- Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C., Colman, P. M., 2008. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death.Differ.* ..
- Larsson, A., Balow, R. M., Lindahl, T. L., Forsberg, P. O., 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution--a review. *Poult.Sci.* 72, 1807-1812.
- Lawrence, S. J., Lottenbach, K. R., Newman, F. K., Buller, R. M., Bellone, C. J., Chen, J. J., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Belshe, R. B., Stanley, S. L., Jr., Frey, S. E., 2007. Antibody responses to vaccinia membrane proteins after smallpox vaccination. *J.Infect.Dis.* 196, 220-229.
- Lefkowitz, E. J., Wang, C., Upton, C., 2006. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res.* 117, 105-118.
- Leslie, G. A., Clem, L. W., 1969. Phylogen of immunoglobulin structure and function. 3. Immunoglobulins of the chicken. *J.Exp.Med.* 130, 1337-1352.
- Li, Q., Liston, P., Moyer, R. W., 2005. Functional analysis of the inhibitor of apoptosis (iap) gene carried by the entomopoxvirus of *Amsacta moorei*. *J.Virol.* 79, 2335-2345.
- Lord, S. J., Rajotte, R. V., Korbitt, G. S., Bleackley, R. C., 2003. Granzyme B: a natural born killer. *Immunol.Rev.* 193, 31-38.

- Luo, X., Budihardjo, I., Zou, H., Slaughter, C., Wang, X., 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94, 481-490.
- Macen, J., Takahashi, A., Moon, K. B., Nathaniel, R., Turner, P. C., Moyer, R. W., 1998. Activation of caspases in pig kidney cells infected with wild-type and CrmA/SPI-2 mutants of cowpox and rabbitpox viruses. *J.Virol.* 72, 3524-3533.
- Mackay, I. M., Arden, K. E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002 Mar 15;30(6):1292-305.
- Mallardo, M., Leithe, E., Schleich, S., Roos, N., Doglio, L., Krijnse, L. J., 2002. Relationship between vaccinia virus intracellular cores, early mRNAs, and DNA replication sites. *J.Virol.* 76, 5167-5183.
- McFadden, G., 2005. Poxvirus tropism. *Nat.Rev.Microbiol.* 3, 201-213.
- McLennan, A. G., 2007. Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Trends Biochem.Sci.* 32, 297-299.
- Meenatchisundaram, S., Parameswari, G., Michael, A., Ramalingam, S., 2008. Studies on pharmacological effects of Russell's viper and Saw-scaled viper venom and its neutralization by chicken egg yolk antibodies. *Int.Immunopharmacol.* 8, 1067-1073.
- Mercer, J., Helenius, A., 2008. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320, 531-535.
- Merchlinsky, M., Moss, B., 1989. Nucleotide sequence required for resolution of the concatemer junction of vaccinia virus DNA. *J.Virol.* 63, 4354-4361.
- Mine, Y., Kovacs-Nolan, J., 2004. Biologically Active Hen Egg Components in Human Health and Disease. *The Journal of Poultry Science* 41:1-29.
- Miura, M., Zhu, H., Rotello, R., Hartwig, E. A., Yuan, J., 1993. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C. elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75, 653-660.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., 2003. 19.4 Adenoviren. In: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Moore, Z. S., Seward, J. F., Lane, J. M., 2006. Smallpox. *Lancet* 367, 425-435.
- Moss, B., Shisler, J. L., 2001. Immunology 101 at poxvirus U: immune evasion genes. *Semin.Immunol.* 13, 59-66.
- Mund, T., Gewies, A., Schoenfeld, N., Bauer, M. K., Grimm, S., 2003. Spike, a novel BH3-only protein, regulates apoptosis at the endoplasmic reticulum. *FASEB J.* 17, 696-698.
- Munyon, W., Paoletti, E., Grace, J. T., Jr., 1967. RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 58, 2280-2287.
- Narat, M., 2003. Production of Antibodies in Chickens. *Food Technol.Biotechnol.* 41, 259-267.
- Nash, P., Barrett, J., Cao, J. X., Hota-Mitchell, S., Lalani, A. S., Everett, H., Xu, X. M., Robichaud, J., Hnatiuk, S., Ainslie, C., Seet, B. T., McFadden, G., 1999. Immunomodulation by viruses: the myxoma virus story. *Immunol.Rev.* 168, 103-120.
- Nathaniel, R., MacNeill, A. L., Wang, Y. X., Turner, P. C., Moyer, R. W., 2004. Cowpox virus CrmA, Myxoma virus SERP2 and baculovirus P35 are not functionally interchangeable caspase inhibitors in poxvirus infections. *J.Gen.Virol.* 85, 1267-1278.
- Nerenberg, B. T., Taylor, J., Bartee, E., Gouveia, K., Barry, M., Fruh, K., 2005. The poxviral RING protein p28 is a ubiquitin ligase that targets ubiquitin to viral replication factories. *J.Virol.* 79, 597-601.

- Nicholls, R. D., Gray, T. A., 2004. Cellular source of the poxviral N1R/p28 gene family. *Virus Genes*. 29, 359-364.
- Nilsson, L., Osmark, P., Fernandez, C., Bergenstahl, B., 2007. Competitive adsorption of proteins from total hen egg yolk during emulsification. *J.Agric.Food Chem.* 55, 6746-6753.
- Nitsche, A., Kurth, A., Pauli, G., 2007. Viremia in human Cowpox virus infection. *J.Clin.Virol.*
- Nitsche, A., Pauli, G., 2007. Sporadic human cases of cowpox in Germany. *Euro.Surveill* 12, E070419.
- Panus, J. F., Smith, C. A., Ray, C. A., Smith, T. D., Patel, D. D., Pickup, D. J., 2002. Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99, 8348-8353.
- Pink, J. R., Vainio, O., Rijnbeek, A. M., 1985. Clones of B lymphocytes in individual follicles of the bursa of Fabricius. *Eur.J.Immunol.* 15, 83-87.
- Pogo, B. G., Melana, S. M., Blaho, J., 2004. Poxvirus infection and apoptosis. *Int.Rev.Immunol.* 23, 61-74.
- Polson, A., von Wechmar, M. B., van Regenmortel, M. H., 1980. Isolation of viral IgY antibodies from yolks of immunized hens. *Immunol.Comm.* 9, 475-493.
- Postigo, A., Cross, J. R., Downward, J., Way, M., 2006. Interaction of F1L with the BH3 domain of Bak is responsible for inhibiting vaccinia-induced apoptosis. *Cell Death.Differ.* 13, 1651-1662.
- Postigo, A., Martin, M. C., Dodding, M. P., Way, M., 2009. Vaccinia-induced EGFR-MEK signalling and the anti-apoptotic protein F1L synergize to suppress cell death during infection. *Cell Microbiol.*
- Promega Corporation. siRNA Target Designer - Version 1.51. (1.51). 2003. 2003.
Ref Type: Computer Program
- Ramsey-Ewing, A., Moss, B., 1998. Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology*. 242, 138-149.
- Reynaud, C. A., Dahan, A., Anquez, V., Weill, J. C., 1989. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59, 171-183.
- Richardson, H., Kumar, S., 2002. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J.Immunol.Methods* 265, 21-38.
- Roberts, K. L., Smith, G. L., 2008. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.*
- Rose, M. E., Orlans, E., Buttress, N., 1974. Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white. *Eur.J.Immunol.* 4, 521-523.
- Rosel, J., Moss, B., 1985. Transcriptional and translational mapping and nucleotide sequence analysis of a vaccinia virus gene encoding the precursor of the major core polypeptide 4b. *J.Virol.* 56, 830-838.
- Rothe, D., Werk, D., Dutkiewicz, M., Schubert, S., Grunert, H. P., Zeichhardt, H., Erdmann, V. A., Fechner, H., Kurreck, J., 2008. Inhibition of picornaviruses by means of RNA interference. *Nucleic Acids Symp.Ser.(Oxf)*. 63-64.
- Roulston, A., Marcellus, R. C., Branton, P. E., 1999. Viruses and apoptosis. *Annu.Rev.Microbiol.* 53, 577-628.
- Salvesen, G. S., Duckett, C. S., 2002. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, 401-410.
- Sanz, P., Moss, B., 1999. Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 2692-2697.

- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., Peter, M. E., 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 17, 1675-1687.
- Schade, R., Burger, W., Schoneberg, T., Schniering, A., Schwarzkopf, C., Hlinak, A., Kobilke, H., 1994. [Avian egg yolk antibodies. The egg laying capacity of hens following immunisation with antigens of different kind and origin and the efficiency of egg yolk antibodies in comparison to mammalian antibodies]. *ALTEX.* 11, 75-84.
- Schade, R., Calzado, E. G., Sarmiento, R., Chacana, P. A., Porankiewicz-Asplund, J., Terzolo, H. R., 2005. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. *Altern.Lab Anim* 33, 129-154.
- Schade, R., Pfister, C., Halatsch, R., Henklein, P., 1991. Polyclonal IgY antibodies from chicken egg yolk -- an alternative to the production of mammalian IgG type antibodies in rabbits. *ATLA* 19, 403-419.
- Schreiber, M., McFadden, G., 1994. The myxoma virus TNF-receptor homologue (T2) inhibits tumor necrosis factor- α in a species-specific fashion. *Virology* 204, 692-705.
- Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., McFadden, G., 2003. Poxviruses and immune evasion. *Annu.Rev.Immunol.* 21, 377-423.
- Senkevich, T. G., Koonin, E. V., Buller, R. M., 1994. A poxvirus protein with a RING zinc finger motif is of crucial importance for virulence. *Virology.* 198, 118-128.
- Senkevich, T.G., Wolffe, E.J., Buller, R.M., 1995. Ectromelia virus RING finger protein is localized in virus factories and is required for virus replication in macrophages. *J Virol.* 69(7):4103-11.
- Sharma, J. M., 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet.Hung.* 45, 229-238.
- Shaw, G., Morse, S., Ararat, M., Graham, F. L., 2002. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J.* 16, 869-871.
- Shisler, J. L., Moss, B., 2001. Molluscum contagiosum virus inhibitors of apoptosis: The MC159 v-FLIP protein blocks Fas-induced activation of procaspases and degradation of the related MC160 protein. *Virology* 282, 14-25.
- Silva-Fernandes, A. T., Travassos, C. E., Ferreira, J. M., Abrahao, J. S., Rocha, E. S., Viana-Ferreira, F., dos, S., Jr., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., 2009. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J.Clin.Virol.*
- Sivapalasingam, S., Kennedy, J. S., Borkowsky, W., Valentine, F., Zhan, M. X., Pazoles, P., Paolino, A., Ennis, F. A., Steigbigel, N. H., 2007. Immunological memory after exposure to variola virus, monkeypox virus, and vaccinia virus. *J.Infect.Dis.* 195, 1151-1159.
- Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., Wang, H. G., Reed, J. C., Nicholson, D. W., Alnemri, E. S., Green, D. R., Martin, S. J., 1999. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.* 144, 281-292.
- Smith, C. A., Davis, T., Anderson, D., Solam, L., Beckmann, M. P., Jerzy, R., Dower, S. K., Cosman, D., Goodwin, R. G., 1990. A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. *Science* 248, 1019-1023.
- Smith, C. A., Davis, T., Wignall, J. M., Din, W. S., Farrah, T., Upton, C., McFadden, G., Goodwin, R. G., 1991. T2 open reading frame from the Shope fibroma virus encodes a soluble form of the TNF receptor. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 176, 335-342.
- Smith, G. L., Symons, J. A., Alcamí, A., 1998. Poxviruses: interfering with interferon. *Semin.Virol.* 8, 409-418.
- Smith, K. G., Strasser, A., Vaux, D. L., 1996a. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J.* 15, 5167-5176.

- Smith, K. G., Strasser, A., Vaux, D. L., 1996b. CrmA expression in T lymphocytes of transgenic mice inhibits CD95 (Fas/APO-1)-transduced apoptosis, but does not cause lymphadenopathy or autoimmune disease. *EMBO J.* 15, 5167-5176.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of real-time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays. *Assay Drug Dev. Technol.* 2, 363-372.
- Song, E., Lee, S. K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., Lieberman, J., 2003. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.
- Stewart, T. L., Wasilenko, S. T., 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.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Siderovski, D. P., Penninger, J. M., Kroemer, G., 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki, Y., Nakabayashi, Y., Nakata, K., Reed, J. C., Takahashi, R., 2001. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. *J. Biol. Chem.* 276, 27058-27063.
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., ssa-Munt, N., Salvesen, G. S., Reed, J. C., 1998. A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 273, 7787-7790.
- Taylor, J. M., Quilty, D., Banadyga, L., Barry, M., 2006. The vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J. Biol. Chem.* ..
- Tewari, M., Dixit, V. M., 1995. Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. *J. Biol. Chem.* 270, 3255-3260.
- Tewari, M., Telford, W. G., Miller, R. A., Dixit, V. M., 1995. CrmA, a poxvirus-encoded serpin, inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* 270, 22705-22708.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tini, M., Jewell, U. R., Camenisch, G., Chilov, D., Gassmann, M., 2002. Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comp Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 131, 569-574.
- Truyen, U., 2002. *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag.
- 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.
- Van, N. S., Umeda, K., Yokoyama, H., Tohya, Y., Kodama, Y., 2006. Passive protection of dogs against clinical disease due to Canine parvovirus-2 by specific antibody from chicken egg yolk. *Can. J. Vet. Res.* 70, 62-64.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184, 39-51.
- Wang, G., Barrett, J. W., Nazarian, S. H., Everett, H., Gao, X., Bleackley, C., Colwill, K., Moran, M. F., McFadden, G., 2004. Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. *J. Virol.* 78, 7097-7111.
- Wang, X., 2001. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 15, 2922-2933.
- Warr, G. W., Magor, K. E., Higgins, D. A., 1995. IgY: clues to the origins of modern antibodies. *Immunol. Today* 16, 392-398.

- Wasilenko, S. T., 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.
- Winkle, S., 2005. *Geißeln der Menschheit - Kulturgeschichte der Seuchen*. Artemis & Winkler.
- Witkowski, P. T., Bourquain, D. R., Hohn, O., Schade, R., Nitsche, A., 2009. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. *J.Immunol.Methods* 341, 146-153.
- Wolff, J. A., Ludtke, J. J., Acsadi, G., Williams, P., Jani, A., 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum.Mol.Genet.* 1, 363-369.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., Felgner, P. L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Xiao, C., Lachance, B., Sunahara, G., Luong, J. H., 2002. Assessment of cytotoxicity using electric cell-substrate impedance sensing: concentration and time response function approach. *Anal.Chem.* 74, 5748-5753.
- Xu, Q., Song, X., Xu, L., Yan, R., Shah, M. A., Li, X., 2008. Vaccination of chickens with a chimeric DNA vaccine encoding *Eimeria tenella* TA4 and chicken IL-2 induces protective immunity against coccidiosis. *Vet.Parasitol.* 156, 319-323.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., Ashwell, J. D., 2000. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 288, 874-877.
- Yokoyama, K., Sugano, N., Shimada, T., Shofiqur, R. A., Ibrahim, e., Isoda, R., Umeda, K., Sa, N. V., Kodama, Y., Ito, K., 2007b. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. *J.Oral Sci.* 49, 201-206.
- Yokoyama, K., Sugano, N., Shimada, T., Shofiqur, R. A., Ibrahim, e., Isoda, R., Umeda, K., Sa, N. V., Kodama, Y., Ito, K., 2007a. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. *J.Oral Sci.* 49, 201-206.
- Zender, L., Kubicka, S., 2004. SiRNA based strategies for inhibition of apoptotic pathways in vivo--analytical and therapeutic implications. *Apoptosis.* 9, 51-54.
- Zhang, X., Kurth, A., Pauly, D., Pauli, G., Schade, R., Ellerbrok, H., 2008. Application of high-titred IgY antibodies in orthopox virus diagnostics. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences* 17, 183-191.
- Zhou, Q., Snipas, S., Orth, K., Muzio, M., Dixit, V. M., Salvesen, G. S., 1997. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. *J.Biol.Chem.* 272, 7797-7800.

Liste eigener Veröffentlichungen

Artikel in Zeitschriften

Griesche, N., Zikos, D., Witkowski, P.T., Nitsche, A., Ellerbrok, H., Spiller, O.B., Pauli, G., Biere, B., 2008. Growth characteristics of human adenoviruses on porcine cell lines. Virology. 2008 Apr 10;373(2):400-10. Epub 2008 Jan 11.

Witkowski, P.T., Bourquain, D.R., Hohn, O., Schade, R., Nitsche, A., 2009. Gene gun-supported DNA immunisation of chicken for straightforward production of poxvirus-specific IgY antibodies. J.Immunol.Methods 341, 146-153.

Witkowski, P.T. & Schuenadel L., Wiethaus, J., Bourquain, D.R., Kurth, A., Nitsche A., 2009. Cellular Impedance Measurement as a New Tool for Poxvirus Titration, Antibody Neutralisation Testing and Evaluation of Antiviral Substances. Eingereicht bei Applied Microbiology and Biotechnology.

Vorträge bei Konferenzen

Witkowski, P., Nitsche, A., Kurth, A., 2008. Infektionen mit Kuhpockenviren durch Ratten. 1. Workshop des Netzwerkes „Nagetier-übertragene Pathogene“, Friedrich Loeffler Institut.

Witkowski, P., Wiethaus, J., Bourquain, D., Hohn, O., Schade, R., Nitsche, A. Gene Gun supported Immunisation of Chicken for Straightforward Production of Poxvirus specific IgY Antibodies. Gesellschaft für Virologie Annual Meeting 2009

Artikel in Vorbereitung

Witkowski, P.T., Voigt, A., Niedrig, D., Reiche, J., Nitsche, A. RNAi reveals: Expression of anti-apoptotic Proteins is not required for Orthopoxvirus Replication *in vitro*.

Niedrig, D. & Bourquain, D.R., Witkowski, P.T., Nitsche, A. A system allowing rapid analysis of putative apoptosis-modulating proteins heterologously expressed in HEK293 cells.

Bourquain, D.R., Niedrig, D., Witkowski, P.T., Nitsche, A. Orthopoxvirus protein p28 protects HEK293 cells from TNF induced apoptosis.