

**Untersuchungen zur antiviralen Aktivität  
des humanen Zinkfinger antiviralen Proteins  
gegen Alphaviren**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Sabine Gläsker**

aus

Kreuztal

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Drosten  
Institut für Virologie  
Universität Bonn

2. Gutachter: Prof. Dr. Albert Haas  
Institut für Zellbiologie  
Universität Bonn

Tag der Promotion: 29.08.2014

Erscheinungsjahr: 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>8</b>
1.1 <i>Das Zinkfinger antivirale Protein.....</i>	8
1.1.1 Virusspektrum und antiviraler Mechanismus.....	8
1.1.2 Das humane ZAP-Ortholog.....	9
1.1.3 Das hZAP-L als Mitglied der PARP-Familie.....	11
1.1.4 ZAP und das Typ I Interferon-System.....	12
1.2 <i>Alphaviren.....</i>	15
1.2.1 Virionstruktur und Genomaufbau.....	16
1.2.2 Virusproteine.....	17
1.2.3 Lebenszyklus.....	18
1.2.4 Antagonismus gegen die antivirale Wirtszellantwort.....	20
1.2.5 Die Makrodomäne des nsP3.....	21
1.3 <i>Zielsetzung der Arbeit.....</i>	22
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1 <i>Material.....</i>	24
2.1.1 Zelllinien.....	24
2.1.2 Viren.....	24
2.1.3 Bakterien.....	24
2.1.4 Plasmide.....	25
2.1.5 Oligonukleotide.....	26
2.1.5.1 Klonierungsprimer.....	26
2.1.5.2 LIC-Klonierungsprimer.....	27
2.1.5.3 <i>Real-time</i> RT-PCR Primer.....	27
2.1.5.4 <i>Real-time</i> RT-PCR Sonden.....	28
2.1.5.5 siRNAs.....	28
2.1.6 Antikörper.....	28
2.1.7 Enzyme.....	29
2.1.8 DNA- und Proteinmarker.....	29
2.1.9 Kits.....	29
2.1.10 Chemikalien.....	29
2.1.11 Puffer und Lösungen.....	31

---

2.1.12	Zellkulturmedien und Zusätze .....	32
2.1.13	Nährmedien und Antibiotika .....	33
2.1.14	Verbrauchsmaterialien .....	33
2.1.15	Geräte .....	34
2.1.16	Software.....	35
2.2	<i>Methoden</i> .....	36
2.2.1	Zellkultur.....	36
2.2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	36
2.2.1.2	Poly-L-Lysin Beschichtung von Zellkulturplatten .....	37
2.2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	37
2.2.1.4	MTT-Viabilitätstest.....	37
2.2.1.5	Lipofektion eukaryotischer Zellen.....	38
2.2.1.6	Elektroporation eukaryotischer Zellen .....	39
2.2.1.7	Generierung stabil transfizierter Flp-In T-REx Zelllinien .....	40
2.2.1.8	Kryokonservierung von Flp-In T-REx-293 Zellen .....	41
2.2.2	Virologische Methoden .....	42
2.2.2.1	Produktion infektiöser Viruspartikel.....	42
2.2.2.2	<i>Infectious Center Assay</i> .....	42
2.2.2.3	Virusinfektion eukaryotischer Zellen .....	43
2.2.2.4	Virustitration und Plaqueassay .....	43
2.2.3	Mikrobiologische Methoden .....	44
2.2.3.1	Herstellung transformationskompetenter Bakterien .....	44
2.2.3.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	45
2.2.4	DNA-Techniken .....	45
2.2.4.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	45
2.2.4.2	Mutagenese-/Fusions-PCR.....	46
2.2.4.3	Kolonie-PCR.....	47
2.2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese .....	48
2.2.4.5	DNA-Aufreinigung .....	49
2.2.4.6	Restriktionsverdau von DNA.....	49
2.2.4.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	50
2.2.4.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	50
2.2.4.9	Plasmidpräparation.....	50
2.2.4.10	Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	51
2.2.4.11	Sequenzierung von DNA .....	52
2.2.4.12	Klonierung durch <i>Ligation Independent Cloning</i> .....	52

2.2.5	RNA-Techniken .....	53
2.2.5.1	Synthese gecappter RNA mittels <i>in vitro</i> Transkription .....	53
2.2.5.2	RNA-Extraktion.....	54
2.2.5.3	Reverse Transkription und PCR im Ein-Schritt-Verfahren.....	55
2.2.5.4	<i>Real-time</i> RT-PCR .....	55
2.2.6	Proteinbiochemische Methoden .....	56
2.2.6.1	Präparation von Zelllysaten mit Lämmli-Probenpuffer .....	56
2.2.6.2	Coimmunopräzipitation .....	57
2.2.6.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	58
2.2.6.4	Coomassie-Färbung .....	59
2.2.6.5	Western Blot und Immundetektion.....	59
2.2.6.6	<i>Strippen</i> von Nitrocellulose-Membranen .....	60
2.2.6.7	Proteinaufreinigung via HA-Tag.....	60
2.2.6.8	Bakterielle Proteinexpression .....	60
2.2.6.9	Proteinaufreinigung .....	62
2.2.6.10	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	63
2.2.6.11	Pufferaustausch und Aufkonzentrierung mit Vivaspin-Konzentratoren .....	64
2.2.6.12	Isothermale Titrationskalorimetrie.....	64
2.2.6.13	Analyse enzymatischer Ribosylierungsaktivität .....	65
2.2.6.14	Messung der <i>Renilla</i> Luciferase-Aktivität .....	66
2.2.6.15	Differenzielle Zellfraktionierung .....	66
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
3.1	<i>Untersuchung der antiviralen Aktivität des hZAP gegen Alphaviren .....</i>	<i>67</i>
3.1.1	Generierung induzierbarer hZAP-L- und hZAP-S-Expressionszelllinien .....	67
3.1.2	Wachstumskinetiken des SINV und CHIKV auf hZAP-Expressionszelllinien .....	69
3.1.3	Hemmung verschiedener Alphaviren durch hZAP.....	70
3.2	<i>Untersuchung der antiviralen Aktivität des endogenen hZAP-L .....</i>	<i>73</i>
3.2.1	Etablierung des siRNA-vermittelten <i>knockdown</i> des hZAP-L .....	73
3.2.2	Überprüfung des hZAP-L- <i>knockdown</i> auf Protein- und mRNA-Ebene .....	76
3.2.3	Wachstumskinetiken des SINV und CHIKV auf hZAP-L- <i>knockdown</i> -Zellen .....	77
3.3	<i>Bedeutung der PARP-ähnlichen Domäne für die antivirale Aktivität des hZAP-L ....</i>	<i>78</i>
3.3.1	Generierung induzierbarer Expressionszelllinien der hZAP-L Triadenmotiv- Mutanten .....	79
3.3.2	Hemmung des SINV und CHIKV durch die Triadenmotiv-Mutanten .....	80
3.3.3	Subzelluläre Lokalisation des hZAP-S, hZAP-L und der Triadenmotiv-Mutante AAA ....	84

---

3.4	<i>Untersuchung von CHIKV Chimären nach Insertion des SINV ZRE</i> .....	86
3.4.1	Erzeugung der ZRE-Chimären .....	86
3.4.2	Hemmung der ZRE-Chimären durch hZAP.....	88
3.5	<i>Bedeutung der viralen Makrodomäne für die Hemmung durch hZAP-L</i> .....	90
3.5.1	Untersuchung von SINV Chimären nach Insertion der CHIKV Makrodomäne .....	90
3.5.1.1	Erzeugung der Makrodomänen-Chimären .....	91
3.5.1.2	Hemmung der Makrodomänen-Chimären durch hZAP.....	92
3.5.2	Untersuchung alphaviraler Makrodomänen-Mutanten.....	94
3.5.2.1	Erzeugung und Wachstumskinetiken der SINV Makrodomänen-Mutanten .....	94
3.5.2.2	Erzeugung und Wachstumskinetiken der CHIKV Makrodomänen-Mutanten .....	97
3.5.2.3	Untersuchung der CHIKV Makrodomänen-Mutante D10A .....	100
3.6	<i>Interaktion des hZAP-L mit nsP3-Varianten des CHIKV</i> .....	104
3.7	<i>Untersuchung der ADP-Ribose-Bindung alphaviraler Makrodomänen und der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L</i> .....	107
3.7.1	Proteinexpression und -aufreinigung .....	107
3.7.2	Bestimmung der ADP-Ribose-Affinität .....	110
3.8	<i>Transribosylierungsstudie des hZAP-L mit PARP12 und PARP15</i> .....	112
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>115</b>
4.1	<i>Ausmaß der hZAP-vermittelten Hemmung von Alphaviren</i> .....	115
4.2	<i>Antivirale Aktivität des endogenen hZAP-L</i> .....	117
4.3	<i>Einfluss des ZRE auf die hZAP-vermittelte Inhibition</i> .....	119
4.4	<i>Relevanz der PARP-ähnlichen Domäne für die antivirale Aktivität des hZAP-L</i> .....	121
4.5	<i>Alphavirale Makrodomänen als hZAP-L-Antagonisten</i> .....	125
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>131</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>133</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>135</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>147</b>
8.1	<i>Abkürzungsverzeichnis</i> .....	147
8.2	<i>Vektorkarten</i> .....	150

<b>8.3</b>	<b><i>Klonierungsübersicht</i></b> .....	<b>151</b>
8.3.1	Expressionsplasmide für hZAP-L und hZAP-S .....	151
8.3.2	Triadenmotiv-Mutanten des hZAP-L .....	152
8.3.3	ZRE-Chimären .....	152
8.3.4	Makrodomänen-Chimären .....	153
8.3.5	SINV Makrodomänen-Mutanten .....	154
8.3.6	CHIKV Makrodomänen-Mutanten.....	154
8.3.7	Untersuchung der CHIKV D10A-Mutante .....	155
8.3.8	CHIKV CoIP-Konstrukte .....	157
8.3.9	Expressionsplasmide für die bakterielle Proteinexpression.....	158
<b>8.4</b>	<b><i>Erklärung zur Dissertation</i></b> .....	<b>159</b>
<b>8.5</b>	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>160</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Das Zinkfinger antivirale Protein

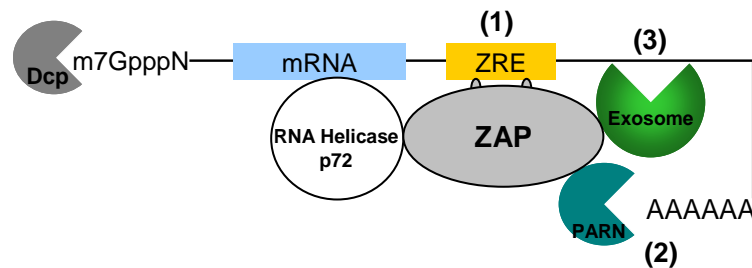
### 1.1.1 Virusspektrum und antiviraler Mechanismus

Vertebratenzellen haben verschiedene Strategien entwickelt, um einer Virusinfektion zu entgehen oder die virale Replikation nach erfolgter Infektion zu verhindern. Auf der Suche nach zellulären Faktoren mit antiviraler Aktivität gegen Retroviren identifizierten Gao *et al.* (2002) das Zinkfinger antivirale Protein (ZAP). Neben Vertretern der Retroviren (Murines Leukämievirus (MLV), Humanes Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1), *Xenotropic murine leukemia virus-related Virus*) erwies sich ZAP auch als effektiver Inhibitor diverser RNA- (Alpha- und Filoviren) und DNA-Viren (Murines Herpesvirus 4, Hepatitis-B-Virus) (Bick *et al.*, 2003; Gao *et al.*, 2002; Kerns *et al.*, 2008; Mao *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Trotz des breiten Virusspektrums wirkt ZAP nicht als genereller antiviraler Faktor, da es z.B. gegen Gelbfieber-Virus (YFV), Vesicular-Stomatitis-Virus sowie Humanes Herpesvirus 1 inaktiv ist (Bick *et al.*, 2003).

Die Hemmung der verschiedenen Viren wird durch den ZAP-vermittelten, spezifischen Abbau der viralen messenger RNA (mRNA) im Zytoplasma verursacht, ohne dass dabei zelleigene mRNAs angegriffen werden (Gao *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2007; Zhu & Gao, 2008). Für diese antivirale Aktivität ausschlaggebend sind die namensgebenden CCCH-Typ Zinkfinger motive in der Amino (N)-terminalen Region des ZAP (Guo *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010b). Mittels der Zinkfinger motive, die generell als Bindemotive für einzelsträngige RNA bekannt sind (Brown, 2005), bindet ZAP direkt an die virale mRNA (Guo *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2010). Daran sind vor allem das zweite und vierte der insgesamt vier CCCH-Motive maßgeblich beteiligt (Guo *et al.*, 2004; Müller *et al.*, 2007). Das Motiv in der viralen mRNA, das die Bindung durch ZAP veranlasst, wird als *ZAP responsive element* (ZRE) bezeichnet (Guo *et al.*, 2007). Bei einigen ZAP-sensitiven Viren wurde bereits deren ZRE lokalisiert (Guo *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Dabei konnten jedoch keine sequenziellen oder strukturellen Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen ZREs identifiziert werden. Nach Bindung der viralen mRNA rekrutiert ZAP die Deadenylase Poly(A)-spezifische-Ribonuklease (PARN), die den 3'-Polyadenin (Poly(A))-Schwanz der mRNA entfernt (Abb. 1.1) (Zhu & Gao, 2008). Dadurch ist die



virale mRNA zugänglich für den 3′-5′-Abbau durch das gleichzeitig von ZAP herbeigeführte RNA-Exosom (Guo *et al.*, 2007). Die ebenfalls von ZAP rekrutierten zellulären RNA-Helikasen p72 (Chen *et al.*, 2008) und DHX30 (Ye *et al.*, 2010) entwinden dabei Sekundärstrukturen der viralen mRNA für eine effiziente Degradation, da das RNA-Exosom lediglich destrukturierte RNA prozessieren kann (Liu *et al.*, 2006).



**Abb. 1.1: ZAP-vermittelte Degradation viraler mRNA.** ZAP bindet über seine Zinkfinger motive spezifisch an das ZRE einer viralen mRNA (1). Zur Destrukturierung und Deadenylierung der mRNA rekrutiert ZAP die RNA-Helikase p72 und die Deadenylase PARN (2) sowie das RNA Exosom (3) für den 3′-5′-Abbau der mRNA. Abbildung verändert nach Zhu und Gao (2008).

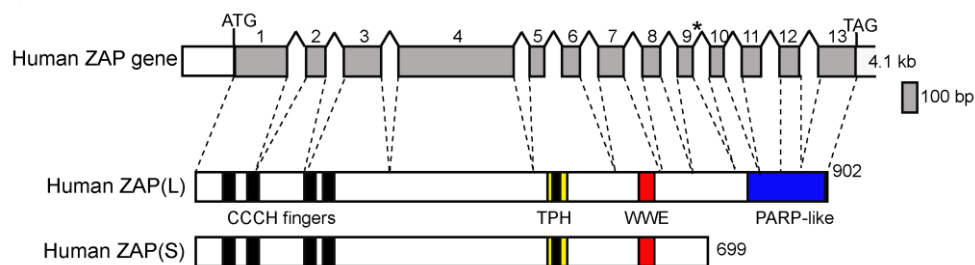
Unabhängig von der mRNA-Degradation inhibiert ZAP auch spezifisch die Translation viraler, ZRE-enhaltender mRNAs, indem es die Translationsinitiation stört (Zhu *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2012). Die Umstände, unter denen ZAP die Translation reprimiert und/oder die RNA-Degradation einleitet, sind allerdings noch unbekannt. Sun *et al.* (2012) entdeckten einen Zusammenhang zwischen der Phosphorylierung bestimmter Serin-Reste des ZAP durch die Glykogensynthase-Kinase 3 $\beta$ , die zwar für die Vermittlung der Translationsinhibition, aber nicht des mRNA-Abbaus erforderlich ist.

Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass ZAP über seinen N-Terminus homotypische Interaktionen eingeht, welche für die antivirale Aktivität wichtig sind (Chen *et al.*, 2012; Law *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Das humane ZAP-Ortholog

Das humane ZAP-Ortholog (hZAP) wird von dem 60 Kilobasen (kb) umfassenden Gen *ZC3HAV1*, das insgesamt 13 Exons aufweist, kodiert (Abb. 1.2) (Kerns *et al.*, 2008). Aus alternativem Spleißen des Transkriptes resultieren zwei hZAP-Isoformen, das lange hZAP (hZAP-L; 902 Aminosäuren) und das kurze hZAP (hZAP-S; 699 Aminosäuren) (Kerns *et al.*,

2008). Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene beträgt zwischen hZAP und dem ZAP der Ratte (rZAP) etwa 50%, während die N-terminale Region mit den vier Zinkfingermotiven unter ZAP-Orthologen hoch konserviert ist (Jeong *et al.*, 2010; Kerns *et al.*, 2008). Die beiden humanen Isoformen unterscheiden sich lediglich anhand der zusätzlichen Carboxy (C)-terminalen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-ähnlichen Domäne des hZAP-L, während die Sequenz mit den anderen Proteindomänen identisch ist (Kerns *et al.*, 2008). Neben den RNA-bindenden Zinkfingermotiven sind dies eine konservierte TiPARP-Homologie (TPH)-Domäne mit einem fünften Zinkfingermotiv und eine WWE-Domäne, die als Protein-Protein-Interaktionsmodul mit u.a. Adenosindiphosphat (ADP)-Ribose-konjugierten Proteinen bekannt ist (Aravind, 2001).



**Abb. 1.2: Genom- und Proteinstruktur des hZAP.** Dargestellt sind die 13 Exons mit Start- (ATG) und Stoppcodon (TAG) des insgesamt 60 kb umfassenden humanen Gens *ZC3HAV1*. Aus alternativem Spleißen des Transkriptes resultieren die beiden Proteinisoformen hZAP-L (902 Aminosäuren) und hZAP-S (699 Aminosäuren). \* kennzeichnet das Stoppcodon der hZAP-S-mRNA. Beide Proteine besitzen vier CCCH-Zinkfinger (schwarz), eine TPH-Domäne (gelb) mit einem fünften CCCH-Motiv und eine WWE-Domäne (rot). Den C-terminalen Bereich des hZAP-L repräsentiert eine PARP-ähnliche Domäne (blau). Abbildung nach Kerns *et al.* (2008).

Die genaue Funktion der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L ist bislang unbekannt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass hZAP-L gegen u.a. das Alphavirus Semliki-Forest-Virus (SFV) deutlich stärkere antivirale Aktivität besitzt als hZAP-S (Kerns *et al.*, 2008). Zudem weist die PARP-ähnliche Domäne als einzige Domäne des ZAP Merkmale der positiven Selektion auf (Cagliani *et al.*, 2012; Kerns *et al.*, 2008). Generell sind solche Merkmale an den Aminosäuren innerhalb eines Wirtsproteins zu finden, die in direkter Interaktion mit viralen Proteinen stehen (Kerns *et al.*, 2008).

### 1.1.3 Das hZAP-L als Mitglied der PARP-Familie

Aufgrund seiner PARP-ähnlichen Domäne gehört hZAP-L der PARP-Familie an, die insgesamt 17 humane Mitglieder zählt (Otto *et al.*, 2005). Alternativ wird hZAP-L auch PARP13 genannt. PARPs sind Enzyme, die ADP-Ribose-Gruppen von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD<sup>+</sup>) als Donor posttranslational auf bestimmte Akzeptoraminosäuren ihrer Zielproteine übertragen und dadurch viele verschiedene nukleäre und zytoplasmatische Prozesse beeinflussen (Gibson & Kraus, 2012). PARPs und ADP-Ribosylierung sind u.a. beteiligt an verschiedenen zellulären Signalwegen, der zellulären Stress- und Immunantwort, Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zelltod, Proteindegradation sowie diversen nukleären Vorgängen (DNA-Reparatur, Chromatin- und Transkriptionsregulation, Telomer-Homöostase) (Gibson & Kraus, 2012; Hakmé *et al.*, 2008; Karlberg *et al.*, 2013).

Die PARP-ähnliche Domäne der PARPs wird durch drei konservierte Sequenzmotive, die jeweils von einem Aminosäure-Triplett gebildet werden (Triplettmotive), charakterisiert (Hottiger *et al.*, 2010; Otto *et al.*, 2005). Das erste und zweite Triplettmotiv, R/H-G-T/S und Y-X-X, sind an der NAD<sup>+</sup>-Bindung beteiligt, das dritte Triplettmotiv, X-X-E, enthält die für die Polymer-Elongation essenzielle, katalytisch aktive Glutaminsäure (Domenighini & Rappuoli, 1996; Hottiger *et al.*, 2010). Eine Aminosäure von jedem dieser drei Triplettmotive trägt zur Bildung eines charakteristischen Triadenmotivs der jeweiligen PARP bei. In Abhängigkeit von diesem Triadenmotiv lassen sich die PARP-Familienmitglieder in drei Subfamilien einteilen: (i) *bona fide*-PARPs mit dem Triadenmotiv HYE und katalytischer Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivität, (ii) PARPs ohne Glutaminsäure im Triadenmotiv mit Mono(ADP-Ribose)-Transferase-Aktivität, (iii) PARPs ohne Glutaminsäure und ohne Histidin im Triadenmotiv und daher katalytischer Inaktivität (Kleine *et al.*, 2008). hZAP-L besitzt das Triadenmotiv YYV und gehört daher zusammen mit PARP9 (QYT) zu der dritten, katalytisch inaktiven Subfamilie (Aguiar *et al.*, 2005; Kleine *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2011a). Es wird spekuliert, ob sich das Triadenmotiv des hZAP-L möglicherweise von dem typischen *bona fide*-Motiv wegentwickelt hat, um der Bindung durch virale Antagonisten zu entgehen (Kerns *et al.*, 2008). Neben der enzymatischen Einteilung können die verschiedenen PARPs auch basierend auf ihrer phylogenetischen Verwandtschaft, der Exon-Intron-Struktur der kodierenden Gene und/oder zusätzlich assoziierten Proteindomänen eingeteilt werden. Demzufolge bildet hZAP-L zusammen mit PARP7 und PARP12 die Subfamilie der CCCH-PARPs (Schreiber *et al.*, 2006).

Auch von anderen ZAP-Orthologen existiert eine kurze und eine lange Isoform mit einer PARP-ähnlichen Domäne (Charron *et al.*, 2013; Hottiger *et al.*, 2010; Kerns *et al.*, 2008). Dabei besitzt z.B. das ZAP-L der Maus (mZAP-L) das Triadenmotiv HYV und gehört somit zu der PARP-Subfamilie der Mono(ADP-Ribose)-Transferasen (Hottiger *et al.*, 2010; Kleine *et al.*, 2008). Unterschiede zwischen den verschiedenen ZAP-L-Orthologen v.a. bezüglich ihrer antiviralen Aktivität sind daher durchaus möglich.

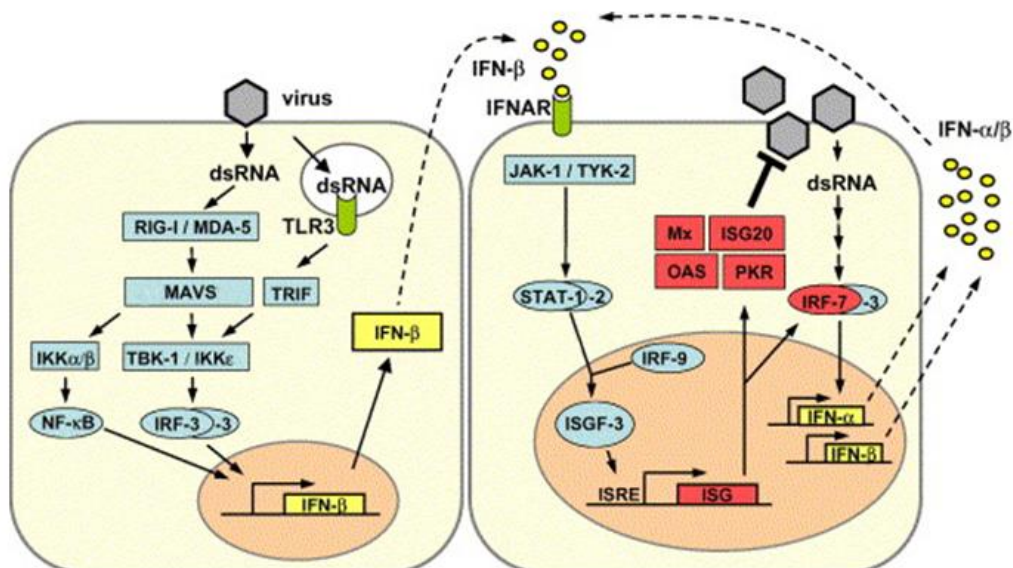
#### 1.1.4 ZAP und das Typ I Interferon-System

Viele antiviral wirksame Faktoren werden in Vertebratenzellen im Zuge einer Virusinfektion über die Interferon (IFN)-Signalwege des angeborenen Immunsystems induziert. Die wesentliche Rolle bei der viralen Abwehr spielen dabei die Typ I IFNs, IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$ , die infizierte sowie nicht-infizierte Zellen in einen antiviralen Status versetzen, um so die virale Replikation und weitere Verbreitung zu verhindern (Abb. 1.3) (Haller *et al.*, 2006).

Nach Eindringen in eine Zelle werden spezifische molekulare Strukturen eines Pathogens (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) von intrazellulären Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt (Janeway, 1989). Dabei erkennen und binden die RNA-Helikasen *retinoic acid inducible gene-1* (RIG-I) und *melanoma differentiation-associated gene-5* (MDA-5) virale doppelsträngige (ds) RNA-Strukturen im Zytosol und aktivieren über Signalkaskaden zum einen *interferon regulatory factor* (IRF)-3 und IRF-7, zum anderen *nuclear factor- $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) (Seth *et al.*, 2006; Yoneyama & Fujita, 2007). Diese translozieren anschließend als Transkriptionsfaktoren in den Kern und induzieren die Expression der Typ I IFNs (Pichlmair & Reis e Sousa, 2007; Seth *et al.*, 2006).

Die IFNs werden sekretiert und binden extrazellulär an Typ I IFN-Rezeptoren der Plasmamembran derselben, infizierten Zelle sowie an die Rezeptoren benachbarter, nicht-infizierter Zellen (Mogensen *et al.*, 1999; Samuel, 2001). Intrazellulär sind die Rezeptoren an den JAK-STAT-Signalweg gekoppelt, über den letztlich die Transkription zahlreicher, IFN-stimulierter Gene (*interferon stimulated genes*, ISGs) aktiviert wird (Darnell *et al.*, 1994). Viele der ISGs kodieren antivirale Effektorproteine, wie die *Myxovirus resistance* (Mx)-Proteine, Viperin, ISG20, die dsRNA-abhängige Proteinkinase R (PKR) oder die 2'-5'-Oligoadenylat-Synthetase (OAS), deren Expression die Zelle in einen antiviralen Status versetzt (Samuel, 2001; Schoggins & Rice, 2011). Die Mx-Proteine sind aktiv gegen diverse DNA- und RNA-Viren,

indem sie vermutlich die virale Replikation und Transkription verhindern (Mitchell *et al.*, 2013). Auch Viperin hemmt die virale Replikation eines breiten Virusspektrums über vielfältige molekulare Mechanismen (Seo *et al.*, 2011). Durch eine generelle Blockade der Translationsinitiation unterdrückt PKR die virale, aber auch die zelluläre Proteinsynthese (García *et al.*, 2007), während OAS die Transkription verhindert. Durch die Synthese von 2'-5'-Polyadenylat aktiviert OAS die latente Ribonuklease RNaseL, welche einzelsträngige virale sowie zelluläre RNA degradiert (Chakrabarti *et al.*, 2011). Dagegen weist die RNase ISG20 3'-5'-Exonukleaseaktivität spezifisch gegen einzelsträngige RNA verschiedener RNA-Viren auf (Espert *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2011).



**Abb. 1.3: Schema der zellulären Typ I IFN-Induktion, -Signaltransduktion und -Wirkung.** Links: Nach Viruseintritt liegt virale doppelsträngige RNA (dsRNA) im Zytoplasma bzw. nach endozytotischer Aufnahme in Endosomen der Wirtszelle vor. Zytosolische RIG-I-like Rezeptoren (RIG-I / MDA-5) bzw. endosomale Toll-like Rezeptoren (TLRs) erkennen die dsRNA und aktivieren über eine Signalkaskade die Expression von Typ I IFNs (hier IFN-β). Rechts: Neu synthetisierte IFNs werden sekretiert und binden an Typ I IFN-Rezeptoren (IFNARs) in der Plasmamembran. Durch Aktivierung und Signaltransduktion über den JAK-STAT-Signalweg wird die Expression IFN-stimulierter Gene (ISGs) und dadurch der antivirale Zellstatus induziert. Beispiele für induzierte antivirale Effektorproteine sind Mx, ISG20, OAS oder PKR. Abbildung verändert nach Haller *et al.* (2006).

Verschiedene Studien zeigen, dass auch ZAP als ISG durch Typ I IFNs reguliert wird (MacDonald *et al.*, 2007; Marcello *et al.*, 2006; Ryman *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2007). Neben der Regulation scheint auch die antivirale Aktivität des ZAP je nach Zelltyp IFN-abhängig zu sein. In Hamster-Nierenfibroblasten (BHK-21), die keine Typ I IFNs produzieren können, ist überexprimiertes rZAP lediglich nach IFN-Vorbehandlung antiviral

aktiv und offensichtlich auf die Aktivität eines oder mehrerer weiterer ISGs angewiesen (MacDonald *et al.*, 2007). In Maus-Fibroblasten (MEF), die einen funktionstüchtigen IFN-Signalweg besitzen, zeigen sowohl überexprimiertes rZAP wie auch endogenes mZAP zwar ISG-unabhängige antivirale Aktivität, die aber synergistisch durch ISG-Expression verstärkt wird (MacDonald *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Karki *et al.* (2012) konnten bereits einige ISGs als potenzielle Kandidaten, die die ZAP-Aktivität unterstützen, identifizieren, um diese nun in weiterführenden mechanistischen Studien tiefergehend zu untersuchen. In Ratten-Fibroblasten (Rat2) ist die rZAP-Aktivität ISG-unabhängig (MacDonald *et al.*, 2007).

Von den humanen Isoformen wird nur die Expression des hZAP-S durch IFN aufreguliert. Zudem verstärkt hZAP-S wiederum die Typ I IFN-Produktion, indem es als positiver Regulator direkt mit RIG-I interagiert. Im Gegensatz dazu ist hZAP-L nicht IFN-reguliert, sondern wird konstitutiv exprimiert. Die Expression der beiden hZAP-Isoformen wird also über unterschiedliche, bislang aber noch unbekannte Mechanismen kontrolliert (Hayakawa *et al.*, 2011). DeFilippis *et al.* (2006) und Wang *et al.* (2010a) zeigten, dass die hZAP-Expression auch direkt durch IRF-3 induzierbar ist, sobald IRF-3 im Zuge einer Virusinfektion aktiviert wird. Allerdings wurde in beiden Studien nicht zwischen den zwei humanen Isoformen differenziert, sondern hZAP-L und hZAP-S zusammen untersucht. Die hZAP-Induktion erfolgt dabei unabhängig von NFκB oder dem IFN-Signalweg über direkte IRF-3-Bindung an den *ZC3HAV1*-Promotor (Wang *et al.*, 2010a). Die IRF-3-vermittelte Induktion des hZAP geschieht zu einem frühen Zeitpunkt der Virusinfektion, noch bevor die IFN-vermittelte Induktion in Kraft tritt, und sorgt so vermutlich für einen schnelleren und potenteren antiviralen Effekt in der Zelle (Karki *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010a).

ZAP gehört zu den antiviralen Restriktionsfaktoren des intrinsischen Immunsystems (Kerns *et al.*, 2008). Das intrinsische Immunsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems, dessen Effektoren die Virusreplikation bei Erkennung spezifischer viraler Komponenten unmittelbar und direkt inhibieren, bereits vor dem Einsetzen der initiierten IFN-Antwort (Yan & Chen, 2012). In bestimmten Zelltypen sind die intrinsischen Immunproteine meist schon vorhanden, werden aber oft im Zuge einer Virusinfektion noch weiter induziert, um die antivirale Aktivität zu verstärken (Yan & Chen, 2012).

Viele Viren haben antagonistische Proteine und Strategien entwickelt, um die antivirale Zellantwort zu unterdrücken oder dieser zu entgehen. Die Antagonisten können gegen die IFN-Induktion, IFN-Signaltransduktion oder die Aktivität der antiviralen Effektoren gerichtet

sein (Haller *et al.*, 2006; 2007). Einige Viren induzieren auch eine generelle Hemmung der zellulären Transkription (*host shutoff*), um die antivirale Wirtsantwort zu verhindern (Billecocq *et al.*, 2004; Garmashova *et al.*, 2007b; Thomas *et al.*, 2004).

## 1.2 Alphaviren

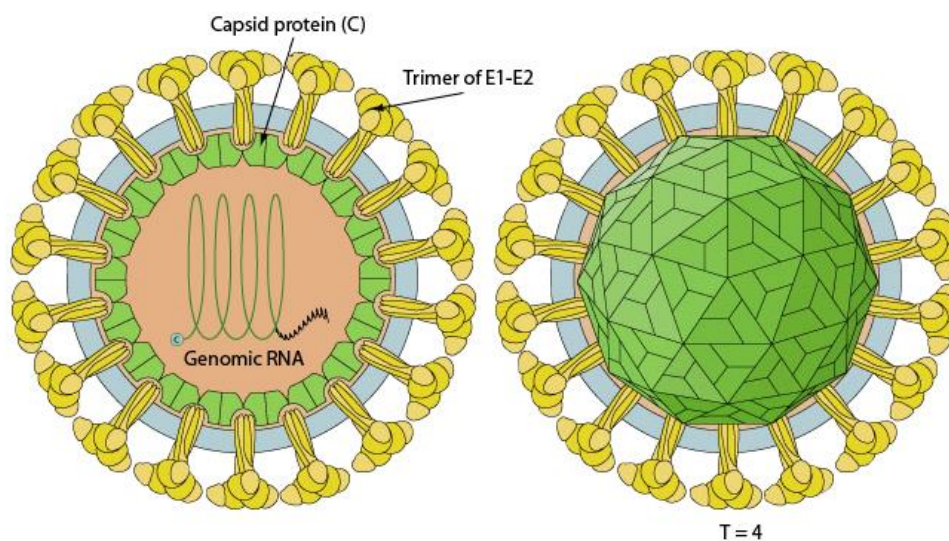
Zu den von ZAP gehemmten Viren gehören auch verschiedene Vertreter der Alphaviren (Bick *et al.*, 2003; Kerns *et al.*, 2008). Das Genus *Alphavirus* umfasst 30 bisher bekannte Spezies und gehört zusammen mit dem Genus *Rubivirus* zu der Familie *Togaviridae* (King *et al.*, 2012; Strauss & Strauss, 1994). Alphaviren sind tierpathogene Viren mit einem sehr breiten Wirtsspektrum, das sowohl Invertebraten (mit hauptsächlich Stechmücken aber auch anderen blutsaugenden Insekten als Übertragungsvektoren) als auch Vertebraten (darunter viele Vogel- und Säugetierarten) einschließt (Strauss & Strauss, 1994). Die Übertragung auf den Menschen erfolgt durch Stechmücken meist mit der Folge von Epidemien, die mit einem urbanen Transmissionszyklus (Mensch-Mücke-Mensch) verbunden sind (Suhrbier *et al.*, 2012).

Basierend auf ihrer geografischen Verbreitung werden Alphaviren in die Kategorien Altwelt- und Neuwelt-Alphaviren eingeteilt (Strauss & Strauss, 1994). Zu den Altweltviren gehören Vertreter wie das Barmah-Forest-Virus (BFV), Chikungunya-Virus (CHIKV), O'nyong-nyong-Virus (ONNV), Ross-River-Virus (RRV), Sindbis-Virus (SINV) und SFV. Die verursachten Infektionen verlaufen nur sehr selten tödlich und äußern sich durch Symptome wie Fieber, Gelenkschmerzen und Hautausschlag, selten auch Enzephalitis (Gould *et al.*, 2010). Neuwelt-Alphaviren wie das Eastern-Equine-Encephalitis-Virus (EEEV), Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus (VEEV) und Western-Equine-Encephalitis-Virus (WEEV) verursachen typischerweise Enzephalitis bei Menschen, Pferden und anderen Säugetieren, die vor allem bei Pferden meist tödlich verläuft (Gould *et al.*, 2010).

Bisher existieren für den Menschen keine zugelassenen Impfstoffe oder effektive Behandlungsmöglichkeiten gegen alphavirale Infektionen (Suhrbier *et al.*, 2012). Die endemischen Infektionen (z.B. RRV und BFV in Australien), vor allem aber große epidemische Ausbrüche (z.B. CHIKV in der Region des Indischen Ozeans zwischen 2004 - 2010) verdeutlichen dabei die Wichtigkeit der Alphavirus-Forschung (Schwartz & Albert, 2010; Suhrbier *et al.*, 2012).

### 1.2.1 Virionstruktur und Genomaufbau

Alphaviren bilden behüllte, kugelförmige Virionen mit einem Durchmesser von ca. 70 nm. In die Virushülle eingelagert sind 80 *spike*-ähnliche Strukturen, die aus Trimeren der beiden heterodimerisierten viralen Glykoproteine E1 und E2 bestehen (Abb. 1.4). Die Glykoproteine stehen in Kontakt mit dem eingeschlossenen Nukleocapsid, das aus 240 ikosaedrisch angeordneten (T = 4) Capsid (C)-Proteinen zusammengesetzt ist (Leung *et al.*, 2011b; Strauss & Strauss, 1994).

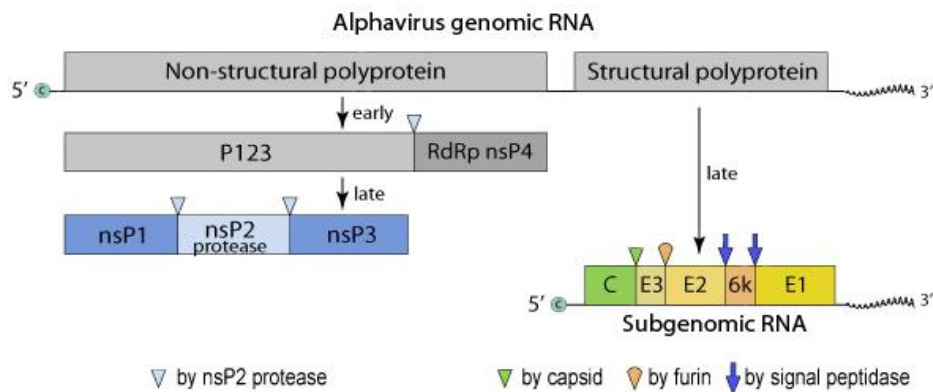


**Abb. 1.4: Schema des alphaviralen Virions.** Im Inneren des Virions befindet sich das alphavirale RNA-Genom umgeben von dem Nukleocapsid (beides grün). Das Nukleocapsid wird in einer ikosaedrischen Struktur von 240 Capsid (C)-Proteinen (T = 4) aufgebaut. Umgeben ist das Virion von einer Virushülle (hellblau), in die 80 Trimere der heterodimerisierten Glykoproteine E1 und E2 (gelb) als *spike*-ähnliche Strukturen eingelagert sind. Der Durchmesser eines Virions beträgt ca. 70 nm. Abbildung nach [www.expasy.org/viralzone/](http://www.expasy.org/viralzone/) (Hulo *et al.*, 2011).

Innerhalb des Nukleocapsids befindet sich das einzelsträngige, positiv-orientierte RNA-Genom der Alphaviren, das ca. 12 kb umfasst (Strauss *et al.*, 1984). Die RNA besitzt eine 5'-Cap-Struktur, einen 3'-Poly(A)-Schwanz und zwei große offene Leserahmen (*open reading frames*, ORFs) (Abb. 1.5) (Leung *et al.*, 2011b). Der 5'-ORF kodiert die Nichtstrukturproteine (nsPs), die den Replikationskomplex bilden, und der 3'-ORF die Strukturproteine (sPs) des Virions (Strauss & Strauss, 1994). Während die nsPs direkt von der genomischen RNA als Polyprotein translatiert werden, wird das Polyprotein der sPs über eine subgenomische RNA exprimiert. Die subgenomische RNA wird im Infektionsverlauf von dem subgenomischen Promotor eines Negativstrang-RNA-Intermediats synthetisiert (Ou *et al.*, 1982; Strauss & Strauss, 1994).



Beide Polyproteine werden von Virus- und Wirtsproteasen über einige Zwischenprodukte zu den nsPs nsP1 - 4 bzw. den sPs C, E3, E2, 6K und E1 gespalten (Hardy & Strauss, 1989; Melancon & Garoff, 1987).



**Abb. 1.5: Alphavirus Genom und Genexpression.** Das positiv-orientierte, einzelsträngige RNA-Genom der Alphaviren besitzt eine 5'-Cap- und 3'-Poly(A)-Struktur sowie zwei große offene Leserahmen (ORFs). Von dem 5'-ORF wird das Nichtstrukturpolyprotein translatiert, von dem 3'-ORF nach Transkription der subgenomischen RNA das Strukturpolyprotein. Frühe und späte Prozessierungsschritte beider Polyproteine durch Proteasen sind entsprechend gekennzeichnet. nsP = Nichtstrukturprotein, P123 = Polyprotein aus nsP1 - 3, RdRP = RNA-abhängige RNA-Polymerase, C = Capsid-Protein. Abbildung nach [www.expasy.org/viralzone/](http://www.expasy.org/viralzone/) (Hulo *et al.*, 2011).

## 1.2.2 Virusproteine

Das nsP1 der Alphaviren besitzt Methyl-/Guanylyl-Transferase-Aktivität zum *Capping* neu-synthetisierter viraler genomischer und subgenomischer RNAs (Ahola & Kääriäinen, 1995; Mi *et al.*, 1989). Zudem verankert es vermutlich während der RNA-Replikation die Replikationskomplexe an zellulären Membranen (Peränen *et al.*, 1995). Neben Phosphatase- und Helikase-Aktivitäten während der Replikation und Transkription ist das nsP2 vor allem als Protease für die proteolytische Prozessierung des Nichtstrukturpolyproteins tätig (Gómez de Cedrón *et al.*, 1999; Hardy & Strauss, 1989; Rikkonen *et al.*, 1994; Vasiljeva *et al.*, 2000). Über das nsP3 ist im Vergleich zu den übrigen alphaviralen Proteinen am wenigsten bekannt. Den N-Terminus des nsP3 bildet eine evolutionär hoch konservierte Makrodomäne (Gorbalenya *et al.*, 1991; Pehrson & Fujii, 1998), die in Abschnitt 1.2.5 eingehender beschrieben wird. Im Gegensatz zu dem N-Terminus ist die C-terminale Region des alphaviralen nsP3 variabel in ihrer Länge und Sequenz und zudem stark phosphoryliert (Strauss & Strauss, 1994; Vihinen & Saarinen, 2000). Vermutlich ist diese Region an einer

effektiven viralen RNA-Synthese beteiligt (Varjak *et al.*, 2010; Vihinen *et al.*, 2001). Das nsP4 repräsentiert die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase (*RNA-dependent RNA-polymerase*, RdRP) mit dem charakteristischen und katalytisch essenziellen GDD-Motiv in der C-terminalen Proteinsequenz (Kamer & Argos, 1984; Tomar *et al.*, 2006).

Das C-Protein bindet die virale genomische RNA und dient zum Aufbau des Nukleocapsids (Owen & Kuhn, 1996; Weiss *et al.*, 1989). Für das E3 kann keine eindeutige Funktion definiert werden, da diese zwischen verschiedenen Alphaviren zu variieren scheint (Leung *et al.*, 2011b). Vermutlich ist das E3 an der Bildung der Viruspartikel beteiligt, indem es u.a. für die korrekte Faltung der Hüllproteine sorgt (Jose *et al.*, 2009). Das Glykoprotein E2 vermittelt, eingebettet in die Virushülle, die Bindung des Virions an den Rezeptor der Wirtszelle und die anschließende endozytotische Virusaufnahme (Jose *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 1995). Das 6 kDa große Strukturprotein 6K ist wichtig für den Aufbau der Viruspartikel und auch innerhalb dieser in kleinen Mengen aufzufinden (Gaedigk-Nitschko & Schlesinger, 1990; Ivanova *et al.*, 1995). Außerdem beeinflusst 6K als porenbildendes Ionenkanalprotein (Viroporin) die Permeabilität der Wirtszellmembran (Gonzalez & Carrasco, 2003; Melton *et al.*, 2002; Sanz *et al.*, 1994). Das Hüllprotein E1 ist für die pH-abhängige Fusion der viralen mit der endosomalen Membran verantwortlich (Omar & Koblet, 1988).

### 1.2.3 Lebenszyklus

Alphaviren dringen nach der Adsorption an Rezeptoren der Zelloberfläche über Rezeptorvermittelte Endozytose in die Wirtszelle ein (Abb. 1.6) (Kielian *et al.*, 2010). Durch die pH-abhängige Fusion der Virushülle mit der endosomalen Membran wird das virale Nukleocapsid und das virale Genom in das Zytoplasma entlassen (Kielian *et al.*, 2010). Dort wird direkt die Translation der nsPs als Polyprotein P1234 eingeleitet (Jose *et al.*, 2009). Nach Abspaltung des nsP4 von dem Polyprotein bilden diese zusammen den frühen P123-nsP4-Replikationskomplex, der die intermediäre Negativstrang-RNA synthetisiert. Sobald das verbleibende P123-Polyprotein vollständig prozessiert ist, gruppieren sich die einzelnen nsPs (nsP1 - 4) zu dem späten Replikationskomplex. Dieser synthetisiert die positiv-orientierte genomische und subgenomische RNA anhand der Negativstrang-RNA als Matritze (Jose *et al.*, 2009; Lemm *et al.*, 1994; Shirako & Strauss, 1994).



2009; Schwartz & Albert, 2010). An der Plasmamembran führt schließlich die Interaktion der membranintegralen Glykoproteine E1 und v.a. E2 mit dem Nukleocapsid zu dem Zusammenbau der Viruspartikel (Garoff *et al.*, 2004; Owen & Kuhn, 1997). Ihre Hülle mit den integrierten Glykoproteinen erhalten die Partikel während des Knospungsvorganges von der zellulären Plasmamembran und werden anschließend als reife Virionen in den Extrazellularraum entlassen (Garoff *et al.*, 2004; Jose *et al.*, 2009).

#### **1.2.4 Antagonismus gegen die antivirale Wirtszellantwort**

Um der induzierten antiviralen Wirtszellantwort auszuweichen, unterdrücken Alphaviren im Infektionsverlauf die Transkription der Wirtszelle (*host shutoff*), ohne dass dabei die virale Protein- und Nukleinsäure-Synthese beeinträchtigt wird (Garmashova *et al.*, 2007b; Patel *et al.*, 2013). Neuwelt-Alphaviren blockieren die Wirtstranskription über ihr C-Protein (Aguilar *et al.*, 2007; Garmashova *et al.*, 2007a). Das C-Protein bildet einen Komplex mit dem Importrezeptor Importin- $\alpha/\beta$  und dem Exportrezeptor CRM1 der Kernpore und verhindert so den Kerntransport, wodurch der *host shutoff* initiiert und die zelluläre Transkription inhibiert wird (Atasheva *et al.*, 2010; Atasheva *et al.*, 2008). Altwelt-Alphaviren vermitteln die Transkriptionsblockade über ihr nsP2 (Garmashova *et al.*, 2006; Gorchakov *et al.*, 2005). Das nsP2 transloziert in den Kern, wo es die Degradation einer katalytischen Untereinheit der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II (RNAP II) induziert und so mit der Funktion der RNAP II auch die gesamte zelluläre Transkription unterdrückt (Akhrymuk *et al.*, 2012). Zusätzlich wurde für das Altweltvirus-nsP2 eine Blockadefunktion der Wirtstranslation vermutet (Gorchakov *et al.*, 2005). Allerdings scheint die Translation vielmehr über einen nsP2-unabhängigen Mechanismus durch die Translationseffizienz und das Level der viralen subgenomischen RNA, die mit zellulären mRNAs um limitierte, aber translational essenzielle Faktoren konkurriert, gehemmt zu werden (Patel *et al.*, 2013). Zusammen mit dem *shutoff* der Wirtstranskription und -translation geht typischerweise ein zytopathischer Effekt (*cytopathic effect*, CPE) mit dem Tod der infizierten Wirtszelle einher (Garmashova *et al.*, 2007b).

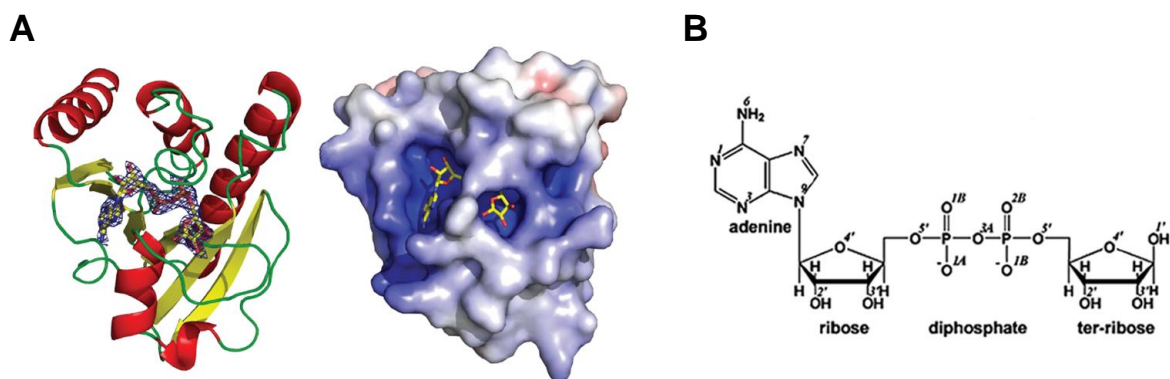
### 1.2.5 Die Makrodomäne des nsP3

Neben dem *host shutoff* als generelle Schutzmaßnahme vor der antiviralen Wirtsantwort wird gemutmaßt, dass die virale Makrodomäne einen spezifischen Antagonisten gegen die Aktivität des antiviralen Effektorproteins ZAP-L darstellt (Egloff *et al.*, 2006; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009).

Die Makrodomäne ist eine evolutionär hoch konservierte, globuläre Proteindomäne, die in vielen prokaryotischen und eukaryotischen Proteinen sowie in bestimmten Nichtstrukturproteinen der Positivstrang-RNA-Virusfamilien *Togaviridae*, *Hepeviridae* und *Coronaviridae* zu finden ist (Allen *et al.*, 2003; Gorbalenya *et al.*, 1991; Koonin *et al.*, 1992). Bei den Alphaviren umfasst die Makrodomäne die N-terminalen 160 Aminosäuren des nsP3 (Malet *et al.*, 2009). Die Analyse der Kristallstrukturen verschiedener Makrodomänen zeigt eine charakteristische  $\alpha/\beta$ -Faltung der Sekundärstruktur, die bei Alphaviren aus sechs zentralen  $\beta$ -Faltblättern umgeben von insgesamt vier  $\alpha$ -Helices besteht (Abb. 1.7A). Typischerweise bilden hoch konservierte Aminosäuren eine positiv geladene Liganden-Bindungstasche für verschiedene  $\text{NAD}^+$ -Metabolite an der Oberfläche der Domäne (Allen *et al.*, 2003; Egloff *et al.*, 2006; Karras *et al.*, 2005; Kumaran *et al.*, 2005; Kustatscher *et al.*, 2005; Malet *et al.*, 2009; Wojdyla *et al.*, 2009). Zunächst wurde die Bindungstasche als aktives Zentrum mit enzymatischer ADP-Ribose-1''-Phosphatase (Appr-1''-pase)-Aktivität definiert (Kumaran *et al.*, 2005; Putics *et al.*, 2005). Jedoch weisen die alphaviralen wie die meisten Makrodomänen dabei höchstens mäßige Reaktionsgeschwindigkeiten auf (Egloff *et al.*, 2006; Malet *et al.*, 2009; Neuvonen & Ahola, 2009). Vielmehr wurde die Makrodomäne als Bindemodul für ADP-Ribose und/oder Poly(ADP-Ribose) identifiziert (Abb. 1.7) (Egloff *et al.*, 2006; Karras *et al.*, 2005). Bei Alphaviren wird die Bindung von ADP-Ribose hauptsächlich über die Aminosäure D10 (bei SINV N10) innerhalb der Liganden-Bindungstasche vermittelt, während die Polymer-Bindung sequenzunabhängig über positive Reste außerhalb der Bindungstasche erfolgt (Malet *et al.*, 2009). Die Affinität zu ADP-Ribose variiert zwischen den Makrodomänen verschiedener Alphaviren, VEEV und CHIKV zeigen deutliche, SFV hingegen keine detektierbare Ligandenbindung (Malet *et al.*, 2009; Neuvonen & Ahola, 2009).

Die physiologische Funktion der viralen Makrodomäne ist bislang unbekannt, sie beeinflusst aber offenbar die Viruspathogenität in infizierten Zellen (Eriksson *et al.*, 2008; Park & Griffin, 2009b; Tuittila & Hinkkanen, 2003; Tuittila *et al.*, 2000). Auch die Funktionsweise als potenzieller ZAP-gerichteter Antagonist ist noch nicht weiter erforscht. Möglicherweise

könnte die Makrodomäne ZAP-L über den gemeinsamen Liganden ADP-Ribose sequestrieren (Egloff *et al.*, 2006; Kerns *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009) oder ZAP-L inaktivieren und so von der Ausübung seiner antiviralen Funktion abhalten (Zhu & Gao, 2008). Im Einklang dazu wurde bei Makrodomänen kürzlich ADP-Ribosyl-Hydrolase-Aktivität identifiziert (Jankevicius *et al.*, 2013; Rosenthal *et al.*, 2013; Sharifi *et al.*, 2013; Steffen & Pascal, 2013). Ob die bei ZAP-L detektierte, ausgeprägte ADP-Ribosylierung (Leung *et al.*, 2011a) aber für dessen antivirale Aktivität erforderlich ist, wurde bislang noch nicht untersucht.



**Abb. 1.7: CHIKV Makrodomäne mit ADP-Ribose.** (A) Dargestellt ist links die Sekundärstruktur der CHIKV Makrodomäne mit den vier  $\alpha$ -Helices (rot) und sechs  $\beta$ -Faltblättern (gelb) komplexiert mit ADP-Ribose. Ein elektrostatisches Oberflächenmodell der CHIKV Makrodomäne mit in der Liganden-Bindungstasche gebundener ADP-Ribose ist rechts gezeigt. Abbildung nach Malet *et al.* (2009). (B) Chemische Strukturformel von ADP-Ribose bestehend aus Adenosindiphosphat (Adenin, Ribose, Diphosphat) und distaler (ter-)Ribose. Abbildung nach Rungrotmongkol *et al.* (2010).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

ZAP wurde als antiviraler Wirtsfaktor mit inhibitorischer Aktivität gegen verschiedene Viren identifiziert, der die Degradation viraler RNA veranlasst und die virale Translation hemmen kann. Während bisher vornehmlich rZAP untersucht wurde, sollte in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf die antivirale Aktivität des hZAP gelegt werden.

Dazu sollte das Potenzial des hZAP gegen verschiedene humanpathogene Alphaviren ermittelt werden und dabei die Aktivität der beiden Isoformen hZAP-L und hZAP-S miteinander verglichen werden. Neben Untersuchungen im Überexpressionssystem sollte auch die Wirksamkeit des endogenen hZAP-L analysiert werden.

Zudem sollten potenzielle zelluläre und virale Faktoren, die die Spezifität des hZAP und die virale Sensitivität gegenüber der hZAP-vermittelten Hemmung beeinflussen, charakterisiert

werden. Vor allem die Bedeutung der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L für dessen antivirale Aktivität und die Funktion der alphaviralen Makrodomäne als potenzieller Antagonist gegen hZAP-L waren hierbei von Interesse. Ein möglicher Zusammenhang des Antagonismus mit der Eigenschaft ADP-Ribose zu binden, sollte durch die Messung der ADP-Ribose-Affinität einzelner alphaviraler Makrodomänen untersucht werden.

Ferner sollte überprüft werden, ob hZAP-L, das trotz autokatalytischer Inaktivität stark ADP-ribosyliert ist, möglicherweise von anderen Mitgliedern der PARP-Familie transribosyliert werden kann.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zelllinien

BHK-J	Fibroblastenzelllinie aus Nierenzellen des Syrischen Goldhamsters, Derivat parentaler BHK-21 Zellen durch Passagierung; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, USA)
Flp-In™ T-REx™-293	Humane embryonale Nierenzelllinie, Derivat parentaler HEK-293 Zellen, genetisch verändert für das Flp-In™ T-REx™-System; Ausgangszelllinie der generierten hZAP-Expressionszelllinien; Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)

#### 2.1.2 Viren

Virus	RG	Bezugsquelle
Barmah-Forest-Virus (BFV)	2	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Chikungunya-Virus (CHIKV)	3	Infektiöser cDNA-Klon (Abschnitt 2.1.4)
Eastern-Equine-Encephalitis-Virus (EEEV)	3	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Modifiziertes Vacciniavirus Ankara (MVA-T7)	1	Gerd Sutter (LMU, München)
O'nyong-nyong-Virus (ONNV)	2	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Ross-River-Virus (RRV)	2	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Semliki-Forest-Virus (SFV)	2	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Sindbis-Virus (SINV)	2	Infektiöser cDNA-Klon (Abschnitt 2.1.4)
Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus (VEEV)	3	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)
Western-Equine-Encephalitis-Virus (WEEV)	3	Bernhard-Nocht-Institut (Hamburg)

RG = Risikogruppe, Handhabung in einem Labor entsprechender biologischer Schutzstufe

#### 2.1.3 Bakterien

<i>E. coli</i> BL21-(DE3)-R2-pRARE2	Bakterienstamm für die Proteinexpression; Besitzt Chloramphenicol-Resistenzgen und exprimiert T7-RNA-Polymerase (Burgess-Brown <i>et al.</i> , 2008); Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Opher Gileadi (University of Oxford, Oxford, UK)
<i>E. coli</i> MC1061	Bakterienstamm zur Plasmidamplifikation; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, USA)



### 2.1.4 Plasmide

cDNA-Klon DKFZp686H1869Q2	RZPD cDNA-Klon mit hZAP-Sequenzen; Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH (Berlin)
pCAGGS	Expressionsvektor mit CMV-Promotor und Ampicillin-Resistenzgen; BCCM/LMBP (Ghent University, Gent, Belgien)
pcDNA™5/FRT/TO	Expressionsvektor des Flp-In™ T-REx™ Systems mit CMV/TetO <sub>2</sub> -Promotor zur induzierbaren Zielgen-Expression, einem FRT-Element sowie den Genen für Ampicillin- (Bakterien) und Hygromycin-Resistenz (Flp-In T-REx-Zellen); Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)
pCHIKV-M	Infektiöser cDNA-Klon des CHIKV (FJ959103); cDNA unter T7-Promotor-Kontrolle in pSMART-LCKan Vektorrückgrat mit Kanamycin-Resistenzgen (Kümmerer <i>et al.</i> , 2012); Beate Kümmerer (Institut für Virologie, Bonn)
pCHIKV-M-2SG-FLuc	Variante des pCHIKV-M mit <i>Firefly</i> Luciferase-Gen <i>luc2</i> unter Kontrolle eines duplizierten subgenomischen Promotors (Vgl. LR2006-OPY1-FLuc, Teo <i>et al.</i> (2013))
pCITE-2a(+)	Expressionsvektor mit T7-Promoter und Ampicillin-Resistenzgen; Novagen / Merck Millipore (Darmstadt)
pCITE-2a-HA	Variante des pCITE-2a(+) Vektors mit über <i>Bam</i> HI und <i>Not</i> I integrierter HA-Tag-Sequenz; Beate Kümmerer (Institut für Virologie, Bonn)
phRL-CMV	Expressions- und Reportervektor mit <i>Renilla</i> Luciferase (RLuc)-Sequenz unter T7-Promotor-Kontrolle; Ampicillin-Resistenzgen; Promega (Mannheim)
phZAP-L-FLAG	Sequenz des hZAP-L mit C-terminalem 3-fach FLAG-Tag in pCITE-2a(+) Vektorrückgrat; Maren Töller (Institut für Virologie, Bonn)
pMakro-HA	Sequenz der CHIKV Makrodomäne mit C-terminalem HA-Tag in pCITE-2a(+) Vektorrückgrat; Maren Töller (Institut für Virologie, Bonn)
pNIC28-Bsa4	Prokaryotischer Expressionsvektor mit T7-Promotor, Kanamycin-Resistenzgen und LIC-Klonierungselementen; Expression der inserierten Sequenz als Fusionsprotein mit N-terminalem Hexahistidin-Tag; Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Opher Gileadi (University of Oxford, Oxford, UK)
pnsP3-HA	Sequenz des CHIKV nsP3 mit C-terminalem HA-Tag in pCITE-2a(+) Vektorrückgrat; Maren Töller (Institut für Virologie, Bonn)
pOG44	Flp-Rekombinase-kodierendes Expressionsplasmid; Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)
pTOTO 1101	Infektiöser cDNA-Klon des SINV; cDNA unter SP6-Promotor-Kontrolle in pBR322 Vektorrückgrat mit Ampicillin-Resistenzgen (Rice <i>et al.</i> , 1987); Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, USA)
pACNR/FLYF-17Dx	Infektiöser cDNA-Klon des YFV (17D), (Bredenbeek <i>et al.</i> , 2003); Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Charles M. Rice (Rockefeller University, New York, USA)

## 2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer und Sonden wurden von den Firmen Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bzw. biomers.net GmbH (Ulm) synthetisiert. Die siRNAs wurden von der Firma Ambion / Life Technologies (Darmstadt) bezogen. Die Sequenz aller Oligonukleotide ist in 5'-3'-Richtung angegeben. Primer mit sense-Orientierung sind mit F (*forward*), Primer in antisense-Orientierung mit R (*reverse*) und Sonden mit P (*probe*) benannt.

### 2.1.5.1 Klonierungsprimer

Primer	5'-3'-Sequenz
BNI361 hZAP NcoI F	CATGCCATGGCGACCCGGAGGTGTGC
BNI369 hZAP-S BamHI R	CGGGATCCCTCTGGCCCTCTTTCATCTG
Bo46 KpnI-hZAP F	GGGTACCGTCATGGCGACCCGGAGGTGTGCTGC
Bo47 HA-Stop-NotI R	ATAGTTTAGCGGCCGCTACGCGTAGTCCGGGACGTCGTAC
Bo80 hZAPBamS R	CGGGATCCACTAATCACGCAGGCTTTGTCTTC
Bo240 hZAP-1351 F	AGCAGCGGTCACAGAGAAAT
Bo245 hZAP-L Y819A F	GAAAAGGAATTgcgTTTGCAAAGA
Bo246 hZAP-L Y819A R	TCTTTTGAAAcgcAATTCCTTTTC
Bo247 hZAP-L V876A F	CGAATCCCTCCGccTTTGTCTCTT
Bo248 hZAP-L V876A R	AAGATGACAAAaggCGGAGGGATTTCG
Bo249 hZAP-L V876E F	CGAATCCCTCCGaaTTTGTCTCTT
Bo250 hZAP-L V876E R	AAGATGACAAAatCGGAGGGATTTCG
Bo251 pcDNA5 R	GCGATGCAATTCCTCATT
Bo259 hZAP-L Y787A F	AAACTCCTATTTgccGCGACAAGCCG
Bo260 hZAP-L Y787A R	CGGCTTGTCGcgAAATAGGAGTTT
Bo272 SIN V N24A F	GTCAACGCAGCCgccCCGCTGGGTAGA
Bo273 SIN V N24A R	TCTACCCAGCGggcGGCTGCGTTGAC
Bo276 SIN V Y114A F	TCTACAGGCATTgccGCAGCCGGAAAA
Bo277 SIN V Y114A R	TTTTCCGGCTGcgAAATGCCTGTAGA
Bo278 SIN V 2202 F	GTCCCGTACAAGGTCGAAAC
Bo279 SIN V 5349 R	GAATAGGGGCAGGCTCTTG
Bo305 CHIKV D10A F	GTA AACGCATGcgATCGGAAGAAC
Bo306 CHIKV D10A R	GTTCTTCGCGATcgCATGCGTTTTAC
Bo307 SIN V N10A F	ACCAAAGGGAGcgATTGCTGACTGT
Bo308 SIN V N10A R	ACAGTCAGCAATcgCTCCCTTTTGGT
Bo334 SIN V N10D F	ACCAAAGGGAGgacATTGCTGACTGT
Bo335 SIN V N10D R	ACAGTCAGCAATgtcCTCCCTTTTGGT
Bo338 CHIKV D10N F	GTA AACGCATGaacATCGGAAGAAC
Bo339 CHIKV D10N R	GTTCTTCGCGATggtCATGCGTTTTAC
Bo346 Chik ns3 NdeI F	GGAATTCATATGGCACCGTCTACCGGGTAAAACGC
Bo348 Chik 31-160 Bam R	CGGGATCCGGTCCGCATCTGTATGGCCTCAGAT
Bo393 HA-Stop-NotI R	TAGTTTAGCGCCGCTAAGCGTAGTCTGGGACATCGTAAGG
Bo409 CHIKV AgeI R	GACTTCCTCCAGGGTGTTACC
Bo421 CHIKV GAA F	CCGCGTGCGCGCCTTCATCgcagcgggAACATAATACATGGAGTCG
Bo422 CHIKV GAA R	CGACTCCATGTATTATGTTaccgctgcGATGAAGGCCGCGCACGCGG

Bo423 ZAP-YA(787/8)HG F	AAGAAGGAAAACCTCTATTTcAcGgtACAAGCCGTGCCTATGTGG
Bo424 ZAP-YA(787/8)HG R	CCACATAGGCACGGCTTGTacCgTgAAATAGGAGTTTTCTTCTTC
Bo425 CHIKV- <i>RLuc</i> F	CAACGAAGGAGAAATCGAAAGCTTGATGGCTTCCAAGGTGTACGACCCCG
Bo426 CHIKV- <i>RLuc</i> R	CGGGTTCGTACACCTTGAAGCCATCAAGCTTTTCGATTTCTCCTTCGTTG
Bo427 <i>RLuc</i> -CHIKV F	GTGCTGAAGAACGAGCAGGAGTCACTATCTTCTGAGCTACTAACTTCGG
Bo428 <i>RLuc</i> -CHIKV R	CCGAAAGTTAGTAGCTCAGAAGATAGTGACTCTGCTCGTTCTTCAGCAC
Bo478 EcoRI-CHIKVnsP3 F	GGAAATTCGCTATGGCACCGTCGTACCGGGTAAAACG
Bo506 CHIKnsP3-BamHI R	CGGGATCCTAACTCGTCGTCGGTGTCTGAGC
Bo543 SpeI-CHIKnsP3 5' F	GACTAGTGCACCGTCGTACCGGGTAAAACG
Bo544 HA-SpeI R	GACTAGTCGCGTAGTCCGGGACGTCTGACG
Bo545 NdeI-CHIKΔmacro F	GGAATTCATATGCAAGTAGAGCTGCTGGATGAGCA
Bo557 Avr-SINV M F	CAGCTACCTAGGCCACC ACCCGTCTGTTTGGATC
Bo558 SINV M-Pme R	CCGGCGCGCCGTTTAAACTTATAGGTAGATGGGTGGATG
Bo559 Avr-SINV N F	CAGCTACCTAGGCCACC GATCACCTATCCGAAACC
Bo560 SINV N-Pme R	CCGGCGCGCCGTTTAAACTTAGGTTCTGCGGCTTGATC
Bo621 Avr-YFV 9325 F	CAGCTACCTAGGCCACC AAAACTGGCACAAGCAGT
Bo622 YFV 10714-Pme R	CCGGCGCGCCGTTTAAACTTACTCTAGACCCCGTCTTTC
ChikAsn41Ala F	CGTAGTCAACGCCGCTgcCCCTCGCGGGTTACCG
ChikAsn41Ala R	CGGTAACCCGCGAGGGgcAGCGGCGTTGACTACG
ChikTyr133Ala F	CAGGTGTAgcCTCAGGAGGGAAAGACAGGCTGAC
ChikTyr133Ala R	CCCTCTGAGgcTACACCTGTGGAGAGGAGAG
CHIKV 3131 F	GGCATCTGCAGTCACCAAATG
CHIKV 5009 F	TGACCACAACGTGCCATCGCG
CHIKV 5590 F	AGACTTCTTACCAGGAGAAGTG
CHIKV 5621 R	CTCGTCGTCGGTGTCTGAGCAC
CHIKV 8512 R	GAAGTTGTCTTGGTGCTGC

Kleinbuchstaben = ausgetauschte Nukleotide; Unterstrichen = integrierte Restriktionsschnittstellen

### 2.1.5.2 LIC-Klonierungsprimer

Primer	5'-3'-Sequenz
Bo374 CHIKV X-D F	<i>TACTTCCAATCC</i> ATGGCACCGTCGTACCGGGTAAAACG
Bo375 CHIKV X-D R	TATCCACCTTTACTG TTAGGTCCGCATCTGTATGGCCTCAG
Bo376 SINV X-D F	<i>TACTTCCAATCC</i> ATGGCGCCGTCATACCGCACCAAAGG
Bo377 SINV X-D R	TATCCACCTTTACTG TTA <sup>c</sup> CTTAAAGTTGGAGTGCCGCGTC
Bo394 ONNV X-D F	<i>TACTTCCAATCC</i> ATGGCCCGTCATACCGAGTGAACG
Bo395 ONNV X-D R	TATCCACCTTTACTG TTAGGATCTTAGTGATATGGCTTCAG
Bo662 PARP_neu F	<i>TACTTCCAATCC</i> ATGCCTCAGGAGGACTTTTGCTTCTAT
Bo663 PARP_neu R	TATCCACCTTTACTG TTA <sup>a</sup> ACTAATCACGCAGGCTTTGTCTTCA

Die 5'-LIC-Anhänge der Primer sind kursiv dargestellt.

### 2.1.5.3 Real-time RT-PCR Primer

Primer	5'-3'-Sequenz
GAPDH-F *	AGGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA
GAPDH-R *	AGTGGTCGTTGAGGGCAATG
hZAP-L-F	TCGACAGCTGTGTGGATACCA
hZAP-L-R	TCACATATTGTGGGTAAACCTGATCT

hZAP-S-F	GCAGCTGTTTGCTGACAGATG
hZAP-S-R	TCAGGAAAACAGGCTCCAGATT

\* Sequenzen der GAPDH-Primer nach Pfefferle *et al.* (2009)

#### 2.1.5.4 Real-time RT-PCR Sonden

Sonde	5'-3'-Sequenz	Fluorochrom / Quencher
GAPDH-P	CACCCACTCCTCCACCTTTGACGCT	5'- Yakima Yellow 3'- BHQ1
ZAPL-P	TCGAATCCCTCCGTTTTTGTTCATCTTTCA	5'- FAM 3'- BHQ1
ZAPS-P	CATGCCCTGGCCTCATCAAGTCACT	5'- Yakima Yellow 3'- BHQ1

#### 2.1.5.5 siRNAs

siRNA	5'-3'-Sequenz / Produktnr.
hZAP-L <i>Silencer</i> <sup>®</sup> Select siRNA (siZAP-L)	GAAUCUAUCUGUUCGAAUA
<i>Silencer</i> <sup>®</sup> Negative Control No. 1 siRNA	AM4611

#### 2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Anwendung, Verdünnung	Produktnr.	Bezugsquelle
<b>Primärantikörper</b>			
α-HA	WB, 1:3000 IP, 2,0 µl	H6908	Sigma-Aldrich (München)
α-HA	WB, 1:1000	H3663	Sigma-Aldrich (München)
α-GAPDH	WB, 1:4000	AM4300	Ambion / Life Technologies (Darmstadt)
α-hZAP (α-ZCCHV)	WB, 1:2500	ab73369	Abcam (Cambridge, UK)
α-Calnexin	WB, 1:1000 (in TBST + 5% BSA)	2433	Cell Signaling (Cambridge, UK)
α-Histon H3	WB, 1:5000	H0164	Sigma-Aldrich (München)
α-β-Aktin	WB, 1:5000	A5316	Sigma-Aldrich (München)
α-Biotin	WB, 1:1000	B3640	Sigma-Aldrich (München)
α-GST HRP	WB, 1:5000	RPN1236	GE Healthcare (Freiburg)
α-FLAG HRP	WB, 1:5000 IP, 2,5 µl	A8592	Sigma-Aldrich (München)
<b>Sekundärantikörper</b>			
Goat α-Rabbit HRP	WB, 1:10000	31460	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Goat α-Mouse HRP	WB, 1:10000	115-035-166	Jackson ImmunoResearch (West Grove, USA)
Rabbit α-Goat HRP	WB, 1:2000	sc-2768	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg)

α = anti, WB = Western Blot, IP = Immunopräzipitation, HRP (engl.) = Meerrettichperoxidase

### 2.1.7 Enzyme

Alkalische Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
Lysozym	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
PARP12, human, N-term. GST	Sigma-Aldrich (München)
PARP15, human, N-term. GST	Abnova GmbH (Heidelberg)
Restriktionsenzyme (+ 10x Puffer, BSA)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
RNase A	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)

### 2.1.8 DNA- und Proteinmarker

1 Kb Plus DNA Ladder	Life Technologies (Darmstadt)
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

### 2.1.9 Kits

Coomassie Plus™ (Bradford) Assay Kits	Pierce / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Flp-In™ T-REx™ Core Kit	Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)
HA tagged Protein PURIFICATION KIT	MBL International Corporation (Woburn, USA)
Lipofectamine® LTX with PLUS™ Reagent	Life Technologies (Darmstadt)
mMESSAGE mMACHINE® SP6 Transcription Kit	Ambion / Life Technologies (Darmstadt)
mMESSAGE mMACHINE® T7 Transcription Kit	Ambion / Life Technologies (Darmstadt)
MolTaq DNA Polymerase Kit	Molzym (Bremen)
NucleoBond® Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel (Düren)
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel (Düren)
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.)
QIAamp® Viral RNA Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Qproteome® Cell Compartment Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Renilla Luciferase Assay System	Promega (Mannheim)
SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit	Life Technologies (Darmstadt)
SuperSignal™ West Femto Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
SuperSignal™ West Pico Chemiluminescence Substrate Kit	Pierce / Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

### 2.1.10 Chemikalien

Acrylamid (Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1))	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
ADP-Ribose	Sigma-Aldrich (München)
Agarose (LE)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
BSA	PAA Laboratories GmbH (Linz, Österreich)
Bugbuster® 10x Protein Extraction Reagent	Merck Millipore (Darmstadt)
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
cOmplete, EDTA-free	Roche Applied Sciences (Mannheim)
Coomassie Brilliant Blau R 250	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs), Set	Life Technologies (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Essigsäure	Merck Millipore (Darmstadt)
Ethanol absolut	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Ethidiumbromidlösung 1%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Fast Green FCF	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Ficoll® 400	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Formaldehydlösung 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
HEPES	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Imidazol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Isopropanol (2-Propanol)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Kristallviolett	Merck Millipore (Darmstadt)
Lipofectamine® 2000	Life Technologies (Darmstadt)
Lipofectamine® RNAiMAX Reagent	Life Technologies (Darmstadt)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
NAD, Biotin labeled	Biomol GmbH (Hamburg)
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
peqGOLD TriFast™	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare (Freiburg)
Roti®-Block	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Salzsäure (HCl) rauchend 37%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TCEP Lösung (0,5 M; pH 7,0)	Sigma-Aldrich (München)
TEMED	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Thiazolylblau (MTT)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,9%	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Triton X 100	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

Trypanblau	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Turbo™ DNase	Ambion / Life Technologies (Darmstadt)
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Xylencyanol	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)

### 2.1.11 Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in zweifach destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O) angesetzt.

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	
Analysepuffer (ITC)	20 mM HEPES, pH 7,5 250 mM NaCl 1% Glycerin 1% DMSO	
<i>Binding buffer</i> , nach GE Healthcare (Proteinaufreinigung)	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl* 5 mM Imidazol** pH 7,4  * bei PARP: 1,5 M ** bei ONNV / PARP: 20 mM  Filtriert (0,2 µm) und entgast	<u>Additive:</u> 1x cOmplete, EDTA-free 1 mM PMSF 1 mM TCEP* 250 µg/ml Lysozym 2 U/ml Turbo™ DNase 10 µg/ml RNase A  * bei PARP: 4 mM
Coomassie-Fixier-Lösung	30% Methanol 10% Essigsäure	
Coomassie-Lösung	0,25% Coomassie R-250 50% Methanol 10% Essigsäure	
DNA-Ladepuffer 6x	0,13% Bromphenolblau 0,13% Xylencyanol 15% Ficoll® 400 in 5x TAE-Puffer	
<i>Elution buffer</i> , nach GE Healthcare (Proteinaufreinigung)	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 500 mM NaCl 500 mM Imidazol pH 7,4  Filtriert (0,2 µm) und entgast	
Fast Green-Lösung	2,5% Fast Green FCF 10% Essigsäure	
Lämmli-Laufpuffer 4x	24 g Tris 115,2 g Glycin 4 g SDS ad 1 l mit H <sub>2</sub> O	
Lämmli-Probenpuffer 5x	0,313 M Tris-HCl, pH 6.8 50% Glycerin 10% SDS 0,05% Bromphenolblau Verdünnung mit H <sub>2</sub> O zu 2x und 1x Konzentration	

Lysepuffer (Testexpression)	1x Bugbuster® 10x Protein Extraction Reagent in <i>Binding buffer</i> mit Additiven
<i>Mild stripping</i> Puffer, nach Abcam	15 g Glycin 1 g SDS 10 ml Tween® 20 ad 1 l mit H <sub>2</sub> O pH 2,2
<i>Phosphate buffered saline</i> (PBS) 10x	80 g NaCl 2 g KCl 26,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l mit H <sub>2</sub> O pH 7,4
PBS-Tween (PBST)	1x PBS + 0,05% Tween® 20
PMSF Stocklösung	0,1 M in Isopropanol
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer 50x	242 g Tris 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8 57,1 ml Essigsäure ad 1 l mit H <sub>2</sub> O
<i>Tris buffered saline</i> -Tween (TBST)	50 mM Tris 150 mM NaCl 0,1% Tween® 20 pH 7,5
TNA 2x (CoIP)	0,5% Triton X 100 100 mM Tris-HCl, pH 7,5 400 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mg/ml BSA
TNE (CoIP)	50 mM Tris-HCl, pH 6,8 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 200 ml Methanol ad 1 l mit H <sub>2</sub> O
Triton-Lysispuffer (CoIP)	0,5% Triton X 100 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM EDTA

### 2.1.12 Zellkulturmedien und Zusätze

0,05% Trypsin-EDTA	Life Technologies (Darmstadt)
2x MEM	9,78 g MEM-Pulver, 2,2 g NaHCO <sub>3</sub> , ad 470 ml H <sub>2</sub> O steril Filtration 20 ml FCS, 10 ml Pen/Strep
Agarose-Overlay	1,2% Agarose in H <sub>2</sub> O + 2x MEM, 1:1 gemischt
Ampuwa® H <sub>2</sub> O (steril)	Fresenius Kabi (Bad Homburg)
Blasticidin	PAA (Cölbe)



Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe)
Doxycyclin	AppliChem (Darmstadt)
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	PAA (Cölbe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Einfriermedium für Flp-In T-REx Zellen	50% DMEM mit 10% FCS, 40% FCS, 10% DMSO
Fötale Kälberserum (FCS) Gold	PAA (Cölbe)
Hygromycin B	PAA (Cölbe)
L-Glutamin (100x)	PAA (Cölbe)
Minimal Essential Medium (MEM), mit L-Glutamine (Pulver)	Biochrom AG (Berlin)
Minimal Essential Medium (MEM), mit Earle's Salts, ohne L-Glutamin	PAA (Cölbe)
Nicht-essentielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	PAA (Cölbe)
OptiPRO™ SFM	Life Technologies (Darmstadt)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (100x)	PAA (Cölbe)
Poly-L-Lysin (0,01%)	Sigma-Aldrich (München)
Zeocin	Life Technologies (Darmstadt)

### 2.1.13 Nährmedien und Antibiotika

LB-Agar	Nährmedienküche, Uniklinik Bonn
LB-Flüssigmedium	Nährmedienküche, Uniklinik Bonn

**Tabelle 2.2: Übersicht der verwendeten Selektionsantibiotika**

Antibiotikum	Stocklösung	Arbeitskonz.	Hersteller
Carbenicillin Dinatriumsalz	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml	Sigma-Aldrich (München)
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	34 µg/ml	Sigma-Aldrich (München)
Kanamycin Sulfat	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml	Sigma-Aldrich (München)

### 2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Elektroporationsküvetten (2 mm)	VWR International GmbH (Langenfeld)
Eppendorf Safe-Lock Tubes™ (0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Feather® Disposable Scalpel No.11	Feather Safety Razor (Osaka, Japan)
Filter für Spritzen (0,2 µm)	VWR International GmbH (Langenfeld)
Filtereinheit Nalgene™ Rapid-Flow™ (0,2 µm, 500 ml)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Filterpapier	Whatman / GE Healthcare (Freiburg)
Impföse, soft	VWR International GmbH (Langenfeld)
Kanülen, steril	BD (Heidelberg)
Kapillarspitze (200 µl)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf)

Kryoröhrchen (Mikroschraubröhre)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Küvetten UVette® 220-1600 nm	Eppendorf (Hamburg)
LightCycler®480 Multiwell Plate 96, white	Roche Applied Sciences (Mannheim)
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Axygen (Basel, Schweiz)
Pipettenspitzen (mit Filter)	Nerbe Plus GmbH (Winsen/Luhe)
Pipettenspitzen (ohne Filter)	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf); Eppendorf (Hamburg)
Protran® Nitrocellulose Transfer Membran	GE Healthcare (Freiburg)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Röhren (für Luminometer)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Röntgenfilm CL-XPosure	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Serologische Pipetten (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Spezialvernichtungsbeutel	Nerbe Plus GmbH (Winsen/Luhe)
Spritzen Plastipak™ (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml)	BD (Heidelberg)
Transparentfolie für LightCycler-Platten	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)
Vivaspin-Konzentrator (6 ml, 20 ml), MWCO 10 kD	Sartorius AG (Göttingen)
Zellkulturflaschen mit/ohne Filter (25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> )	Corning (Corning, USA)
Zellkulturschalen	TPP AG (Trasadingen, Schweiz)
Zellkulturtestplatten (6-, 24-, 96-well)	TPP AG (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht)

### 2.1.15 Geräte

Agarosegel-Dokumentation AlphaDigiDoc™ RT Blaulicht-Transilluminator Visi-blue VB-26 Olympus Camedia C-5060 Thermodrucker P93D UV-Tisch AITM-26	Cell Biosciences Inc. (Santa Clara, USA) UVP Laboratory Products (Upland, USA) Olympus (Hamburg) Mitsubishi Electric (Ratingen) Cell Biosciences Inc. (Santa Clara, USA)
Agarose-Gelelektrophorese Kamm 1,5 mm/5 Zähne Gelsystem Mini Kamm 1,5 mm/10 Zähne Gelsystem Mini Glasplatten 75 x 50 mm Gelkammer HE33	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen) Fisherbrand (Schwerte) Hoefer, Inc. (Holliston, USA)
ÄKTApurifier™ UPC 10	GE Healthcare (Freiburg)
BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Brutschränke Heraeus® B6200 (Bakterien) HERAcell® 240 (Zellkultur) Galaxy® 170 S (Virusanzucht)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich) Thermo Fisher Scientific (Dreieich) New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Digitalkamera IXUS 95 IS	Canon Europe Ltd (Uxbridge, UK)
Einfrierhilfe Mr. Frosty™	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Entwicklermaschine, Curix 60	Agfa HealthCare (Bonn)
Fastblot B44	Biometra (Göttingen)
Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

Glasware (Flaschen, Kolben, Zylinder)	Schott AG (Mainz); Fisherbrand (Schwerte)
HisTrap™ FF 1 ml	GE Healthcare (Freiburg)
Inversmikroskop AE20 Tension	Motic Deutschland GmbH (Wetzlar)
LightCycler® 480 II	Roche Applied Sciences (Mannheim)
Luminometer Junior LB 9509	Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad)
Magnetrührgerät MS3000	BioTek (Bad Friedrichshall)
Mikrotiterplatten-Detektor Synergy 2	BioTek (Bad Friedrichshall)
Mini-PROTEAN® Tetra Cell System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
NanoDrop 1000	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim)
PCR-Thermocycler GeneAmp PCR System 2400 Master Cycler Gradient S Mastercycler® pro	PerkinElmer Inc. (Rodgau) Eppendorf (Hamburg) Eppendorf (Hamburg)
pH-Meter SevenEasy S-20	Mettler-Toledo GmbH (Gießen)
Pipetten, Eppendorf research plus	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfe accu-jet® pro	Brand GmbH + Co. KG (Wertheim)
Stromquelle Standard Power Pack P25	Biometra GmbH (Göttingen)
Superdex™ 200 10/300 GL	GE Healthcare (Freiburg)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Ultraschallgerät Sonopuls HD 2070	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG (Berlin)
Vortexer VV3	VWR (Darmstadt)
VP-ITC Kalorimeter mit ThermoVac	MicroCal / GE Healthcare (Freiburg)
Wärmeschüttler Certomat S + H	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbäder 1002 / 1003 / 1092	GFL (Burgwedel)
Wippe Mini Rocker MR1	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Zentrifugen Avanti® J-E (Rotoren: JA-14; JA-25.50) Heraeus Biofuge fresco Heraeus Megafuge 1.0R Eppendorf 5424	Beckman Coulter GmbH (Krefeld) Thermo Fisher Scientific (Dreieich) Thermo Fisher Scientific (Dreieich) Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugenbecher Nalgene™ (250 ml)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)

### 2.1.16 Software

AlphaEase FC/AlphaDigiDoc® RT	Cell Biosciences Inc. (Santa Clara, USA)
DNASTAR Lasergene 7	DNASTAR Inc. (Madison, USA)
EndNote® X5	Thomson Reuters (New York, USA)
LightCycler Software v3.5.17	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
NEBcutter V2.0 ( <a href="http://tools.neb.com/NEBcutter2/">http://tools.neb.com/NEBcutter2/</a> )	New England Biolabs (Frankfurt)
Microsoft Office	Microsoft Corporation (Redmond, USA)
Origin® for ITC	MicroCal / GE Healthcare (Freiburg)
Primer3web, version 4.0.0 ( <a href="http://primer3.ut.ee/">http://primer3.ut.ee/</a> )	Untergasser <i>et al.</i> (2012)
VPViewer™ 2000	MicroCal / GE Healthcare (Freiburg)

## 2.2 Methoden

Die Zusammensetzung der bei den verschiedenen Methoden verwendeten Puffer, Lösungen und Medien ist, soweit nicht anderweitig vermerkt, in den Abschnitten 2.1.11, 2.1.12 bzw. 2.1.13 aufgeführt.

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden als Adhäsionskulturen in sterilen Zellkulturflaschen unter humider Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien ist in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Die Zellen wurden abhängig von ihrem Wachstum bei 80 - 90%iger Konfluenz passagiert. Dazu wurde der Kulturüberstand verworfen und der Zellrasen einmal (BHK-J) bzw. zweimal (Flp-In T-REx-293) mit PBS gewaschen. Zum Lösen der adhärennten Zellen wurden diese 5 min bei 37°C mit Trypsin-EDTA inkubiert. Die Trypsin-Reaktion wurde durch Zugabe des vierfachen Volumens an frischem Medium gestoppt und die Zellen durch wiederholtes Pipettieren der Zellsuspension vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen entweder in einem geeigneten Verhältnis in ein neues Kulturgefäß mit frischem Medium überführt oder die Zellzahl der Suspension (2.2.1.3) für anschließende Versuche bestimmt.

**Tabelle 2.3: Zusammensetzung der verwendeten Zellkulturmedien**

Zelllinie	Zusammensetzung Medium
BHK-J	7,5% FCS 1% L-Glutamin 1% NEAA 100 U/ml Penicillin 0,1 mg/ml Streptomycin in MEM mit Earle's Salts, ohne L- Glutamin
Flp-In T-REx-293	10% FCS 15 µg/ml Blastocidin 100 µg/ml Zeocin in DMEM, high glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin
Flp-In T-REx-293-hZAP Expressionszelllinien	10% FCS 15 µg/ml Blastocidin 200 µg/ml Hygromycin B in DMEM, high glucose (4,5 g/l), mit L-Glutamin

### 2.2.1.2 Poly-L-Lysin Beschichtung von Zellkulturplatten

Flp-In T-REx-293 Zellen neigen dazu, sich von ihrem Untergrund abzulösen. Um die Zelladhäsion zu verbessern, wurden die Zellkulturplatten für zur Transfektion (2.2.1.5) oder Infektion (2.2.2.3) bestimmten Zellen vor dem Einsäen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Wachstumsflächen der Platten mit Poly-L-Lysin bedeckt und für mindestens 5 min bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Flp-In T-REx-293 Zellen direkt in die beschichteten Platten eingesät.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Lebendzellzahl einer Zellsuspension wurde lichtmikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Ein Aliquot der Suspension wurde 1:1 mit Trypanblau (0,4% in PBS) gemischt, um tote Zellen anzufärben und bei der Zählung auszuschließen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die ungefärbten Zellen in vier Großquadranten (A - D) der Zählkammer gezählt. Die Anzahl der lebenden Zellen pro ml wurde mittels der angegebenen Formel bestimmt und die Zellzahl auf die gewünschte Konzentration eingestellt.

$$[(A+B+C+D)/4] \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

### 2.2.1.4 MTT-Viabilitätstest

Der MTT-Test dient zur kolorimetrischen Überprüfung der Zellvitalität (Mosmann, 1983). Lebende Zellen verstoffwechseln das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Thiazolylblau, MTT) zu blauem, wasserunlöslichem Formazan. Durchgeführt wurde der MTT-Test in 24-well-Zellkulturplatten, wobei pro 1 ml Kulturmedium 50 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zu den Zellen gegeben wurden. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit 500 µl 4% Formaldehyd in PBS für 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min mit PBS gewaschen. Das Formazan wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol während 15 min Inkubation auf einer Wippe aus den Zellen gelöst. Die Auswertung des MTT-Tests erfolgte mit einem Mikrotiterplatten-Detektor durch Messung der Extinktion bei 562 nm.

### 2.2.1.5 Lipofektion eukaryotischer Zellen

Bei der Lipofektion werden Nukleinsäuren über Liposome in eukaryotische Zellen eingeschleust (Transfektion). Die Transfektion kann entweder *forward* oder *reverse* erfolgen. Für eine *forward* Transfektion werden die Zellen am Vortag eingesät und die Transfektion wird im adhären, proliferierenden Zellstadium durchgeführt. Bei der *reverse* Transfektion wird die Zellsuspension direkt mit dem Transfektionsmix gemischt und dadurch der Zeitaufwand um einen Tag reduziert. Welches der beiden Protokolle geeignet ist, kann zwischen verschiedenen Zelllinien und zu transfizierenden Nukleinsäuren variieren. Die Lipofektion wurde hier zur Transfektion verschiedener eukaryotischer Zellen mit Plasmid-DNA oder siRNA angewendet.

#### 2.2.1.5.1 Lipofektion von Plasmid-DNA in BHK-J Zellen

Die Lipofektion von Plasmid-DNA erfolgte als *forward* Transfektion mit *Lipofectamine® LTX with PLUS™ Reagent*. Für eine Transfektion wurden 24 h zuvor  $3 \cdot 10^5$  BHK-J Zellen in eine Kavität einer 6-well-Zellkulturplatte eingesät. Da die Genexpression der hier transfizierten Plasmide von einem T7-Promotor kontrolliert wurde, musste in den Zellen zunächst die T7-Polymerase exprimiert werden. Dazu wurden die Zellen mit rekombinantem MVA-T7 (MOI 2,5) in 500 µl serumfreiem MEM + 1% L-Glutamin für 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> infiziert. Währenddessen wurde der Lipofektionsansatz vorbereitet. Die Gesamtmenge der aufzunehmenden DNA betrug 2 µg, entweder durch Transfektion von 2 µg eines einzelnen Plasmids oder durch Cotransfektion von je 1 µg zweier verschiedener Plasmide. Die Plasmid-DNA wurde in 500 µl OptiPRO™ SFM mit 2 µl PLUS™-Reagenz (1:1 Verhältnis zur DNA-Menge) aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 6 µl Lipofectamine® LTX-Reagenz (1:3 Verhältnis zur DNA-Menge) hinzugegeben und die Mischung für weitere 30 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der MVA-T7 Infektion wurde das Inokulum der Zellen gegen 2 ml frisches Kulturmedium ohne Antibiotika ausgetauscht und der Transfektionsansatz vorsichtig dazugetropft. Die Zellen wurden 5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor der Überstand verworfen und das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt wurde. Nach weiteren 24 h Inkubation konnten die transfizierten Zellen für Folgeversuche verwendet werden.

### 2.2.1.5.2 Lipofektion von siRNA in Flp-In T-REx-293 Zellen

Die Lipofektion von siRNA wurde als *reverse* und *forward* Transfektion mit dem *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent* durchgeführt. Die siRNA wurde auf Eis aufgetaut und während der Versuchsdurchführung in einem Kühlblock aufbewahrt.

Für eine *reverse* Transfektion wurden 12,5 pmol oder 75 pmol siRNA mit 500 µl OptiPRO™ SFM und 4 µl Lipofectamine® RNAiMAX gemischt und in eine Poly-L-Lysin-beschichtete (2.2.1.2) Kavität einer 6-well-Zellkulturplatte gegeben. Während der Transfektionsansatz 20 min bei RT inkubierte, wurden Flp-In T-REx-293 Zellen trypsiniert (2.2.1.1) und gezählt (2.2.1.3). Die Zellzahl wurde auf  $2,5 \cdot 10^5$  Zellen in 2 ml Kulturmedium eingestellt und die Suspension zu dem Transfektionsansatz pipettiert. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Zellen entweder lysiert (2.2.6.1) oder für einen effizienten *knockdown* zusätzlich *forward* transfiziert.

Für eine *forward* Transfektion wurden entweder 24 h zuvor eingesäte oder bereits *reverse* transfizierte Flp-In T-REx-293 Zellen verwendet. Die Zubereitung des siRNA-Transfektionsansatzes erfolgte wie für die *reverse* Transfektion beschrieben in einem separaten Reaktionsgefäß. Das Medium der zu transfizierenden Zellen wurde gegen 1,5 ml frisches Kulturmedium ausgetauscht und der Transfektionsansatz vorsichtig dazugetropft. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> konnten die Zellen für Folgeversuche verwendet werden.

### 2.2.1.6 Elektroporation eukaryotischer Zellen

Die Elektroporation (EP) ist eine physikalische Methode zur Nukleinsäure-Transfektion eukaryotischer Zellen (Weaver & Chizmadzhev, 1996). Hier wurde *in vitro* transkribierte virale RNA (2.2.5.1) in BHK-J Zellen elektroporiert. Am Vortag wurden die Zellen so passagiert, dass sie sich zum Zeitpunkt der EP in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Der EP unmittelbar vorausgehend wurden die Zellen suspendiert (2.2.1.1) und bei 4°C und 1200 rpm für 10 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in kaltem OptiPRO™ SFM resuspendiert und dadurch gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 1200 rpm für 10 min wurden die Zellen ein zweites Mal mit kaltem OptiPRO™ SFM gewaschen. Der Zellsuspension wurde ein Aliquot entnommen und während des folgenden Zentrifugationsschritts die Gesamtzellzahl bestimmt (2.2.1.3). Die pelletierten Zellen wurden daraufhin so in OptiPRO™ SFM resuspendiert, dass eine Konzentration von

$2 \cdot 10^7$  Zellen/ml gegeben war, und auf Eis gestellt. 50  $\mu$ l der eingestellten Zellsuspension ( $\approx 1 \cdot 10^6$  Zellen) wurden zusammen mit 50  $\mu$ l OptiPRO™ SFM in einem Reaktionsgefäß vereint. Dazu wurden 2  $\mu$ g der zwischenzeitlich auf Eis aufgetauten *in vitro* transkribierten RNA (2.2.5.1) gemischt. Das Gemisch wurde luftblasenfrei in eine Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite überführt und in einem Gene Pulser Xcell™ Elektroporator einem elektrischen Puls von 140 V für 25 msek ausgesetzt. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die elektroporierten Zellen mit einer Pasteurpipette in ein Reaktionsgefäß mit 1,25 ml vorgelegtem BHK-J Kulturmedium überführt. Entsprechend der anschließenden Anwendung wurden die Zellen ausgesät und/oder für einen *Infectious Center Assay* (2.2.2.2) verwendet.

### 2.2.1.7 Generierung stabil transfizierter Flp-In T-REx Zelllinien

Für die Generierung stabil transfizierter Zelllinien mit induzierbarer Expression eines bestimmten Zielgens (*gene of interest*, GOI) wurde das Flp-In™ T-REx™ System von Invitrogen verwendet. Dieses System beruht auf der Flp-Rekombinase-vermittelten Rekombination zwischen dem *Flp Recombination Target* (FRT)-Element des Expressionsvektors pcDNA5/FRT/TO<sup>®</sup> und einem bereits integrierten FRT-Element in dem Genom der Flp-In™ T-REx™-293 Zellen (O'Gorman *et al.*, 1991). Durch vorausgehende Klonierung wird das entsprechende GOI in den Expressionsvektor unter Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promotors inseriert. Da die Flp-In™ T-REx™-293 Zellen konstitutiv den Tet-Repressor exprimieren, wird die Expression des stabil integrierten GOI solange reprimiert, bis den Zellen Tetracyclin oder ein Derivat wie das stabilere Doxycyclin (Dox) zugeführt wird. Erst dann dissoziiert der Tet-Repressor von dem Promotor, so dass letzterer für die Transkription des GOI zugänglich wird (Yao *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde der stabilen Transfektion vorausgehend das entsprechende GOI in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO kloniert sowie das Flp-Rekombinase-kodierende Plasmid pOG44 in der erforderlichen Menge präpariert (2.2.4.9.2). Für jede geplante Zelllinie wurden 24 h vor der Transfektion  $1 \cdot 10^6$  Flp-In T-REx-293 Zellen in eine Poly-L-Lysin-beschichtete (2.2.1.2) Kavität einer 6-well-Zellkulturplatte eingesät. Die Cotransfektion der Plasmide pcDNA5/FRT/TO-GOI und pOG44 erfolgte in dem Verhältnis 1:10 mit Lipofectamine<sup>®</sup> 2000. Dafür wurden zunächst 240  $\mu$ l serumfreies DMEM ohne Antibiotika mit 9,5  $\mu$ l Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 versetzt und 5 min bei RT inkubiert. Während-



dessen wurden 3,5 µg pcDNA5/FRT/TO-GOI und 35 µg pOG44 zu 240 µl serumfreiem DMEM ohne Antibiotika gegeben. Die DNA-Mischung wurde mit dem Lipofectamine®-Ansatz vereint und der gesamte Transfektionsansatz 20 min bei RT inkubiert. Danach wurde das Medium der eingesäten Zellen gegen den Transfektionsansatz ausgetauscht und die Zellen 4 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Transfektionsmix wurde durch frisches Medium ohne Antibiotika ersetzt und die Zellen für weitere 48 h inkubiert. Die Selektion auf erfolgreich rekombinierte Zellen erfolgte durch die Umstellung auf Kulturmedium für Expressionszelllinien (Tabelle 2.3). Durch das darin enthaltene Hygromycin B (200 µg/ml) erlagen Zellen ohne Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination spätestens nach 96 h dem Selektionsdruck, während Zellen mit erfolgter Rekombination (< 0,01%) neben dem GOI auch das Hygromycin-Resistenzgen erworben haben. Nach etwa 20 Tagen waren die Einzelzellen zu deutlichen Zellfoki herangewachsen. Um einzelne Klone zu isolieren, wurde das Kulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Direkt auf den Zellklon wurden ca. 5 µl Trypsin-EDTA pipettiert. Durch mehrmaliges Pipettieren wurden die Zellen gelöst und in die Pipettenspitze aufgesogen. Die vereinzelt Zellen des Zellklons wurden in eine Kavität einer 24-well-Zellkulturplatte mit frischem Medium überführt und expandiert. Abhängig von dem Wachstum wurden die Zellen in ein größeres Kulturformat umgesetzt. Die expandierte Expressionszelllinie war nun für Folgeversuche verfügbar und wurde wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben kultiviert. Die Expression des GOI war durch Zugabe von 1,5 µg/ml Dox zu dem Kulturmedium der Zellen induzierbar.

#### **2.2.1.8 Kryokonservierung von Flp-In T-REx-293 Zellen**

Die Zellen einer konfluenten T75-Zellkulturflasche wurden auf 3 Kryoportionen aufgeteilt. Zunächst wurden die Zellen suspendiert (2.2.1.1) und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde pro Portion in 1,5 ml Einfriermedium (2.1.12) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden kontrolliert mit -1°C/min in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierhilfe bis -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um in flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurde eine Kryoportion zügig bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Die Zellen wurden in eine T75-Zellkulturflasche mit 12 ml Medium ohne Antibiotika gegeben und sollten mindestens 4 h

anwachsen, bis das Medium gewechselt wurde. Nach 24 h wurde das Medium gegen Kulturmedium mit den entsprechenden Antibiotika (Tabelle 2.3) ausgetauscht.

## 2.2.2 Virologische Methoden

Abhängig von dem jeweiligen Virus wurden die Versuche in einem Labor der biologischen Schutzstufe BSL-2 oder BSL-3 durchgeführt (siehe Abschnitt 2.1.2).

### 2.2.2.1 Produktion infektiöser Viruspartikel

Zur Erzeugung infektiöser Virusstocks wurde das durch *in vitro* Transkription gewonnene virale RNA-Genom (2.2.5.1) in BHK-J Zellen elektroporiert (2.2.1.6). Die elektroporierten, in 1,25 ml Medium aufgenommenen Zellen (siehe 2.2.1.6) wurden in eine T25-Zellkulturflasche eingesät und das Gesamtvolumen mit BHK-J Kulturmedium auf 5 ml aufgefüllt. Nach 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Zellüberstand mit den enthaltenen Viruspartikeln geerntet. Zur Entfernung des Zelldebris wurde der Überstand bei 4°C und 1200 rpm für 10 min zentrifugiert. Der geklärte, Virion-haltige Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.2 Infectious Center Assay

Anhand des *Infectious Center Assays* (ICA) kann die spezifische Infektiösität einer elektroporierten viralen RNA (2.2.1.6) ermittelt und ein erster Eindruck über die Plaque-morphologie eines Virus nach EP gewonnen werden. Für einen ICA wurden zunächst 150 µl der für die EP auf 2·10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellten Zellsuspension in 12 ml BHK-J Kulturmedium aufgenommen und mit 2 ml/well in eine 6-well-Zellkulturplatte eingesät. Von den elektroporierten, in 1,25 ml Medium aufgenommenen Zellen (siehe 2.2.1.6) wurden 100 µl zu den Zellen des ersten wells gegeben und weitere 100 µl in 9,9 ml BHK-J Kulturmedium verdünnt. Aus dieser Verdünnung wurden 1 ml, 200 µl, 20 µl bzw. 2 µl vorsichtig zu den Zellen von vier weiteren wells getropft. Das letzte well diente als Zellkontrolle und wurde nicht mit elektroporierten Zellen gemischt. Nach 4 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Überstand weitgehend abgenommen und die Zellen mit 3 ml flüssigem Agarose-Overlay (2.1.12)

überschichtet. Nach weiteren 48 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der ICA nach Fixierung und Färbung (2.2.2.4) ausgewertet.

### 2.2.2.3 Virusinfektion eukaryotischer Zellen

Für den Vergleich des Viruswachstums oder zur Erstellung mehrtägiger Wachstumskinetiken wurden vornehmlich induzierte und nicht-induzierte Flp-In T-REx-Expressionszelllinien verwendet. Dazu wurden 24 h vor der Infektion jeweils  $1 \cdot 10^6$  Zellen/well in eine Poly-L-Lysin beschichtete (2.2.1.2) 6-well-Zellkulturplatte eingesät und ggf. durch Zugabe von 1,5 µg/ml Dox zum Kulturmedium induziert. Die Infektion erfolgte mit einer definierten *multiplicity of infection* (MOI), welche das Verhältnis zwischen infektiösen Partikeln und eingesäten Zellen beschreibt. Anhand des Titors des zu verwendenden Virusstocks (2.2.2.4) wurde das für die jeweilige MOI erforderliche Virusstock-Volumen berechnet und mit PBS + 1% FCS auf ein Endvolumen von 500 µl/well verdünnt. Das Inokulum wurde nach Abnahme des Mediums auf die Zellen gegeben und 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Inokulum vollständig entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 2 ml Standard-Kulturmedium bedeckt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dem jeweiligen Versuch entsprechend wurden zu bestimmten Zeitpunkten Überstandproben von je 200 µl entnommen und bis zu der Titration (2.2.2.4) oder RNA-Extraktion (2.2.5.2.2) falls erforderlich bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.4 Virustitration und Plaqueassay

Mittels Titration und Plaqueassay kann die Anzahl an zytopathischen Viruspartikeln in einer Suspension, z.B. Zellkulturüberstand nach Infektion, bestimmt werden. Der Titer wird als *plaque forming units* (PFU) pro ml angegeben. Für jede zu titrierende Virusprobe wurde zunächst eine 6-well-Zellkulturplatte mit  $3 \cdot 10^5$  BHK-J Zellen/well als Vorbereitung für den Plaqueassay eingesät. Am darauffolgenden Tag wurde die Virusprobe seriell im Verhältnis 1:10 verdünnt, wobei jeweils 50 µl Probe bzw. Verdünnung zu 450 µl PBS + 1% FCS pipettiert und gut gemischt wurden. Generell wurden die Proben bis zu einer Verdünnungsstufe von  $10^{-6}$  verdünnt, wurde jedoch bereits ein höherer bzw. niedrigerer Titer erwartet, wurden Verdünnungsstufen bis  $10^{-8}$  bzw.  $10^{-2}$  (z.B. 0 h-Überstände nach Infektion) präpariert. Mit der Verdünnungsreihe ( $10^{-1}$  -  $10^{-6}$  oder  $10^{-3}$  -  $10^{-8}$  bzw. unverdünnt -  $10^{-2}$ ) wurden die tags zuvor

in die 6-well-Platte eingesäten BHK-J Zellen inokuliert. Dazu wurden nach Abnahme des Mediums von jeder Verdünnungsstufe 200 µl auf die Zellen jeweils einer Kavität gegeben und die Zellkulturplatte 1 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen samt Inokulum mit 3 ml/well eines bei 50°C flüssig gehaltenen Agarose-Overlays (2.1.12) überschichtet. Die Zellen wurden 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis sie für mindestens 30 min in einem 6%igen Formaldehydbad fixiert und die Viren dabei inaktiviert wurden. Nachdem die Zellkulturplatten unter fließendem Wasser gespült wurden, wurde der Overlay vorsichtig entfernt und die fixierten Zellen ca. 20 min mit Kristallviolett-Lösung (1% Kristallviolett in 20% Ethanol) gefärbt. Die Färbelösung wurde abgenommen und die Platten erneut mit Wasser gespült und bei RT getrocknet. Schließlich wurden die durch lysierte Zellen im Zellrasen gebildeten Plaques ausgezählt, um den Virustiter der Ausgangsprobe nach folgender Formel zu berechnen:

$$\text{Anzahl Plaques eines wells} \cdot 5 \cdot 10^{-(\text{Verdünnungsstufe})} = \text{PFU/ml}$$

## 2.2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.3.1 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Zur Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterienstämme wurde die Bakterienzellwand durch Behandlung mit Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>) permeabilisiert. Dazu wurden zunächst 10 ml LB-Medium (ggf. versetzt mit geeignetem Selektionsantibiotikum) mit den Bakterien angeimpft und als aerobe Übernachtskultur bei 150 rpm geschüttelt. Von dieser Übernachtskultur wurde eine Anzuchtkultur (250 ml LB + Antibiotikum) so beimpft, dass die anfängliche optische Dichte gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD<sub>600</sub>) zwischen 0,05 und 0,1 lag. Die Kultur wurde bei 37°C unter Schütteln zu einer OD<sub>600</sub> von ca. 0,7 herangezogen, bevor sie 10 min auf Eis abgekühlt wurde. Die Bakterienzellen wurden 10 min bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 25 ml kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 4°C und 3000 rpm. Schließlich wurde das Pellet in 2,5 ml einer kalten Mischung (85:15 (v/v)) aus 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und Glycerin aufgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße aliquotiert. Die transformationskompetenten Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für eine Transformation wurde ein Aliquot der transformationskompetenten Bakterienzellen (2.2.3.1) auf Eis aufgetaut und 1:10 mit kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit einem Ligationsansatz (2.2.4.8) oder 100 - 500 ng Plasmid-DNA (Retransformation) gemischt und 20 min auf Eis inkubiert. Die Mischung wurde einem Hitzeschock von 45 sek bei 42°C ausgesetzt und für ca. 2 min auf Eis abgekühlt. Zu dem Transformationsansatz wurden 200 µl LB-Medium gegeben und die Suspension für 1 h bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einer LB-Agarplatte mit geeignetem Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Bei einer Retransformation wurde 1/6 des Ansatzes ausplattiert sowie eine Selektionsantibiotikum-enthaltende LB-Übernachtskultur für die Plasmidpräparation (2.2.4.9) angeimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, Flüssigkulturen über Nacht bei 37°C und 150 rpm aerob geschüttelt.

## 2.2.4 DNA-Techniken

### 2.2.4.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die exponentielle Vervielfältigung von DNA-Fragmenten *in vitro*, wobei die zu amplifizierende Zielsequenz durch spezifische, synthetische *forward* und *reverse* Primer definiert wird (Mullis *et al.*, 1986). Die Reaktion erfolgt enzymatisch mithilfe einer DNA-Polymerase in 5'-3'-Richtung durch den automatisierten, zyklischen Wechsel zwischen Denaturierungs-, Bindungs- (*Annealing*-) und Extensionstemperatur im Thermocycler.

Für die DNA-Amplifikation im Rahmen von Klonierungen oder Sequenzierungen (2.2.4.11) wurde das *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* verwendet. Die *Phusion®* Polymerase zeichnet sich durch besonders hohe Prozessivität (15 - 30 sek/kb) und die Fehlerkorrekturfunktion durch 3'-5'-Exonuklease Aktivität aus. Standardmäßig wurden *Phusion®* PCRs wie in Tabelle 2.4 angegeben angesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese analysiert (1 µl PCR) oder aufgereinigt (kompletter PCR-Ansatz) (2.2.4.4).

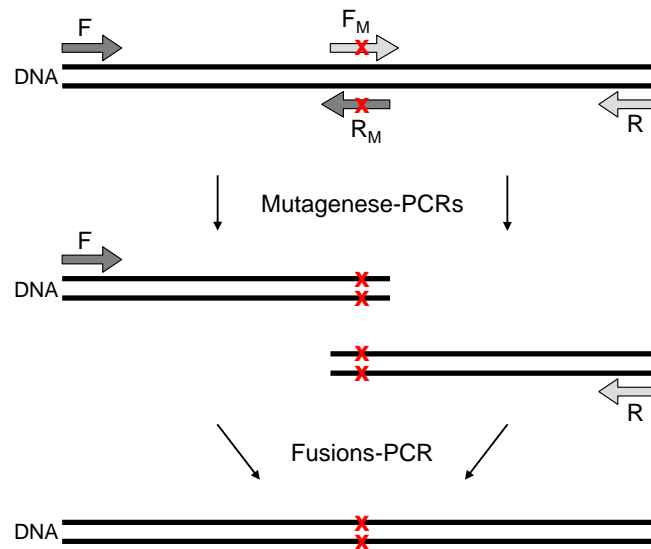
Tabelle 2.4: Standardprotokoll einer PCR mit dem Phusion® High-Fidelity PCR Kit

PCR-Ansatz (50 µl)		Thermocycler-Programm	
DNA (20 - 100 ng)	0,5 µl	98°C	1 min
5x Phusion® HF Puffer	10,0 µl	98°C	15 sek
dNTPs (25 mM)	1,0 µl	58°C	15 sek
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1,0 µl	72°C	15 sek/kb
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1,0 µl	72°C	5 min
DMSO	1,5 µl	4°C	∞
Phusion® Polymerase	0,5 µl		
H <sub>2</sub> O	34,5 µl		

#### 2.2.4.2 Mutagenese-/Fusions-PCR

Gerichtete Mutationen, d.h. in eine DNA-Sequenz gezielt eingebrachte Nukleotidaustausche, wurden über zwei aufeinanderfolgende PCR-Runden, die Mutagenese-PCRs und die anschließende Fusions-PCR, erzeugt. Abb. 2.1 veranschaulicht das Funktionsprinzip der Mutagenese-/Fusions-PCR. Zunächst wurden ein *forward* und der analoge *reverse* Primer über den zu mutierenden Sequenzbereich, inklusive der entsprechend veränderten Nukleotid-Sequenz, konstruiert (Mutagenese-Primer  $F_M$  und  $R_M$ ). Zu dem *forward* Mutagenese-Primer ( $F_M$ ) wurde ein 3'-bindender *reverse* Primer (R) konstruiert und zu dem *reverse* Mutagenese-Primer ( $R_M$ ) ein 5'-bindender *forward* Primer (F). Die beiden äußeren Primer (F und R) trugen meist an ihrem 5'-Ende die Erkennungssequenz eines geeigneten Restriktionsenzym, über welches das resultierende PCR-Produkt später in den Zielvektor integriert werden sollte. Alternativ wurde die Lage der beiden äußeren Primer so gewählt, dass sich innerhalb der amplifizierten Region bereits geeignete Restriktionsschnittstellen befanden. Mit beiden Primerpaaren (F +  $R_M$ ;  $F_M$  + R) wurde jeweils eine PCR (Mutagenese-PCR) wie in Abschnitt 2.2.4.1 beschrieben mit dem *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* anhand der zu mutierenden DNA als Matrize durchgeführt. Die beiden PCR-Produkte besaßen einen überlappenden Sequenzbereich, in dem der Nukleotidaustausch lokalisiert war. In der zweiten PCR-Runde dienten die beiden PCR-Produkte der Mutagenese-PCRs als DNA-Matrizen für die Fusions-PCR, aus der ein Fusionsprodukt beider Einzelfragmente mit integrierter Mutation resultierte. Für die Fusions-PCR wurden die beiden äußeren Primer der Mutagenese-PCRs (F + R) und ebenfalls das *Phusion® High-Fidelity PCR Kit* verwendet. Alle

PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch analysiert (1  $\mu$ l PCR) oder aufgereinigt (kompletter PCR-Ansatz) (2.2.4.4).



**Abb. 2.1: Schema der Mutagenese-/Fusions-PCR.** Während der Mutagenese-PCRs wird über Primer  $F_M$  bzw.  $R_M$  an Stelle x ein Nucleotidaustausch in dem jeweiligen PCR-Produkt ( $F-R_M$  bzw.  $F_M-R$ ) erzeugt. In einer anschließenden Fusions-PCR mit den Primern F und R werden die beiden Mutagenese-PCR-Produkte nach Hybridisierung des Überlappungsbereichs fusioniert. Das Fusionsprodukt enthält die gewünschte Mutation.

### 2.2.4.3 Kolonie-PCR

Mithilfe der Kolonie-PCR können positive Klone, die nach einer Transformation (2.2.3.2) das gewünschte Plasmid enthalten, direkt anhand der Bakterienkolonie identifiziert werden. Hierzu wurde das *MolTaq DNA Polymerase Kit* und ein Primerpaar bestehend aus einem Vektor- und einem Insert-ständigen Primer verwendet. Das Standardprotokoll für einen Reaktionsansatz und das Temperaturprofil des Thermocyclers sind in Tabelle 2.5 aufgeführt. Generell wurde ein PCR-Ansatz halbiert und auf zwei PCR-Reaktionen aufgeteilt. Von einer zu analysierenden Bakterienkolonie auf einer LB-Agarplatte (2.2.3.2) wurde mit einer Pipettenspitze etwas Material abgenommen und kurz in den vorbereiteten, gekühlten MolTaq-PCR-Reaktionsansatz getaucht. Durch den initialen Denaturierungsschritt der PCR wurden die Bakterien lysiert und die DNA dadurch zugänglich für die PCR-Reaktion. 1  $\mu$ l des PCR-Produkts wurde anschließend gelelektrophoretisch analysiert (2.2.4.4). Mit dem an der Spitze verbleibenden Material wurde eine Übernachtskultur für eine eventuelle Plasmid-isolierung angeimpft (2.2.4.9.1).

Tabelle 2.5: Standardprotokoll einer Kolonie-PCR mit der MolTaq DNA Polymerase

PCR-Ansatz (50 $\mu$ l = 2 x 25 $\mu$ l)		Thermocycler-Programm		
DNA = Koloniematerial		95°C	1 min	
10x PCR Puffer	5,0 $\mu$ l	95°C	20 sek	35 x
dNTPs (25 mM)	0,5 $\mu$ l	58°C	20 sek	
Primer <i>forward</i> (10 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l	72°C	1 min/kb	
Primer <i>reverse</i> (10 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l	72°C	5 min	
MolTaq Polymerase	0,5 $\mu$ l	4°C	$\infty$	
H <sub>2</sub> O	42,0 $\mu$ l			

#### 2.2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der größenabhängigen Auftrennung von DNA im elektrischen Feld. Hier wurde sie zur Visualisierung von DNA sowie präparativ für die DNA-Aufreinigung angewendet. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden Gele mit 0,8 - 1,5% Agaroseanteil präpariert. Dazu wurde die erforderliche Menge Agarose-Pulver in dem entsprechenden Volumen 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle durch Aufkochen vollständig gelöst. Der Lösung wurden für die spätere UV-Visualisierung der DNA 0,1  $\mu$ l/ml einer 1% Ethidiumbromidlösung untergemischt. Für ein Gel wurden 10 ml (präparatives Gel 15 ml) der viskosen Mischung vorsichtig auf eine kleine Glasplatte, präpariert mit einem Gelkamm, gegossen und erkalten lassen. Anschließend wurde der Kamm entfernt und das Gel samt Glasplatte in eine mit 1x TAE-Puffer gefüllte Laufkammer gelegt. Die DNA-Proben wurden falls erforderlich mit H<sub>2</sub>O sowie dem entsprechenden Volumen an 6x DNA-Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Ein DNA-Marker mit Fragmenten bekannter Größe wurde zudem für den Größenvergleich der DNA-Proben aufgetragen. Anschließend wurde die DNA bei 120 V für ca. 15 - 30 min elektrophoretisch aufgetrennt. Die Darstellung und digitale Dokumentation erfolgte auf einem UV-Tisch mit UV-Licht (365 nm) und einer Digitalkamera. Präparative Agarosegele für die anschließende DNA-Aufreinigung wurden zunächst auf einem Blaulicht-Transilluminator (480 nm) analysiert und die gewünschten DNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Erst dann wurde das Gel auf dem UV-Tisch fotografiert. Die DNA-Aufreinigung aus dem Agarosegel-Fragment erfolgte wie in Abschnitt 2.2.4.5 beschrieben.



#### 2.2.4.5 DNA-Aufreinigung

Für die Aufreinigung von DNA wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Mithilfe des Kits konnte die DNA entweder direkt aus einem PCR-Ansatz oder nach gelelektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegelstück aufgereinigt werden. Die eluierte DNA wurde anschließend hinsichtlich der Reinheit, Größe und Konzentration gelelektrophoretisch überprüft (2.2.4.4).

#### 2.2.4.6 Restriktionsverdau von DNA

Bei der DNA-Restriktion wird die DNA an bestimmten Nukleotid-Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen enzymatisch gespalten. Der Restriktionsverdau wurde im Rahmen einer Klonierung (präparativer Verdau) oder zur Analyse von Plasmid-DNA (Testverdau) durchgeführt. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M.) bezogen und entsprechend den Angaben des Herstellers mit den erforderlichen Pufferlösungen und gegebenenfalls auch BSA (Endkonzentration 1x) verwendet. Tabelle 2.6 beschreibt die Standardzusammensetzung eines Restriktionsansatzes für einen Testverdau bzw. einen präparativen Verdau. Die Inkubation des jeweiligen Restriktionsansatzes erfolgte, soweit für die Enzyme keine anderen Vorgaben zu beachten waren, bei 37°C für mindestens 30 min (Testverdau) oder 2 h - über Nacht (präparativer Verdau). Das Restriktionsergebnis wurde gelelektrophoretisch überprüft, wobei für den Testverdau der komplette Ansatz und für den präparativen Verdau 1 µl des Restriktionsansatzes aufgetragen wurde. Die gewünschten DNA-Fragmente eines präparativen Verdau wurden durch präparative Agarosegelelektrophorese (2.2.4.4) und anschließende Aufreinigung (2.2.4.5) erhalten.

**Tabelle 2.6: Standardzusammensetzung eines Testverdau bzw. präparativen Verdau**

Testverdau		Präparativer Verdau	
DNA	100 ng	DNA	2,0 µg
Enzym	0,3 µl	Enzym	1,0 µl
10x Puffer (NEB)	1,0 µl	10x Puffer (NEB)	3,0 µl
BSA (1 mg/ml, NEB)	1,0 µl	BSA (1 mg/ml, NEB)	3,0 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10,0 µl	H <sub>2</sub> O	ad 30,0 µl

### 2.2.4.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um eine eventuelle Selbstligation (Re-Ligation) eines Vektors nach einem Restriktionsverdau zu verhindern, wurden zu dem Restriktionsansatz während der letzten 15 - 20 min Inkubationszeit 0,3 µl Alkalische Phosphatase (*Calf Intestinal Phosphatase*, CIP) gegeben. Direkt im Anschluß erfolgte die gelelektrophoretische Aufreinigung des Vektors (2.2.4.4).

### 2.2.4.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde das *Rapid DNA Ligation Kit* verwendet. Die Ligrationsreaktion wurde dabei von der T4-DNA Ligase katalysiert. Die Standardzusammensetzung eines Ligationsansatzes ist in Tabelle 2.7 aufgelistet. Vektor und Insert wurden dabei in dem Verhältnis 1:3 in den Ligationsansatz eingesetzt, wobei die entsprechenden Volumina nach Gelelektrophorese (2.2.4.4) abgeschätzt wurden. In einem Kontrollansatz ohne Insert wurde überprüft, ob eine Re-Ligation des Vektors trotz Dephosphorylierung (2.2.4.7) möglich war (Vektorkontrolle). Der Ligationsansatz wurde 10 - 15 min bei RT inkubiert und anschließend für die Transformation kompetenter Bakterien (2.2.3.2) verwendet.

**Tabelle 2.7: Zusammensetzung des T4-DNA-Ligase katalysierten Ligationsansatzes mit Vektorkontrolle**

Ligation		Vektorkontrolle	
Insert	x µl		
Vektor	x µl	Vektor	1,0 µl
5x Ligation buffer	2,0 µl	5x Ligation buffer	2,0 µl
T4-DNA Ligase	0,5 µl	T4-DNA Ligase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10,0 µl	H <sub>2</sub> O	ad 10,0 µl

### 2.2.4.9 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation dient der Extraktion und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus transformierten Bakterienzellen. Je nach Ausgangsvolumen der Bakterienkultur und damit der für die Aufreinigung verfügbare Menge an Plasmid-DNA wird zwischen der Präparation im kleinen (Mini-Präparation), mittleren (Midi-Präparation) oder großen (Maxi-Präparation) Maßstab unterschieden.

#### 2.2.4.9.1 Mini-Präparation

Zur Herstellung einer Übernachtskultur für die Mini-Präparation wurden 5 ml Selektionsantibiotikum-haltiges LB-Medium mit etwas Material einer einzelnen, transformierten Bakterienkolonie (2.2.3.2) beimpft. Die Kultur wurde aerob bei 37°C und 150 rpm über Nacht (max. 16 h) geschüttelt. Für die Präparation von *high-copy* Plasmiden wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension, für die von *low-copy* Plasmiden 3 ml der Bakteriensuspension verwendet. Die Plasmidaufreinigung wurde mit dem *NucleoSpin® Plasmid Kit* gemäß der im Herstellerprotokoll angegebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die eluierten Plasmide wurden anschließend testverdaut (5 µl) (2.2.4.6), gelelektrophoretisch überprüft (2.2.4.4) und sequenziert (2.2.4.11). Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.4.9.2 Midi-Präparation

Für eine Midi-Präparation wurden für mit *high-copy* Plasmiden transformierte Bakterien 80 ml, für Bakterien mit *low-copy* Plasmiden 200 ml Übernachtskulturen vorbereitet. Dazu wurde das entsprechende Volumen an Selektionsantibiotikum-haltigem LB-Medium entweder 1:1000 mit Material aus einer Übernachtskultur einer Mini-Präparation (2.2.4.9.1) oder mit einem Retransformationsansatz (2.2.3.2) beimpft. Die Kultur wurde aerob in einem Wasserbad bei 37°C und 120 rpm über Nacht (max. 16 h) geschüttelt. Die Plasmidpräparation wurde mit dem *NucleoBond® Xtra Midi Kit* entsprechend den Angaben im Herstellerprotokoll für Midi-Präparationen von *high-copy* bzw. *low-copy* Plasmiden durchgeführt. Die extrahierte DNA wurde je nach Pelletgröße zunächst in 50 - 200 µl H<sub>2</sub>O eluiert und bei 37°C unter leichtem Schütteln für 1 - 2 h gelöst. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Lösung photometrisch bestimmt (2.2.4.10) und mit H<sub>2</sub>O auf 1 µg/µl eingestellt. Die Plasmide wurden durch Testverdau (2.2.4.6) überprüft und falls erforderlich sequenziert (2.2.4.11). Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

#### 2.2.4.10 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch durch die Messung der OD<sub>260</sub> gegen das entsprechende Lösungsmittel bestimmt. Von dem Photometer wurde die Konzentration der Lösung in ng/µl sowie der Quotient OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> als Maß für die Reinheit der DNA angegeben.

### 2.2.4.11 Sequenzierung von DNA

Die korrekte DNA-Sequenz von aufgereinigten PCR-Produkten (2.2.4.5) oder Plasmidpräparationen (2.2.4.9) wurde durch Sequenzierung überprüft. Dazu wurde ein entsprechender Sequenzierungsansatz präpariert (Tabelle 2.8) und als *Extended HotShot* zu der Firma *Seqlab Sequence Laboratories* (Göttingen) geschickt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit der Software DNASTAR Lasergen 7 analysiert.

**Tabelle 2.8: Zusammensetzung eines Sequenzierungsansatzes**

DNA (200 - 600 ng)	x $\mu$ l
Sequenzierungs-Primer (10 $\mu$ M)	1,0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 7,0 $\mu$ l

### 2.2.4.12 Klonierung durch *Ligation Independent Cloning*

Die Methode des *Ligation Independent Cloning* (LIC) beschreibt das direkte Einbringen eines PCR-Produkts in einen linearisierten Vektor, ohne einen Ligationsschritt oder den vorherigen Restriktionsverdau der PCR-Amplifikate zu erfordern (Aslanidis & de Jong, 1990). Hier wurden via LIC die Expressionsplasmide für die bakterielle Proteinexpression (2.2.6.8) entsprechend der Vorgehensweise von Savitsky *et al.* (2010) generiert. Der erhaltene Zielvektor pNIC28-Bsa4 (2.1.4) wurde zunächst nach Retransformation in ausreichender Menge präpariert (2.2.4.9.2), präparativ mit dem Restriktionsenzym *BsaI* verdaut (2.2.4.6) und aufgereinigt (2.2.4.5). Die in den Vektor zu inserierende Nukleotidsequenz (Insert) wurde mit speziellen LIC-PCR-Primern (2.1.5.2) via PCR von der entsprechenden DNA-Matrize amplifiziert (2.2.4.1) und aufgereinigt (2.2.4.5). Mithilfe der T4 DNA-Polymerase wurden komplementäre, kohäsive Enden zwischen Vektor und Insert produziert. Die Zusammensetzung eines T4 DNA-Polymerase katalysierten Reaktionsansatzes für den Vektor bzw. das Insert ist in Tabelle 2.9 aufgeführt. Beide Reaktionsansätze wurden 30 min bei 22°C inkubiert und das Enzym anschließend 30 min bei 80°C inaktiviert. Für die Transformation (*E. coli* MC1061) wurden 1  $\mu$ l der Vektorreaktion und 2  $\mu$ l der Insertreaktion vereint und zu der CaCl<sub>2</sub>-Bakteriensuspension (2.2.3.2) gegeben. Die transformierten Bakterien wurden auf einer LB-Agar-Selektionsplatte ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Nach Kontrolle der Plasmidanwesenheit bei einzelnen Bakterienkolonien (2.2.4.3) wurden von den positiven Kolonien Übernachtskulturen für die Mini-Präparation beimpft (2.2.4.9.1). Mit

ca. 250 ng eines überprüften Plasmids von der Mini-Präparation wurden wiederum kompetente *E. coli* BL21-(DE3)-R2-pRARE2 transformiert (2.2.3.2). Mit mehreren Kolonien der anschließend bewachsenen LB-Agar-Selektionsplatte wurde eine 1 ml Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 150 rpm aerob über Nacht geschüttelt. 10 µl der Übernachtskultur wurden zum Animpfen einer Startkultur für eine Testexpression verwendet (2.2.6.8.1), mit dem verbleibenden Volumen wurde ein Glycerolstock präpariert. Dazu wurde die Kultur gut mit Glycerol (Endvolumen 15% (v/v)) gemischt und bei -80°C in einem Kryoröhrchen aufbewahrt.

**Tabelle 2.9: Zusammensetzung einer T4 DNA-Polymerase-katalysierten Reaktion zur Erzeugung kohäsiver, komplementärer Enden von Vektor und Insert**

Reaktionsansatz Vektor		Reaktionsansatz Insert	
Vektor ( <i>Bsal</i> -verdaut)	2,5 µl	Insert	5,0 µl
10x Puffer P2* (NEB)	0,5 µl	10x Puffer P2* (NEB)	1,0 µl
dGTP (25 mM)	0,5 µl	dCTP (25 mM)	1,0 µl
BSA* (1 mg/ml, NEB)	0,5 µl	BSA* (1 mg/ml, NEB)	0,1 µl
DTT (100 mM)	0,25 µl	DTT (100 mM)	0,5 µl
T4 DNA-Pol	0,25 µl	T4 DNA-Pol	0,05 µl
H <sub>2</sub> O	0,75 µl	H <sub>2</sub> O	2,4 µl

\* aus Lieferumfang der Restriktionsenzyme von New England Biolabs GmbH

## 2.2.5 RNA-Techniken

### 2.2.5.1 Synthese gecappter RNA mittels *in vitro* Transkription

Ausgehend von dem im Plasmid enthaltenen SP6-Promotor (SINV) bzw. T7-Promotor (CHIKV) wurden die cDNA-Klone mithilfe der geeigneten RNA-Polymerase *in vitro* in RNA transkribiert. Die Synthese wurde entsprechend mit dem *mMESSAGE mMACHINE*<sup>®</sup> *SP6* bzw. *T7 Kit* durchgeführt. Zunächst wurde das Plasmid für die *run-off* Transkription durch präparativen Verdau (2.2.4.6) linearisiert, um das 3'-Ende des viralen Genoms zu erzeugen (SINV: *XhoI* bzw. CHIKV: *NotI*), und anschließend präzipitiert. Dazu wurde der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 100 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt und mit 12,5 µl 2 M Kaliumacetat (pH 5,6) und 250 µl 100% Ethanol versetzt. Die DNA wurde für mindestens 2 h bei -80°C gefällt und durch 10 min Zentrifugation bei 4°C und 13000 rpm pelletiert. Der Überstand des Pellets

wurde gegen 200 µl 70% Ethanol ausgetauscht und erneut 10 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde vollständig getrocknet und in 4 µl RNase freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert. 0,2 µl der DNA wurden gelelektrophoretisch überprüft und anschließend 2 µl (≅ 1 µg) in die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die Standardzusammensetzung eines Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2.10 wiedergegeben. Die Reaktion wurde für 2 h bei 37°C inkubiert. 0,2 µl des resultierenden Transkriptes wurden in einem Agarosegel überprüft (2.2.4.4), die verbleibende RNA bei -80°C gelagert.

**Tabelle 2.10: Standardprotokoll einer *in vitro* Transkription mit SP6 / T7 Polymerase**

DNA (linearisiert + gefällt)	2,0 µl
10x Reaction buffer	1,0 µl
2x NTP/CAP	5,0 µl
GTP*	1,0 µl
Enzyme Mix (SP6 / T7)	1,0 µl

\* 20 mM GTP im SP6-Kit, 30 mM GTP im T7-Kit

## 2.2.5.2 RNA-Extraktion

### 2.2.5.2.1 Extraktion von Gesamtzell-RNA

Die Extraktion der Gesamtzell-RNA wurde bei Flp-In T-REx-293 Zellen im Rahmen des siRNA-vermittelten *knockdown* (2.2.1.5.2) durchgeführt. Hierzu wurde das Reagenz *peqGOLD TriFast™* entsprechend der Anleitung des Herstellers für die RNA-Extraktion aus Monolayer-Zellen verwendet, wobei die Zellen einer Kavität einer 6-well-Zellkulturplatte mit 1 ml des Reagenzes lysiert wurden. Das letztlich resultierende RNA-Pellet wurde nach dem Trocknen in 20 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O resuspendiert und 3 min bei 55°C gelöst. Die Aufbewahrung der RNA erfolgte bei -80°C.

### 2.2.5.2.2 Extraktion viraler RNA aus dem Überstand

Für die Extraktion viraler RNA aus Zellkulturüberstand wurde das *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* gemäß den Angaben des *Spin Protocols* des Herstellers verwendet. Das RNA-Eluat wurde bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.5.3 Reverse Transkription und PCR im Ein-Schritt-Verfahren

Bei der Reversen Transkriptions (RT)-PCR im Ein-Schritt-Verfahren (*one-step*) wird RNA zunächst in einzelsträngige, komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und direkt anschließend durch PCR amplifiziert. Die RT-PCR wurde mit dem *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit* durchgeführt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und das Temperaturprofil des Thermocyclers sind in Tabelle 2.11 aufgeführt.

**Tabelle 2.11: Standardprotokoll einer RT-PCR mit dem *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit***

RT-PCR-Ansatz (25 µl)		Thermocycler-Programm	
RNA	3,0 µl	55°C	30 min
2x Rxn Mix	12,5 µl	94°C	2 min
Primer <i>forward</i> (10 µM)	1,0 µl	94°C	15 sek
Primer <i>reverse</i> (10 µM)	1,0 µl	58°C	30 sek
BSA (1 mg/ml)	1,0 µl	72°C	60 sek/kb
SSIII RT Platinum <i>Taq</i> Mix	1,0 µl	72°C	5 min
H <sub>2</sub> O	5,5 µl	4°C	∞

### 2.2.5.4 Real-time RT-PCR

Die *Real-time* RT-PCR wurde zur Detektion und Quantifizierung von hZAP-L- und hZAP-S-mRNA aus Gesamtzell-RNA-Extrakt (2.2.5.2.1) angewendet und als *one-step* RT-PCR (2.2.5.3) mit geeigneten, Fluorochrom-markierten Hydrolyse-Sonden (2.1.5.4) in einem LightCycler® 480 System durchgeführt. Dabei wurden hZAP-L- und hZAP-S-mRNA gleichzeitig in demselben Ansatz detektiert und anhand eines bekannten RNA-Standards quantifiziert. Der RNA-Standard ( $1 \cdot 10^{11}$  Kopien/µl) wurde hierzu seriell 1:10 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Jeweils 1 µl der Verdünnungsstufen  $10^7$ - $10^4$  Kopien/µl wurden für die *Real-time* RT-PCR verwendet. Von dem Gesamtzell-RNA-Extrakt wurden 1500 ng in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktion und Messung erfolgte in einer abgedichteten 96-well-LightCycler-Platte, die während der Versuchsvorbereitung auf einem Kühlblock (4°C) aufbewahrt wurde. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes zur dualen Detektion zweier verschiedener mRNAs sowie das Temperaturprofil des LightCyclers sind in Tabelle 2.12 angegeben. Die Auswertung der RNA-

Quantifizierung erfolgte mit der Software des LightCycler® 480 nach der *absolute quantification* Methode.

**Tabelle 2.12: Standardprotokoll einer *Real-time* RT-PCR mit dem *SuperScript® III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase Kit* zur simultanen Detektion zweier mRNAs**

<i>Real-time</i> RT-PCR-Ansatz (12,5 µl)		LightCycler-Programm	
RNA	x µl		
2x Rxn Mix	6,25 µl	55°C	20 min
1. Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,5 µl	95°C	3 min
1. Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µl	95°C	15 sek
1. Sonde (10 µM)	0,25 µl	58°C	20 sek
2. Primer <i>forward</i> (10 µM)	0,5 µl		
2. Primer <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µl		
2. Sonde (10 µM)	0,25 µl		
BSA (1 mg/ml)	0,5 µl		
SSIII RT Platinum <i>Taq</i> Mix	0,5 µl		
H <sub>2</sub> O	ad 12,5 µl		

## 2.2.6 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.6.1 Präparation von Zelllysaten mit Lämmli-Probenpuffer

Für die Überprüfung der Proteinexpression wurden von Flp-In T-REx-293 Zellen oder den Flp-In T-REx-Expressionszelllinien entsprechende Zelllysate hergestellt. Hierzu wurde von den eingesäten Zellen der Überstand verworfen und der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen. Die Zellen einer Kavität einer 6-well- bzw. 24-well-Zellkulturplatte wurden mit 200 µl bzw. 100 µl 1x Lämmli-Probenpuffer + 5 mM DTT denaturierend lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Pipettenspitze abgeschabt und die viskose Probe in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde mehrmals durch eine Kanüle geschert und 10 min bei 95°C aufgeköcht. Nach Abkühlen und Herunterzentrifugieren des Kondensats wurde das Lysat direkt weiterverwendet oder bei -20°C gelagert.



### 2.2.6.2 Coimmunopräzipitation

Die Coimmunopräzipitation (CoIP) dient der Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Mittels 24 h vorausgegangener Lipofektion (2.2.1.5.1) wurden die zu untersuchenden Proteine von BHK-J Zellen coexprimiert. Anschließend wurde das Medium verworfen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 220 µl Triton-Lysispuffer + 20 µg/ml PMSF pro Kavität der 6-well-Zellkulturplatte wurden die Zellen für mindestens 15 min bei 4°C nicht-denaturierend lysiert. Die Zellen wurden mit einer Pipettenspitze abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch 10 min Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Zelldebris pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Von den 220 µl Probenvolumen wurden 20 µl als Direktlysat abgenommen und nach Mischung mit 20 µl 2x Lämmli-Probenpuffer 5 min bei 95°C erhitzt. Die Lagerung des Direktlysates erfolgte bei -20°C. Das verbleibende Probenvolumen wurde auf zwei CoIP-Ansätze mit der folgenden Zusammensetzung aufgeteilt:

Zellysat	100 µl	
2x TNA	200 µl	
PMSF	20 µg/ml	
IP-Antikörper	x µl*	* Verwendete Volumina der Antikörper für die IP siehe Tabelle 2.1
H <sub>2</sub> O	100 µl	

Die Ansätze wurden bei 4°C über Nacht auf einer Wippe inkubiert. Für die Komplexierung wurden pro Reaktionsansatz 50 µl *Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow* vorbereitet. Dazu wurde die Sepharose dreimal mit 500 µl 1x TNA gewaschen und zwischendurch 30 sek bei 10000 rpm sedimentiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde durch Zugabe des entsprechenden Volumens 1x TNA wieder eine 50%ige Suspension der Sepharose hergestellt. In einen CoIP-Ansatz wurden 50 µl der Sepharose gegeben und 1 h auf einer Wippe bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 1 min bei 4°C und 10000 rpm zentrifugiert und dreimal mit 600 µl 1x TNA und einmal mit 600 µl 1x TNE gewaschen. Die Flüssigkeit wurde vollständig abgenommen und das Pellet in 20 µl 1x Lämmli-Probenpuffer + 5 mM DTT resuspendiert. Nach 5 min bei 95°C wurde die Suspension 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand ohne Sepharose in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden entweder direkt via SDS-PAGE analysiert (2.2.6.3) oder bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS)-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE), kurz SDS-PAGE, ermöglicht die Auftrennung von Proteingemischen abhängig von der molekularen Masse. Für das Gießen der SDS-Gele und die anschließende Gelelektrophorese wurde das *Mini-PROTEAN® Tetra Cell System* verwendet. Zunächst wurde das vorbereitete Trenngelgemisch in die Gießapparatur pipettiert und mit Isopropanol überschichtet. Nach ca. 30 min Polymerisierung wurde das Isopropanol abgenommen und das Trenngel mit der zwischenzeitlich vorbereiteten Sammelgelmischung überschichtet. In das Sammelgel wurde vorsichtig ein Kamm für die Aussparungen der Geltaschen eingesetzt und das Gel anschließend auspolymerisieren lassen. Die Zusammensetzung für je 5 ml der hier verwendeten 5-, 10- und 14%igen Trenngele und des 4%igen Sammelgels sind in Tabelle 2.13 angegeben. Die Gele wurden direkt verwendet oder wenige Tage in feuchten Tüchern bei 4°C gelagert.

**Tabelle 2.13: Pipettierschema für je 5 ml der verschiedenen Trenn- und Sammelgele**

	Trenngel 14% <sup>a</sup>	Trenngel 10% <sup>a</sup>	Trenngel 5% <sup>a</sup>	Sammelgel 4% <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O	1,9 ml	2,4 ml	3,025 ml	3,15 ml
Acrylamid (40%; 37,5:1)	1,75 ml	1,25 ml	0,625 ml	0,5 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8				1,25 ml
SDS (10%)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
APS (10%)	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Temed	2 µl	2 µl	5 µl	5 µl

<sup>a</sup> 5 ml ausreichend zur Präparation eines Gels; <sup>b</sup> 5 ml ausreichend zur Präparation zweier Gele

Für die Elektrophorese wurden je nach Bedarf ein bis vier Gele in das Gelsystem eingespannt und die Elektrophoresekammer mit 1x Lämmli-Laufpuffer gefüllt. Die Käme wurden entfernt und die entstandenen Probentaschen mit Puffer gespült. Die vorbereiteten Proteinproben (10 - 30 µl) sowie 8 µl des Proteinmarkers für den späteren Größenvergleich wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 120 V und im Trenngel bei 180 V. Der Fortschritt der Elektrophorese wurde anhand der farbigen Proteinlauffront verfolgt und entsprechend gestoppt. Das Gel wurde vorsichtig aus der Apparatur geholt und entweder direkt gefärbt (2.2.6.4) oder durch Western Blot und Immundetektion (2.2.6.5) analysiert.

#### 2.2.6.4 Coomassie-Färbung

Für die direkte, unspezifische Analyse von Proteinen in einem SDS-Gel wurde dieses mit Coomassie Brillant Blau gefärbt. Dazu wurde das Gel in einer Färbeschale mit Coomassie-Lösung bedeckt und für mindestens 30 min bei RT auf einer Wippe geschwenkt. Nach Abnahme der Färbelösung wurde das Gel mit Coomassie-Fixier-Lösung fixiert und der Hintergrund bei RT entfärbt. Das Gel wurde mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend fotografiert.

#### 2.2.6.5 Western Blot und Immundetektion

Der Proteintransfer von einem SDS-Gel (2.2.6.3) auf eine Nitrocellulose-Membran erfolgte elektrophoretisch via Western Blot. Das Blot-Sandwich wurde auf der Anodenplatte der *Fastblot*-Apparatur zusammengebaut, indem jeweils in Transferpuffer getränkt zwei Lagen Filterpapier, die Nitrocellulose-Membran, das SDS-Gel ohne Sammelgel und zwei weitere Lagen Filterpapier luftblasenfrei aufeinander geschichtet wurden. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen und von außen mit einem Kühlblock gekühlt. Der Transfer erfolgte bei 150 mA/Gel und maximal 25 V für 60 min. Zur Überprüfung wurden die Proteine auf der Membran 2 min unspezifisch mit Fast Green-Lösung angefärbt, die Membran mit 10% Essigsäure direkt wieder entfärbt und einmal mit PBST gewaschen. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Schwenken der Membran in 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünntem Roti®-Block (10 ml) entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C blockiert. Der Primärantikörper wurde in 7 ml PBST verdünnt (siehe Tabelle 2.1) und auf einer Wippe entweder für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit der Membran inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für 15 min wurde die Membran mit dem in 7 ml PBST verdünnten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.1) 1 h bei RT geschwenkt. Die Membran wurde dreimal 15 min mit PBST gewaschen, gefolgt von der Detektion der immunmarkierten Proteine. Je nach Bandenintensität wurde dazu das *SuperSignal™ West Pico* oder *Femto Chemiluminescence Substrate Kit* verwendet. Je 250 µl der in dem jeweiligen Kit enthaltenen Lösungen wurden 1:1 gemischt und auf der Membran verteilt. Eingebettet in Klarsichtfolie folgten 5 min Inkubation im Dunkeln bei RT. Überschüssige Flüssigkeit wurde aus der Folie ausgestrichen und die Membran in frische Folie gebettet. Je nach Leuchtintensität der Banden wurde für eine bestimmte Zeit (15 sek - 5 min) im Dunkeln ein Röntgenfilm auf die Membran aufgelegt und der Film anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt. Die

Banden des Proteinmarkers wurden auf den entwickelten Film übertragen und der Film eingescannt oder fotografiert.

#### **2.2.6.6 Strippen von Nitrocellulose-Membranen**

Um auf derselben Membran verschiedene Proteine spezifisch zu detektieren, wurden die Primär- und Sekundärantikörper nach erfolgter Detektion in Anlehnung an das *mild stripping* Protokoll der Firma Abcam von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran mit 10 ml frischem *mild stripping* Puffer 15 - 20 min bei RT inkubiert. Auf zwei 10 min Waschschrte mit je 10 ml PBS folgten zwei 5 min Waschschrte mit je 10 ml TBST. Anschließend wurde die Membran erneut blockiert (2.2.6.5) und war für die nächste, spezifische Immundetektion gebrauchsfertig.

#### **2.2.6.7 Proteinaufreinigung via HA-Tag**

Für den Ribosylierungsassay (2.2.6.13) wurde hZAP-L über seinen C-terminalen Hämagglutinin (HA)-Tag aus 24 h zuvor mit 1,5 µg/ml Dox induzierten Flp-In T-REx-hZAP-L Zellen aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte mit dem *HA tagged Protein PURIFICATION KIT* entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Die Konzentration des Proteineluats wurde anschließend im Bradford-Assay (2.2.6.10.1) gemessen und die Reinheit via SDS-PAGE (2.2.6.3) überprüft. Das Proteineluat wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **2.2.6.8 Bakterielle Proteinexpression**

##### **2.2.6.8.1 Testexpression**

Für eine Testexpression zur Bestimmung der Induktionsparameter wurde zunächst eine 1 ml Startkultur (LB-Medium + Kanamycin + Chloramphenicol) mit etwas Material eines Glycerolstocks (2.2.4.12) inokuliert und bei 37°C und 150 rpm über Nacht aerob geschüttelt. Mit 10 µl der Startkultur wurde eine 1 ml Testexpressionskultur beimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu einer bestimmten OD<sub>600</sub> (2 / 0,6) wachsen lassen. Die Kultur wurde für 30 min auf 25°C abgekühlt und die Expression durch IPTG-Zugabe (OD<sub>600</sub> = 2: Zugabe 0,1 mM/ OD<sub>600</sub> = 0,6: Zugabe 1,0 mM) induziert. Die Expression erfolgte bei 25°C und 130 rpm über

Nacht. Durch 15 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C wurden die Bakterien geerntet. Als Kontrolle wurde ein nicht-induzierter Ansatz mitgeführt. Die erhaltenen Pellets wurden in 50 µl 1x Lämmli-Probenpuffer lysiert, geschert und 10 min bei 95°C gekocht. Der Expressionserfolg wurde via SDS-PAGE (2.2.6.3) und Coomassie-Färbung (2.2.6.4) verglichen.

Zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer eines löslichen Proteins wurde eine 80 ml Expressionskultur mit 5 ml einer Startkultur beimpft und entsprechend den zuvor ermittelten Induktionsparametern bis zu der gewünschten OD<sub>600</sub> wachsen lassen. Anschließend wurden der Kultur 2 ml als uninduzierte Kontrolle entnommen, 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und das Pellet bei -20°C aufbewahrt. Zudem wurden 20 ml für die spätere Übernachtexpression entnommen und bis zur Induktion bei 4°C aufbewahrt. Die restliche Kultur wurde mit der ermittelten Konzentration IPTG induziert und bei 25°C mit 130 rpm geschüttelt. Jeweils 2, 4 und 6 h nach Induktion wurden 10 ml des Kulturvolumens entnommen, 15 min bei 4°C und 1500 rpm zentrifugiert und die erhaltenen Pellets bei -20°C gelagert. Die Übernachtexpression der zuvor abgenommenen 20 ml erfolgte nach entsprechender Induktion unter gleichen Expressions- und Erntebedingungen. Alle Pellets wurden anschließend in 0,5 ml Lysepuffer resuspendiert und 1 h unter Schütteln bei 400 rpm und 20°C durch das im Puffer enthaltene Extraktionsreagenz chemisch lysiert. Darauf folgten 45 min Zentrifugation bei 4°C und 12000 rpm. 100 µl des Überstands wurden mit 20 µl 5x Lämmli-Probenpuffer versetzt, der verbleibende Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 100 µl 1x Lämmli-Probenpuffer resuspendiert. Nach 10 min Erhitzen bei 95°C wurden die Proben via SDS-PAGE (2.2.6.3) und Coomassie-Färbung (2.2.6.4) hinsichtlich der optimalen Expressionsdauer für die größte Menge an löslichem Protein analysiert.

#### **2.2.6.8.2 Präparative Proteinexpression**

Für die Proteinexpression in präparativem Maßstab wurde eine 30 ml Übernachtkultur mit etwas Material eines Glycerolstocks (2.2.4.12) beimpft und über Nacht aerob bei 37°C und 150 rpm geschüttelt. Mit 25 ml der Übernachtkultur wurde eine 500 ml Expressionskultur beimpft und bei 37°C und 150 rpm bis zu OD<sub>600</sub> = 0,6 wachsen lassen. Anschließend wurde die Kultur 30 min auf 25°C abgekühlt und die heterologe Expression mit 1 mM IPTG induziert. Nach der gewünschten Dauer der Expression bei 25°C und 130 rpm wurden die Bakterien durch 15 min Zentrifugation bei 6000 rpm und 4°C geerntet. Die Pellets wurden bis zur Weiterverarbeitung (2.2.6.9) bei -20°C gelagert.

## 2.2.6.9 Proteinaufreinigung

### 2.2.6.9.1 Zellaufschluss

Die nach der Expression eingefrorenen Bakterienpellets (2.2.6.8.2) wurden auf Eis aufgetaut und in 20 ml *Binding buffer* mit Additiven resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Sonifizieren der Suspension auf Eis (2x [4x 1 min, gefolgt von 1 min Pause; 1 Puls/sek], dazwischen 5 min Pause). Zum Klären wurde das Lysat 45 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend durch einen vorgekühlten 0,2 µm Filter filtriert.

### 2.2.6.9.2 Metall-Chelat-Chromatografie

Die Aufreinigung His-getaggtter Proteine aus geklärtem Bakterienlysate (2.2.6.9.1) erfolgte durch Metall-Chelat-Chromatografie bei 4°C automatisiert mit dem ÄKTApurifizier™ UPC 10, einem *Fast Liquid Protein Chromatography* (FPLC)-System. Verwendet wurde dazu eine HisTrap™ FF 1 ml Säule. Die Säule wurde mit 5 Säulenvolumen *Binding buffer* bei einer Flussrate von 1 ml/min äquilibriert. Die Proteinbindung an die Ni<sup>2+</sup>-Sepharose erfolgte, während das Lysat mit einer Flussrate von 0,3 ml/min durch die Säule gepumpt wurde. Anschließend wurde die Säule mit 15 Säulenvolumen *Binding buffer* gewaschen (1 ml/min). Die Elution der Proteine erfolgte bei einem linear ansteigenden Imidazol-Gradienten (5 - 500 mM) durch einen linear zunehmenden Anteil des *Elution buffer* über 20 Säulenvolumen (1 ml/min). Das Eluat wurde dabei in Fraktionen von je 500 µl gesammelt. Wurden von dem UV-Detektor während der Elution Protein-Peaks in dem Durchfluss identifiziert, wurden von den entsprechenden Fraktionen Proben für die SDS-PAGE (2.2.6.3) vorbereitet (5 µl Probe + 5 µl 2x Lämmli-Probenpuffer) und durch Coomassie-Färbung (2.2.6.4) visualisiert. Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereint und entweder kurzzeitig bei 4°C oder nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur Weiterverwendung (2.2.6.9.3) aufbewahrt.

### 2.2.6.9.3 Gelfiltration

In einem zweiten Aufreinigungsschritt nach der Metall-Chelat-Chromatografie (2.2.6.9.2) wurde die Reinheit der Zielproteine durch Gelfiltration optimiert. Die Proteinauftrennung erfolgte automatisiert im ÄKTA™-FPLC-System bei 4°C mit einer Superdex™ 200 10/300 GL Säule. Zunächst wurde die Proteinprobe mit einem vorgekühlten 0,2 µm Filter filtriert und

durch Zentrifugation in einem Vivaspin-Konzentrator auf ein Volumen von max. 250 µl aufkonzentriert (2.2.6.11). Die Konzentration der Proteinlösung wurde mittels Bradford Assay bestimmt (2.2.6.10.1). Abhängig von der Konzentration wurde das gesamte Probenvolumen (max. Säulenkapazität 10 mg) auf die mit PBS + 2 mM DTT äquilibrierte Säule geladen. Die Auftrennung und Elution erfolgte isokratisch in 1 Säulenvolumen PBS + 2 mM DTT bei einer Flussrate von 0,5 ml/min. Dabei wurde das Eluat in Fraktionen von 125 µl gesammelt. Von den Fraktionen, die von dem UV-Detektor innerhalb eines Protein-Peaks detektiert wurden, wurden Proben für ein SDS-Gel vorbereitet (3 µl Probe + 5 µl 1x Lämmli-Probenpuffer). Nach SDS-PAGE (2.2.6.3) und Coomassie-Färbung (2.2.6.4) wurden die positiven Fraktionen vereint und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

## **2.2.6.10 Proteinkonzentrationsbestimmung**

### **2.2.6.10.1 Bradford Assay**

Die Konzentration aufgereinigter Proteine (2.2.6.9) wurde mittels Bradford Assay unter Verwendung des *Coomassie Plus™ (Bradford) Assay Kits* bestimmt. Zunächst wurde der Albumin-Standard zubereitet, der für alle weiteren Messungen als Referenz diente. Dazu wurde die enthaltene Albumin-Lösung (2 mg/ml) seriell im Verhältnis 1:1 in dem verwendeten Proteinelutionspuffer verdünnt. Von 8 aufeinanderfolgenden Verdünnungsstufen wurden je 12,5 µl mit 375 µl Coomassie Plus Reagenz gemischt und nach 10 min Inkubation bei RT in Küvetten überführt. Nach photometrischer Messung der Verdünnungen bei 595 nm wurden den erhaltenen Extinktionswerten die bekannten Konzentrationen zugeordnet und dadurch die Standardkurve erstellt. Von der aufgereinigten Proteinprobe wurden 12,5 µl (bzw. 1 µl Probe + 11,5 µl Elutionspuffer) wie für die Standardreihe beschrieben vermessen und die Proteinkonzentration anhand der Standardkurve bestimmt.

### **2.2.6.10.2 NanoDrop**

Nach dem Pufferaustausch (2.2.6.11) wurde die Konzentration der Proteinlösungen für die ITC (2.2.6.12) mit dem NanoDrop 1000 bestimmt. Dabei wurde 1 µl der Proteinlösung gegen 1 µl des verwendeten Lösungsmittels (Analysepuffer) gemessen und der Mittelwert aus drei Einzelmessungen als die gegebene Konzentration betrachtet.

#### 2.2.6.11 Pufferaustausch und Aufkonzentrierung mit Vivaspin-Konzentratoren

Für die Aufkonzentrierung und/oder den Pufferaustausch von Proteinlösungen wurden abhängig von dem Ausgangsvolumen der Probe Vivaspin 6 (2 - 6 ml) bzw. Vivaspin 20 (6 - 20 ml) Zentrifugationskonzentratoren mit einem Molekulargewichtsausschluss von 10 kDa verwendet. Die Konzentratoren wurden bei 4°C vorgekühlt und je einmal mit dem maximalen Volumen an kaltem H<sub>2</sub>O und kaltem Puffer (bei Pufferaustausch: Zielpuffer) äquilibriert. Anschließend wurde die Proteinlösung in den Konzentrator gefüllt und bei 4°C und 4500 rpm so lange zentrifugiert, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Für einen Pufferaustausch wurde die Probe dreimal in Folge mit dem maximalen Volumen an Zielpuffer versetzt und jeweils auf ein minimales Volumen konzentriert. Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde entweder direkt weiterverwendet, bei 4°C zwischengelagert (ITC, 2.2.6.12) oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.6.12 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (*isothermal titration calorimetry*, ITC) ist eine hochsensitive Methode zur thermodynamischen Charakterisierung einer Bindung zwischen zwei Reaktionspartnern. Durch direkte Messung der freigesetzten oder absorbierten Wärme werden verschiedene thermodynamische Parameter wie die Dissoziationskonstante  $K_d$  als Maß für die Affinität der Bindung bestimmt. Die ITC wurde mit einem VP-ITC Kalorimeter der Firma MicroCal durchgeführt. Zunächst wurde bei der zu messenden Proteinlösung der Puffer gegen Analysepuffer ausgetauscht und die Probe aufkonzentriert (2.2.6.11). Von dem Proteinkonzentrat wurde anschließend mit Analysepuffer eine 2 ml Proteinlösung definierter Molarität hergestellt. Der Titrant ADP-Ribose wurde in Analysepuffer als 10 mM Stocklösung gelöst und davon ausgehend 3 ml Arbeitslösung mit 10x Molarität der jeweiligen Proteinlösung vorbereitet. Unmittelbar vor der ITC-Messung wurden Protein- und Titrant-Lösung 5 min bei 22°C entgast. Das Entgasen wie auch die weitere Vorbereitung und Durchführung der ITC-Messung wurden gemäß der Anleitung des *VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual* ausgeführt. Die experimentellen Parameter für die ITC-Messung wurden dabei über die *VPViewer 2000 Software* des Mikrokolorimeters wie folgt eingestellt:



<b>Experimental Parameters</b>		<b>Injection Parameters</b>	
Total # Injections	40	Volume ( $\mu\text{l}$ )	10
Cell Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )	25	Duration (sec)	20
Ref. Power ( $\mu\text{Cal/sec}$ )	20	Spacing (sec)	210
Initial Delay (sec)	60	Filter Period (sec)	2
Syringe Conc. (mM)	* (Cell Conc. x10)		
Cell Conc. (mM)	*	<b>Thermostat Control</b>	
Stirring Speed (rpm)	307	Set Point ( $^{\circ}\text{C}$ )	25

Die Molarität der Protein- und ADP-Ribose-Lösung variierte zwischen einzelnen Versuchsdurchführungen und wurde dementsprechend bei der Einstellung der Parameter jeweils angepasst (\*). Anschließend wurde die ITC gestartet und der Messverlauf konnte in Echtzeit auf dem Bildschirm verfolgt werden. Nach Beendigung der Messung wurden das Mikrokalorimeter sowie alle weiteren verwendeten Geräte und Materialien entsprechend der Anleitung im *VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual* gereinigt. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software Origin® in Anlehnung an den *ITC Data Analysis in Origin® Tutorial Guide*.

### 2.2.6.13 Analyse enzymatischer Ribosylierungsaktivität

Mithilfe enzymatischer ADP-Ribosylierungsuntersuchungen wurden Proteine der PARP-Familie auf mögliche Auto- oder Transribosylierungsaktivität untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in Anlehnung an Kleine *et al.* (2008), jedoch mit Verwendung von biotinyliertem statt radioaktiv markiertem  $\text{NAD}^+$  analog zu Bachran *et al.* (2007). Im Transribosylierungsassay dienten HA-Tag aufgereinigtes hZAP-L (2.2.6.7) als Substrat und kommerziell erworbene GST-PARP12 und/oder GST-PARP15 als Enzyme. Ein Reaktionsansatz wurde dabei wie folgt zusammengesetzt:

Substrat	1,0 $\mu\text{g}$
Enzym	0,5 $\mu\text{g}$
Tris-HCl, pH 8,0	50,0 mM
DTT	0,2 mM
$\text{MgCl}_2$	4,0 mM
BSA	3,0 $\mu\text{g}$
$\text{NAD}^+$ , biotinyliert	5,2 $\mu\text{M}$
$\text{H}_2\text{O}$	

Der Ansatz wurde 30 min bei 30°C inkubiert und nach Zugabe des entsprechenden Volumens an 5x Lämmli-Probenpuffer 5 min bei 98°C erhitzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde in ein SDS-Gel pipettiert und nach SDS-PAGE (2.2.6.3) und Western Blot durch serielle Immundetektion (2.2.6.5) mit verschiedenen Antikörpern, jeweils gefolgt von *Strippen* der Membran (2.2.6.6), analysiert.

#### **2.2.6.14 Messung der *Renilla* Luciferase-Aktivität**

Die Aktivität von *Renilla* Luciferase-Reporterviren wurde mit dem *Renilla Luciferase Assay System* analysiert. Die Vorgehensweise erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers nach Zelllyse gemäß der Beschreibung unter *Lysis of Cells Cultured in Multiwell Plates*. Die Lumineszenz wurde mit einem manuellen Luminometer gemessen und in *Relative Light Units* (RLUs) angegeben.

#### **2.2.6.15 Differenzielle Zellfraktionierung**

Die intrazelluläre Lokalisation bestimmter Proteine wurde durch subzelluläre Fraktionierung mit dem *Qproteome® Cell Compartment Kit* analysiert. Dafür wurden die entsprechenden Flp-In T-REx-Expressionszellen am Vortag eingesät und mit 1,5 µg/ml Dox induziert. Nach Herstellung einer Zellsuspension (2.2.1.1) und Zählen (2.2.1.3) der Zellen erfolgte die weitere Vorgehensweise gemäß dem Herstellerprotokoll für *Subcellular Fractionation of Cultured Cell Samples*. Von den erhaltenen Fraktionen wurden jeweils 100 µl mit 100 µl 2x Lämmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C erhitzt. Die Auswertung der Proben erfolgte durch Immundetektion nach Western Blot (2.2.6.5) und SDS-PAGE (2.2.6.3). Die verbleibenden Fraktionen wurden jeweils aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchung der antiviralen Aktivität des hZAP gegen Alphaviren

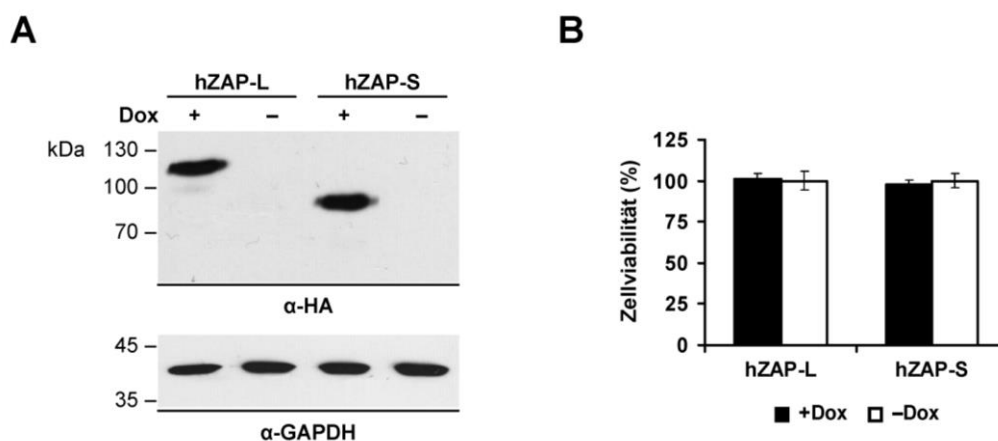
Seit der Entdeckung der antiviralen Aktivität des rZAP gegen MLV (Gao *et al.*, 2002) werden zunehmend mehr Viren identifiziert, deren Replikation durch rZAP gehemmt wird. Dazu gehören auch Vertreter der Alphaviren, unter denen das Ausmaß der rZAP-vermittelten Inhibition jedoch variiert (Bick *et al.*, 2003; MacDonald *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007). Auch hZAP besitzt antivirale Aktivität gegen verschiedene Viren, die bei Alphaviren zunächst anhand des SFV untersucht wurde (Kerns *et al.*, 2008). Dabei zeigten die beiden hZAP-Isoformen, hZAP-L und hZAP-S, ein unterschiedliches Hemmungspotenzial, wobei hZAP-L den stärkeren Inhibitor darstellte. Im Folgenden sollte das Ausmaß der hZAP-vermittelten Hemmung weiterer Alphaviren sowie das unterschiedliche Hemmungspotenzial der beiden hZAP-Isoformen detaillierter untersucht werden.

##### 3.1.1 Generierung induzierbarer hZAP-L- und hZAP-S-Expressionszelllinien

Als Voraussetzung für die Untersuchung der antiviralen Aktivität des hZAP sollten stabil transfizierte Zelllinien zur induzierbaren Expression des hZAP-L bzw. hZAP-S über das Flp-In T-REx System generiert werden. Dazu wurden die für hZAP-L und hZAP-S kodierenden Sequenzen von einem geeigneten cDNA-Klon amplifiziert und dabei mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NcoI* und *BamHI* versehen. Über diese wurden die beiden Fragmente jeweils in den Vektor pCITE-2a-HA vor die Sequenz eines C-terminalen HA-Tags integriert (Klonierungsschema siehe 8.3.1). Aus diesen Zwischenkonstrukten wurden die jeweiligen hZAP-HA-Sequenzen mit Primern reamplifiziert, die die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *NotI* enthielten. Die gewonnenen Fragmente wurden *KpnI*-/*NotI*-verdaut und in den ebenso geschnittenen Vektor pcDNA5/FRT/TO ligiert, woraus die Plasmide pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L und pcDNA5/FRT/TO-hZAP-S resultierten (Klonierungsschema siehe 8.3.1). Diese wurden jeweils mit dem Flp-Rekombinase kodierenden Vektor pOG44 in Flp-In T-REx-293 Zellen cotransfiziert. Anschließend wurden die Zellen der Selektion durch Hygromycin B ausgesetzt. Zellen ohne Flp-Rekombinase-vermittelte Rekombination erlagen spätestens nach 96 h dem Selektionsdruck, Zellen mit erfolgter Rekombination und dadurch erworbener Hygromycin-Resistenz konnten überleben und proliferieren. Nur bei weniger als 0,01% der initial

1·10<sup>6</sup> cotransfizierten Zellen fand ein solches Rekombinationsereignis statt. Nach ca. 20 Tagen waren die einzelnen resistenten Zellen zu deutlichen Zellfoki ausgewachsen, die durch gezieltes Trypsinieren gelöst, durch Umsetzen in eine separate Kulturplatte isoliert und anschließend expandiert wurden. Bei den generierten Zelllinien Flp-In T-REx-293-hZAP-L und Flp-In T-REx-293-hZAP-S war das jeweilige Transgen an demselben Genlokus unter Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promotors stabil integriert. Durch Zugabe des Tetracyclin-Derivats Dox sollte die selektiv induzierbare Expression der jeweils eingebrachten hZAP-HA-Sequenz überprüft werden. Dazu wurden die Lysate induzierter und nicht-induzierter Zellen im Western Blot mit anti-HA Antikörper getestet (Abb. 3.1A). Nur die Lysate induzierter Zellen zeigten Banden der entsprechenden Größe für hZAP-L-HA (103 kDa) bzw. hZAP-S-HA (79 kDa). Der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Nachweis in den Zelllysaten diente als Ladekontrolle zur Gewährleistung gleicher Auftragsvolumina. Dass die Viabilität der Zellen durch die Induktion oder Überexpression der jeweiligen hZAP-Isoform nicht beeinflusst wurde, konnte anhand eines MTT-Reduktions-Tests gezeigt werden (Abb. 3.1B).

Die beiden etablierten hZAP-Expressionszelllinien zeigten nach Induktion ein vergleichbares Expressionslevel der jeweiligen hZAP-Isoform und konnten somit für weitere Experimente verwendet werden.



**Abb. 3.1: Induzierbare Expression der Flp-In T-REx-293 hZAP-Zelllinien. (A)** Zelllysate ohne (-) und 24 h nach Doxycyclin-Zugabe (+) wurden auf induzierbare Expression des HA-getaggtten hZAP-L bzw. hZAP-S untersucht. Die Detektion erfolgte nach SDS-PAGE mit anti-HA Antikörper im Western Blot. Der GAPDH-Nachweis mit anti-GAPDH Antikörper diente als Ladekontrolle. **(B)** Die Viabilität induzierter (+Dox) und nicht-induzierter (-Dox) hZAP-Zellen wurde nach 24 h im MTT-Reduktions-Test verglichen. Die Werte sind in Prozent (jeweils -Dox = 100 %) als Mittelwerte  $\pm$  SD (n = 4) dargestellt.

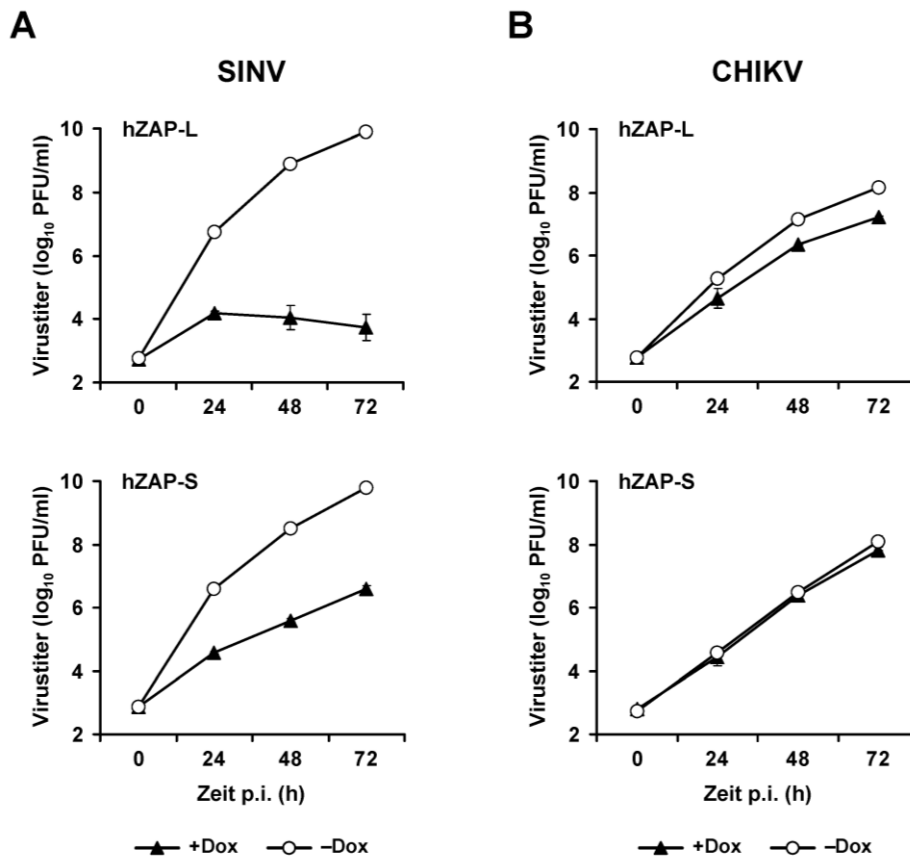
### 3.1.2 Wachstumskinetiken des SINV und CHIKV auf hZAP-Expressionszelllinien

Mithilfe der induzierbaren Expressionszelllinien sollte im Folgenden die antivirale Aktivität des hZAP gegen die beiden Alphaviren SINV und CHIKV untersucht werden. Dabei sollten auch eventuelle Unterschiede hinsichtlich der inhibitorischen Stärke beider hZAP-Isoformen bestimmt werden. Nicht-induzierte und induzierte hZAP-L- bzw. hZAP-S-Expressionszellen wurden jeweils im Doppelansatz mit dem entsprechenden Virus inokuliert (MOI 0,01) und die virale Replikation über einen Zeitraum von 72 h beobachtet.

Die Kinetiken des SINV (Abb. 3.2A) zeigten auf nicht-induzierten hZAP-L- (oben) und hZAP-S-Zellen (unten) ein gleichförmiges Viruswachstum um insgesamt 7 Log-Stufen nach 72 h. Bei hZAP-L Anwesenheit, d.h. auf induzierten Zellen, folgte auf eine anfängliche Replikation von  $5,3 \cdot 10^2$  PFU/ml auf  $1,6 \cdot 10^4$  PFU/ml (24 h p.i.) eine Reduktion des Titers auf  $8,3 \cdot 10^3$  PFU/ml (72 h p.i.). Auf hZAP-S-exprimierenden Zellen stieg der Titer dagegen von initial  $7,5 \cdot 10^2$  PFU/ml kontinuierlich auf  $4 \cdot 10^6$  PFU/ml (72 h p.i.) an. Die Virushemmung, d.h. die Differenz der logarithmierten Titer zwischen nicht-induzierten und induzierten Zellen, betrug bei hZAP-L bis zu 6 Log-Stufen, bei hZAP-S lediglich bis zu 3 Log-Stufen.

CHIKV wuchs auf nicht-induzierten hZAP-Zellen innerhalb von 72 h von jeweils ca.  $5,7 \cdot 10^2$  PFU/ml auf einen Titer von ca.  $1,5 \cdot 10^8$  PFU/ml (Abb. 3.2B). Während hZAP-L den Titer um bis zu 1 Log-Stufe reduzierte (Abb. 3.2B, oben), verursachte hZAP-S keine Restriktion des Viruswachstums (Abb. 3.2B, unten).

Insgesamt war die antivirale Aktivität des hZAP gegen SINV viel stärker ausgeprägt als gegen CHIKV. Dabei besaß hZAP-L ein jeweils größeres Hemmungspotenzial als hZAP-S.



**Abb. 3.2: Wachstumskinetik des SINV (A) und CHIKV (B) auf hZAP-Expressionszelllinien.** (A) Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L (oben) und Flp-In T-REx-293-hZAP-S Zellen (unten) wurden jeweils im Doppelansatz mit SINV infiziert (MOI 0,01). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein. (B) Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L (oben) und Flp-In T-REx-293-hZAP-S Zellen (unten) wurden jeweils im Doppelansatz mit CHIKV infiziert (MOI 0,01). Die Bestimmung und Darstellung der Kinetiken entspricht der Beschreibung in (A).

### 3.1.3 Hemmung verschiedener Alphaviren durch hZAP

Die Resultate aus Abschnitt 3.1.2 sowie vorangegangene Studien mit rZAP (Bick *et al.*, 2003) geben eine unterschiedliche inhibitorische Aktivität des ZAP gegen verschiedene Alphaviren zu erkennen. Zur Überprüfung dieser Beobachtung sollte die Hemmung weiterer Alphaviren durch hZAP untersucht und miteinander verglichen werden.

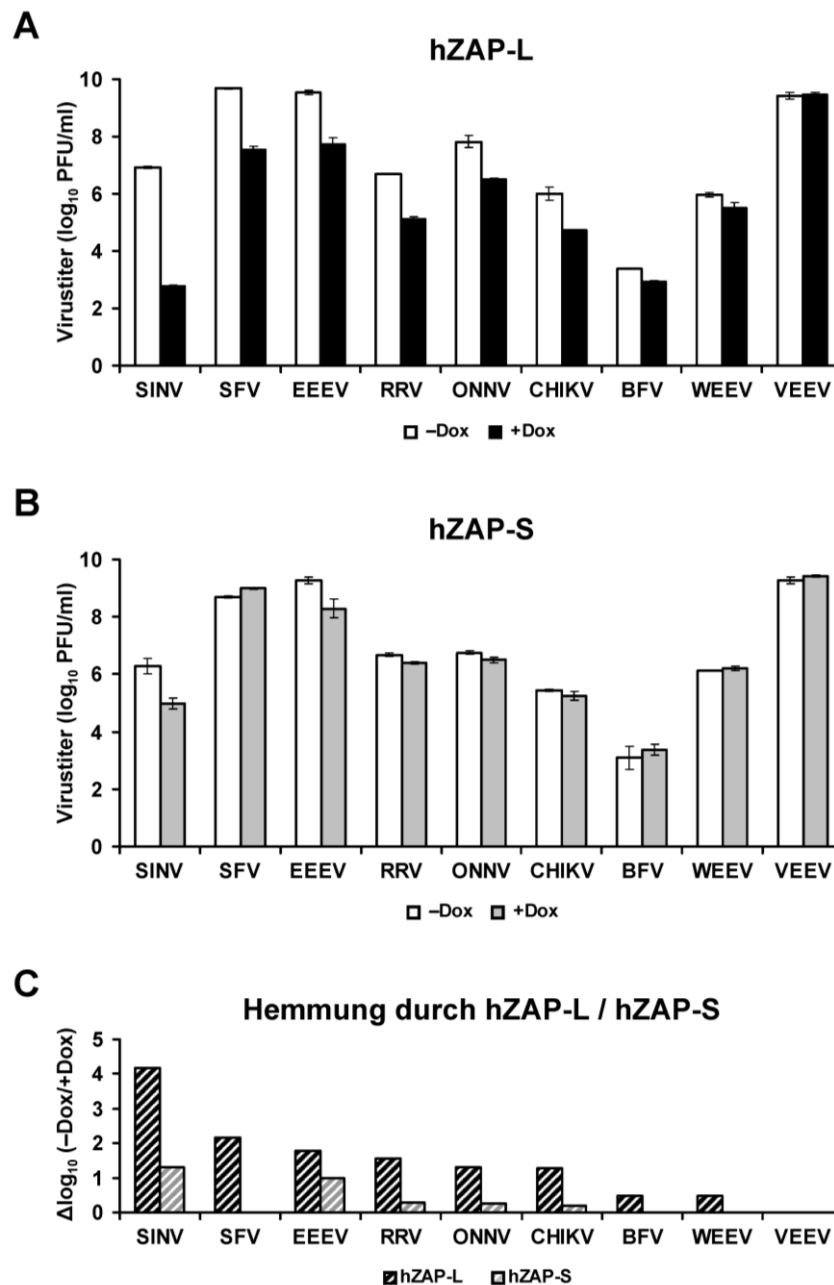
Dazu wurden in parallelen Infektionsansätzen nicht-induzierte und induzierte Flp-In T-REx-hZAP-L bzw. -hZAP-S Zellen jeweils im Doppelansatz mit BFV, CHIKV, EEEV, ONNV, RRV, SFV, SINV, VEEV und WEEV infiziert (MOI 0,01). Die Zellkulturüberstände wurden 48 h p.i. geerntet und die Virustiter mittels Plaqueassay bestimmt. Wie bei rZAP variierte auch das

Ausmaß der Inhibition des hZAP. Abb. 3.3A zeigt die Virustiter auf nicht-induzierten und induzierten Zellen in der Reihenfolge abnehmender Hemmung durch hZAP-L. Die Stärke der Hemmung wurde dabei über den Titerunterschied zwischen nicht-induzierten und induzierten Zellen ermittelt.

Am ausgeprägtesten war der antivirale Effekt des hZAP-L gegen SINV. Nach hZAP-L-Induktion betrug der Titer des SINV  $5,8 \cdot 10^2$  PFU/ml im Vergleich zu  $8,5 \cdot 10^6$  PFU/ml auf nicht-induzierten Zellen. Bei SFV wurde der Virustiter von  $4,8 \cdot 10^9$  PFU/ml auf  $3,5 \cdot 10^7$  PFU/ml durch hZAP-L-Überexpression verringert. EEEV, RRV, ONNV und CHIKV wurden mit jeweils abnehmender Stärke durch hZAP-L gehemmt. Die hZAP-L-vermittelte Restriktion des BFV und WEEV war nur sehr gering, während gegen VEEV keine restriktive Aktivität detektiert werden konnte.

Auch hZAP-S besaß die stärkste antivirale Aktivität gegen SINV, minderte den Titer aber lediglich von  $2,3 \cdot 10^6$  PFU/ml auf  $1 \cdot 10^5$  PFU/ml (Abb. 3.3B). EEEV, RRV, ONNV und CHIKV wuchsen nach hZAP-S-Induktion nur geringfügig schlechter, während das Wachstum des SFV, BFV, WEEV und VEEV gar nicht von hZAP-S beeinträchtigt wurde.

Im direkten Vergleich der Hemmungsstärken beider hZAP-Isoformen bestätigte sich, dass, ausgenommen für VEEV, welches weder von hZAP-L noch von hZAP-S gehemmt wurde, hZAP-L stets den stärkeren Inhibitor repräsentierte (Abb. 3.3C). Zudem stimmte die Reihenfolge der Viren in Bezug auf die Hemmungsstärke weitestgehend für beide hZAP-Isoformen überein. Die unterschiedliche Sensitivität der einzelnen Alphaviren gegenüber der hZAP-vermittelten Inhibition zeigte, dass auch im Überexpressionssystem kein genereller antiviraler Status in den Zellen durch hZAP etabliert wurde.



**Abb. 3.3: Wachstum verschiedener Alphaviren auf hZAP-Expressionszelllinien 48 h p.i.** (A) Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den verschiedenen Alphaviren infiziert (MOI 0,01). Die Virustiter 48 h p.i. wurden durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. (B) Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-S Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den verschiedenen Alphaviren infiziert (MOI 0,01). Die Bestimmung und Darstellung der Daten entspricht der Beschreibung in (A). (C) Vergleich der Hemmungslevel der einzelnen Alphaviren durch hZAP-L und hZAP-S. Dargestellt sind die Differenzen zwischen den mittleren, logarithmierten Titern auf nicht-induzierten und induzierten Zellen aus (A) und (B).



## 3.2 Untersuchung der antiviralen Aktivität des endogenen hZAP-L

Das vorangegangene Infektionsexperiment bestätigte die Beobachtung von Kerns *et al.* (2008), dass hZAP-L einen stärkeren Inhibitor gegen Alphaviren darstellt als hZAP-S. Allerdings wurde in beiden Fällen vornehmlich der Einfluss von überexprimiertem hZAP untersucht. Im Folgenden sollte auch die restriktive Aktivität des endogenen hZAP-L charakterisiert werden, das die hier verwendeten Flp-In T-REx-293 Zellen als Derivate humaner embryonaler Nierenzellen (HEK) 293-Zellen ebenfalls exprimieren. Dazu wurde die Translation des endogenen, konstitutiv exprimierten hZAP-L (Hayakawa *et al.*, 2011) über den Mechanismus der RNA-Interferenz supprimiert. Nach Infektion der *knockdown*-Zellen wurde analysiert, ob das Viruswachstum durch die Abwesenheit des hZAP-L gefördert wird.

### 3.2.1 Etablierung des siRNA-vermittelten *knockdown* des hZAP-L

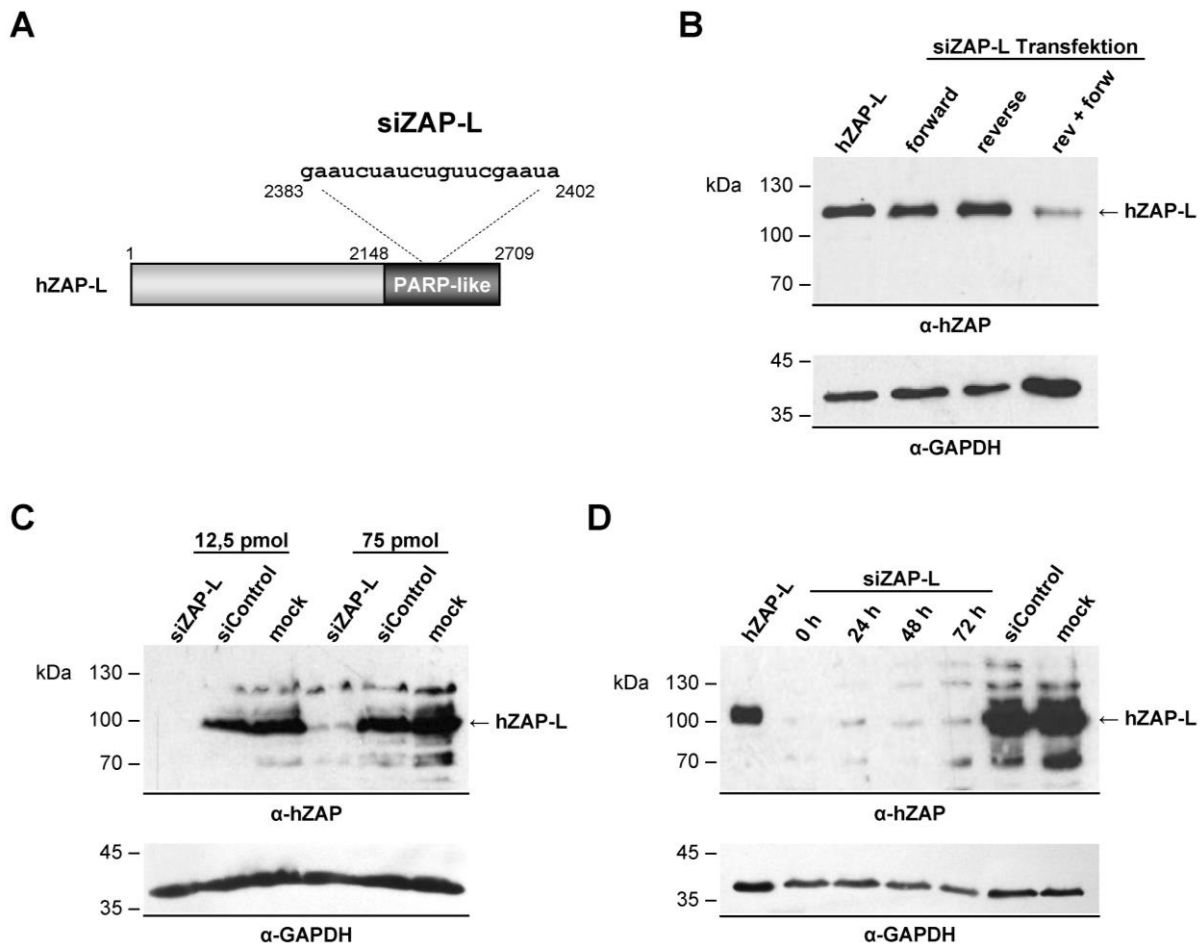
Zur selektiven Regulation des hZAP-L wurde eine *small interfering* RNA (siRNA) konstruiert, die innerhalb der PARP-ähnlichen Domäne an den Nukleotidbereich (nt) 2383 - 2402 bindet (siZAP-L; Abb. 3.4A). Da die Sequenz in der hZAP-S-mRNA nicht vorhanden ist, wird diese im Gegensatz zu der hZAP-L-mRNA nicht degradiert und die hZAP-S-Expression somit nicht beeinflusst.

Für einen effektiven *knockdown* des Zielgens mussten zunächst die optimalen Transfektionsparameter bestimmt werden. Zuerst wurde die Transfektionsrichtung für eine effiziente Aufnahme der siRNA in die Zellen ermittelt, wobei zwischen *forward* und *reverse* Transfektion unterschieden wird. Die Vorgehensweisen variieren hinsichtlich der Reihenfolge und des Zeitpunktes der Zugabe von siRNA, Transfektionsreagenz und Zellen. Bei der *forward* Transfektion werden zunächst die Zellen eingesät, bevor die komplexierte Mischung aus siRNA und Transfektionsreagenz am Folgetag zu den adhären, proliferierenden Zellen gegeben wird. Bei der *reverse* Transfektion wird die Zellsuspension direkt in den siRNA-Transfektionsmix gemischt und dadurch der Zeitaufwand um einen Tag reduziert. Zusätzlich zu der *forward* und *reverse* Transfektion wurde auch eine Kombination beider Protokolle getestet, d.h. 48 h nach der *reverse* Transfektion wurden dieselben Zellen mit gleicher Menge siRNA (75 pmol) *forward* transfiziert (Yi *et al.*, 2011). Zur Beurteilung des *knockdown* wurden 48 h nach (der zweiten) Transfektion Zelllysate präpariert und im Western Blot mit dem hZAP-spezifischen anti-hZAP Antikörper detektiert. Dieser Vorversuch

wurde mit induzierten Flp-In T-REx-hZAP-L Zellen durchgeführt, um eventuelle Effekte der verschiedenen Transfektionsrichtungen deutlicher hervorzuheben. Die stärkste Reduktion auf Proteinebene wurde nach serieller *reverse/forward* Transfektion erzielt (Abb. 3.4B). Die Intensität der hZAP-L-Bande war hier verglichen zu den beiden Einzeltransfektionen deutlich reduziert, wenn auch wegen der starken Induktion nicht ganz verschwunden. Der GAPDH-Nachweis diente zur Relativierung der Auftragsvolumina, Zellysat aus hZAP-L-überexprimierenden Zellen als Referenz der Laufhöhe.

Neben der Transfektionsrichtung ist auch die Menge der applizierten siRNA für die Transfektionseffizienz entscheidend. Demzufolge wurde die Effizienz des *knockdown* von endogenem hZAP-L in Flp-In T-REx-293 Zellen verglichen, nachdem die Zellen mit 12,5 pmol bzw. 75 pmol siRNA *reverse/forward* transfiziert wurden. Als Kontrollen wurden Transfektionen mit negativer Kontroll-siRNA oder nur Transfektionsreagenz durchgeführt, um Nebeneffekte der siRNA oder des Transfektionsreagenz auf die Zellen auszuschließen. Während die Auftragsvolumina einheitlich und das hZAP-L-Level der Kontroll-Transfektionen vergleichbar waren, war die siRNA-vermittelte Proteinreduktion bei Verwendung von 12,5 pmol siRNA effektiver als bei 75 pmol siRNA (Abb. 3.4C).

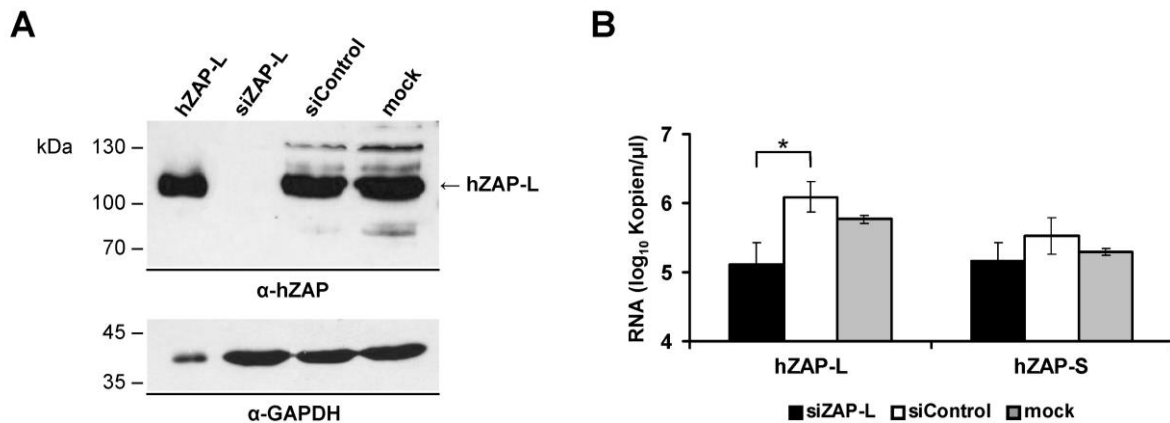
Zuletzt sollte unter Berücksichtigung der zuvor festgelegten Transfektionsbedingungen die Dauer des *knockdown* ermittelt werden. Dazu wurden neben den Kontroll-Transfektionen vier gleiche siZAP-L-Ansätze vorbereitet und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten lysiert. Das erste Lysat wurde 48 h nach der *forward* Transfektion präpariert und als 0 h-Probe bezeichnet, da dieser Zeitpunkt dem Zeitpunkt 0 h in Anschlussexperimenten wie beispielsweise einer Infektion entspräche. Die drei anderen Lysate wurden jeweils im Abstand von 24 h hergestellt. Der mit anti-hZAP Antikörper detektierte Western Blot in Abb. 3.4D zeigt, dass während des gesamten Untersuchungszeitraums von 72 h, d.h. 120 h nach *forward* Transfektion, die hZAP-L-Translation effektiv supprimiert wurde.



**Abb. 3.4: Etablierung des siRNA-vermittelten knockdown des endogenen hZAP-L.** (A) Nukleotidsequenz der hZAP-L-spezifischen siRNA (siZAP-L) und schematische Darstellung deren Bindungsregion innerhalb der hZAP-L-Sequenz. (B) Bestimmung der siRNA-Transfektionsrichtung. Induzierte Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden mit 75 pmol siZAP-L *forward* oder *reverse* bzw. *reverse + forward* transfiziert. Nach 48 h wurde die hZAP-L-Expression in den Zelllysaten nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-hZAP Antikörper überprüft. Das Lysat induzierter Zellen (hZAP-L) diente als Positivkontrolle, der GAPDH-Nachweis mit anti-GAPDH Antikörper als Ladekontrolle. (C) Bestimmung der einzusetzenden siRNA-Menge. Flp-In T-REx-293 Zellen wurden mit 12,5 pmol bzw. 75 pmol siZAP-L *reverse/forward* transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression des endogenen hZAP-L in den Zelllysaten nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-hZAP Antikörper überprüft. Als Kontrollen dienten Lysate von Zellen nach Transfektion mit negativer Kontroll-siRNA (siControl) bzw. untransfizierter Zellen (mock). Der GAPDH-Nachweis mit anti-GAPDH Antikörper diente als Ladekontrolle. (D) Überprüfung der knockdown-Dauer. Flp-In T-REx-293 Zellen wurden mit 12,5 pmol siZAP-L *reverse/forward* transfiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und die endogene hZAP-L-Expression nach SDS-PAGE im Western Blot überprüft. Der Untersuchungszeitraum begann 48 h nach dem zweiten Transfektionsschritt (= 0 h). Die Detektion und Kontrollen entsprechen der Beschreibung aus (C).

### 3.2.2 Überprüfung des hZAP-L-*knockdown* auf Protein- und mRNA-Ebene

Mit den optimierten Parametern für die siRNA-Transfektion sollte der effektive und selektive *knockdown* des endogenen hZAP-L in Flp-In T-REx-293 Zellen auf Proteinebene verifiziert werden. Dazu wurden die Zellen in einem Intervall von 48 h zuerst *reverse* und anschließend *forward* mit 12,5 pmol hZAP-L-spezifischer siRNA transfiziert und nach weiteren 48 h lysiert. Als Kontrollen dienten mit negativer Kontroll-siRNA oder *mock* transfizierte Zellen. Die Detektion mit anti-hZAP Antikörper im Western Blot bestätigte den erfolgreichen *knockdown* der hZAP-L-Expression bei gleichen Auftragsvolumina (Abb. 3.5A). Obwohl mit dem anti-hZAP Antikörper überexprimiertes hZAP-S detektiert werden konnte (Daten nicht gezeigt), genügte die Sensitivität nicht zum Nachweis des endogenen hZAP-S. Grund dafür ist vermutlich das geringe intrinsische Expressionsniveau des hZAP-S, welches durch IFN aufreguliert wird (Hayakawa *et al.*, 2011). Dennoch sollte neben der Effektivität auch die Spezifität des hZAP-L-*knockdown* demonstriert werden. Eine geeignete Methode dafür war die quantitative Überprüfung der hZAP-Varianten auf mRNA-Ebene. Dazu wurde eine hZAP-spezifische *Dual-Color Real-time* RT-PCR etabliert, die eine spezifische, simultane Detektion der hZAP-L- und hZAP-S-mRNAs erlaubt (Gläsker *et al.*, 2014; Töller, 2012). Flp-In T-REx-293 Zellen wurden jeweils im Dreifachansatz mit hZAP-L-spezifischer siRNA, negativer Kontroll-siRNA oder *mock reverse/forward* transfiziert. Nach 48 h wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die Anzahl der mRNA-Kopien beider hZAP-Isoformen mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR bestimmt. Parallel dazu wurde mit einer GAPDH-spezifischen *Real-time* RT-PCR die jeweilige GAPDH-mRNA-Konzentration ermittelt (Pfefferle *et al.*, 2009), um so die einheitliche Zugabe von Gesamtzell-RNA zu allen Reaktionsansätzen zu verifizieren (Daten nicht gezeigt). Anhand der Quantifizierung der PCR-Resultate wurde deutlich, dass das zelluläre hZAP-L-mRNA-Level nach Transfektion mit spezifischer siRNA signifikant reduziert wurde, während die hZAP-S-mRNA unbeeinflusst blieb (Abb. 3.5B). Somit wurde die Spezifität des *knockdown* auf der Transkriptionsebene demonstriert.



**Abb. 3.5: Nachweis des siRNA-vermittelten hZAP-L-knockdown auf Protein- und mRNA-Ebene. (A)** Flp-In T-REx-293 Zellen wurden mit 12,5 pmol hZAP-L-spezifischer siRNA (siZAP-L) *reverse/forward* transfiziert. Nach 48 h wurde die Expression des endogenen hZAP-L in den Zelllysaten nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-hZAP Antikörper überprüft. Als Kontrollen dienten Lysate von Zellen nach Transfektion mit negativer Kontroll-siRNA (siControl) bzw. untransfizierter Zellen (mock). Lysat induzierter Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen (hZAP-L) diente zur Kontrolle der Laufhöhe des hZAP-L, der GAPDH-Nachweis mit anti-GAPDH Antikörper diente als Ladekontrolle. **(B)** Flp-In T-REx-293 Zellen wurden wie in (A) beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden Gesamtzell-RNA-Extrakte hergestellt und die Kopienzahl der hZAP-L bzw. hZAP-S-mRNA via quantitativer *Real-time* RT-PCR bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte der logarithmierten RNA-Konzentrationen  $\pm$  SD (n = 3). \* p < 0.05.

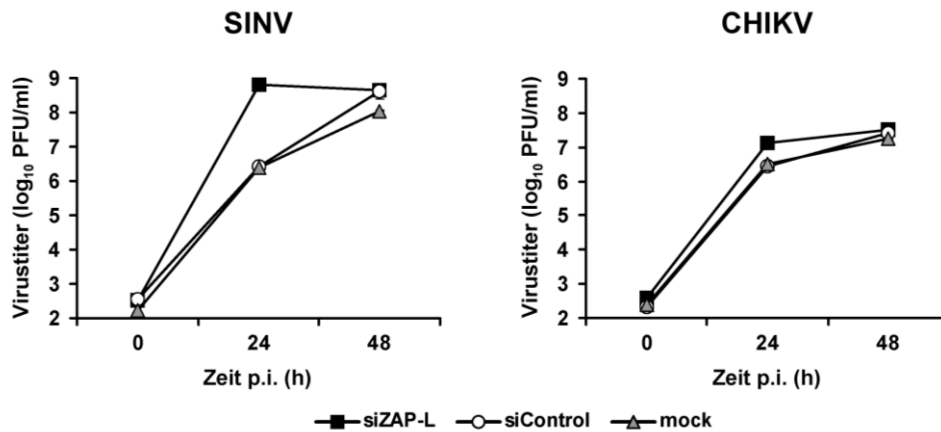
### 3.2.3 Wachstumskinetiken des SINV und CHIKV auf hZAP-L-knockdown-Zellen

Nachdem die selektive und effiziente hZAP-L-Reduktion auf Protein- bzw. mRNA-Ebene bestätigt wurde, sollte ein potenzieller Effekt des *knockdown* auf das Replikationsverhalten des SINV und CHIKV analysiert werden.

Dazu wurden hZAP-L-*knockdown*-Zellen und Kontrollzellen (mit negativer Kontroll-siRNA bzw. *mock* transfiziert) 48 h nach dem zweiten Transfektionsschritt jeweils im Doppelansatz mit SINV bzw. CHIKV infiziert (MOI 0,01). Die Virustiter in Überstandproben 24 h p.i. und 48 h p.i. wurden durch Plaquetitration auf BHK-J Zellen bestimmt.

Verglichen zu den Kontrollzellen zeigten beide Viren 24 h p.i. ein gesteigertes Wachstum auf den hZAP-L-*knockdown*-Zellen (Abb. 3.6). Die Wachstumssteigerung bei SINV, das generell stärker durch hZAP-L gehemmt wird als CHIKV, war mit 2,5 Log-Stufen deutlich ausgeprägter als bei CHIKV mit 0,6 Log-Stufen. Auch das Replikationsplateau beider Viren war auf den *knockdown*-Zellen bereits 24 h p.i. erreicht, wohingegen sich die Titer auf den Kontrollzellen diesem Wert erst nach 48 h annäherten.

Insgesamt demonstrieren diese Resultate, dass auch das endogene hZAP-L effektive antivirale Aktivität gegen die alphavirale Replikation besitzt.



**Abb. 3.6: Wachstum des SINV und CHIKV auf hZAP-L-knockdown-Zellen.** Flp-In T-REx-293 Zellen wurden 48 h nach Transfektion mit hZAP-L-spezifischer siRNA (siZAP-L), negativer Kontroll-siRNA (siControl) oder nur Transfektionsreagenz (mock) jeweils im Doppelansatz mit SINV (links) oder CHIKV (rechts) infiziert (MOI 0,01). Die Virustiter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten durch Plaquetitration von Überstandproben auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein.

### 3.3 Bedeutung der PARP-ähnlichen Domäne für die antivirale Aktivität des hZAP-L

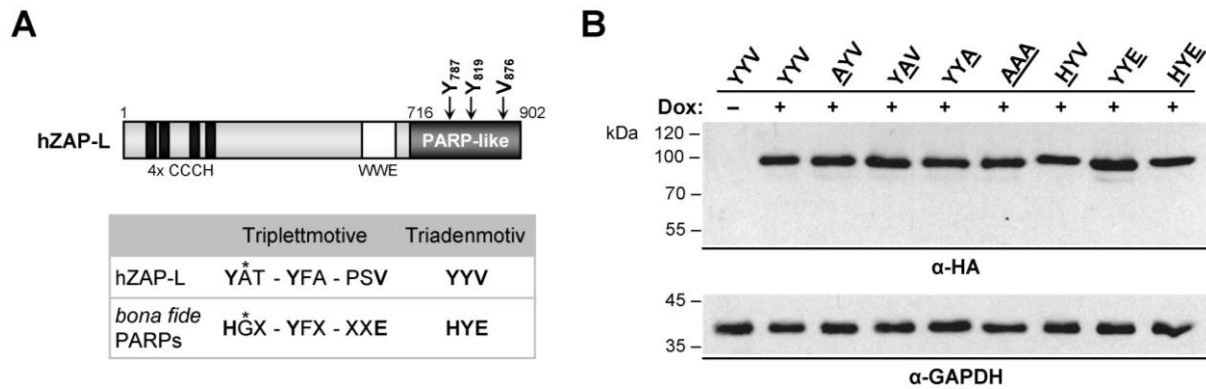
Zusammen mit der Studie von Kerns *et al.* (2008) bestätigen die Resultate der vorangegangenen Abschnitte die stärkere antivirale Aktivität des hZAP-L im Vergleich zu hZAP-S. Der Grund für diesen Aktivitätsunterschied ist jedoch noch nicht erforscht. Die beiden Isoformen unterscheiden sich lediglich durch die zusätzliche, C-terminale PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L. Aufgrund des veränderten Triadenmotivs (YYV) wird der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L in der Literatur keine Aktivität beigemessen (Kleine *et al.*, 2008; Leung *et al.*, 2011a) oder sie sogar als funktionslos und entbehrlich bezeichnet (Mao *et al.*, 2013). Dennoch sollte hier ein potenzieller Einfluss der einzelnen Triaden-Aminosäuren auf die antivirale Aktivität des hZAP-L untersucht werden. Dazu sollten die Aminosäuren des hZAP-L-Triadenmotivs einzeln und in Kombination gegen Alanin bzw. die Aminosäuren des *bona fide*-Triadenmotivs (HYE) katalytisch aktiver PARPs (Hottiger *et al.*, 2010; Kleine *et al.*, 2008) ausgetauscht werden. Analog zu den hZAP-L- und hZAP-S-Flp-In T-REx Zellen (siehe Abschnitt 3.1.1) sollten auch von den Triadenmotiv-Mutanten des hZAP-L stabile, induzierbare Expressionszelllinien generiert und deren inhibitorisches Potenzial auf das Viruswachstum untersucht werden.

### 3.3.1 Generierung induzierbarer Expressionszelllinien der hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten

Das Triadenmotiv YYV des hZAP-L (Abb. 3.7A, oben) sollte für die Alanin-Mutanten durch die Varianten AYV, YAV, YYA sowie AAA und für die Mutanten des *bona fide*-Triadenmotivs (HYE) durch die Varianten HYV, YYE sowie HYE ersetzt werden (mutierte Aminosäuren jeweils unterstrichen). Hierbei wurden nicht nur die einzelnen Triadenmotiv-Aminosäuren berücksichtigt, sondern alle konservierten Aminosäuren der drei Triplettmotive, aus denen sich das Triadenmotiv ableitet (Abb. 3.7A, unten). Bei *bona fide*-PARPs sind innerhalb des ersten Triplettmotivs (**HGX**; Triadenmotiv-Aminosäure fettgedruckt) sowohl Histidin als auch Glycin konserviert. In den hZAP-L Triadenmutanten HYV und HYE wurde daher zusätzlich zu dem Histidin auch das Glycin des ersten Triplettmotivs eingebracht, d.h. das erste Triplettmotiv YAT des hZAP-L zu HGT ausgetauscht. Da das zweite Triplettmotiv (YFX) zwischen hZAP-L und *bona fide*-PARPs übereinstimmt, mussten hier keine Mutanten generiert werden. Im dritten Triplettmotiv (XXE) ist in *bona fide*-PARPs nur die funktionell kritische Glutaminsäure konserviert, so dass in den hZAP-L Triadenmutanten YYE und HYE nur das Valin zu Glutaminsäure ausgetauscht wurde.

Die Klonierung der Triadenmutanten erfolgte durch Mutagenese-/Fusions-PCRs auf Basis des Plasmids pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L (Klonierungsschema siehe 8.3.2). Die resultierenden PCR-Fragmente und das pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L Vektorrückgrat wurden nach Restriktion mit den Enzymen *AgeI* und *NotI* miteinander ligiert. Die Cotransfektion der Flp-In T-REx-293 Zellen und die anschließende Selektion während der Erzeugung entsprechender Expressionszelllinien erfolgte wie in Abschnitt 3.1.1 beschrieben. Nach Isolierung und Expansion resistenter, d.h. erfolgreich rekombinierter Einzelzellklone wurde die Dox-induzierbare Expression der verschiedenen hZAP-L-Varianten im Western Blot mit anti-HA Antikörper überprüft (Abb. 3.7B). Gleiche Auftragsvolumina der Zelllysate wurden parallel durch GAPDH-Detektion nachgewiesen.

Die generierten Zelllinien zeigten nach Induktion ein einheitliches Expressionslevel der verschiedenen hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten und waren daher für die anschließende Durchführung vergleichender Infektionsstudien geeignet.



**Abb. 3.7: Triadenmotiv-Mutanten des hZAP-L. (A)** Schematische Darstellung der Proteindomänen des hZAP-L mit den Positionen der drei Triadenmotiv-Aminosäuren in der PARP-ähnlichen Domäne (PARP-like). Die Tabelle zeigt die drei Triplettmotive und die sich daraus ableitenden Triadenmotive (fettgedruckt) des hZAP-L und von *bona fide*-PARPs. \* markiert die zusätzlich ausgetauschte Aminosäure bei Mutante HYV und HYE. **(B)** Expression der verschiedenen hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten. Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die jeweilige Mutation des Triadenmotivs an. Die verschiedenen stabil transfizierten Flp-In T-REx-293 Zelllinien wurden durch Doxycyclin-Zugabe (+) induziert. Nach 24 h wurde die Expression der HA-getaggten hZAP-L-Varianten in den Zelllysaten nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-HA Antikörper untersucht. Ein Lysat nicht-induzierter (-) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen (YYV) diene als Negativkontrolle, der GAPDH-Nachweis mit anti-GAPDH Antikörper als Ladekontrolle.

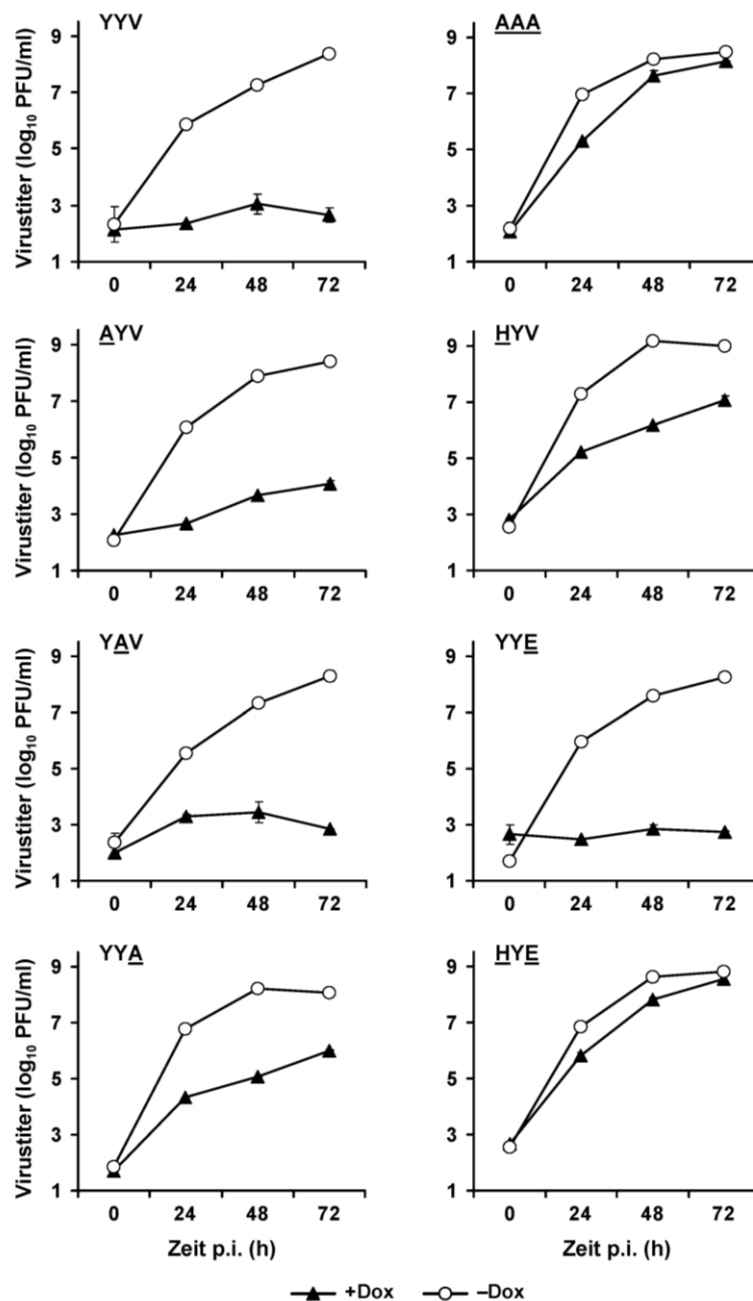
### 3.3.2 Hemmung des SINV und CHIKV durch die Triadenmotiv-Mutanten

Anhand paralleler Infektionsansätze der verschiedenen Triadenmotiv-Zelllinien mit SINV bzw. CHIKV sollten mögliche Auswirkungen der Mutationen auf das Viruswachstum untersucht und damit Rückschlüsse auf die Bedeutung der jeweiligen Aminosäure für die antivirale Aktivität des hZAP-L gezogen werden.

In einer ersten Versuchsserie wurden die verschiedenen induzierten und nicht-induzierten Zelllinien im Doppelansatz mit SINV infiziert (MOI 0,1). Die Virustiter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion durch Plaquetitration auf BHK-J Zellen bestimmt. In Abb. 3.8 sind die Wachstumskinetiken des SINV auf den Alanin-mutierten und den *bona fide*-Triadenmotiv-substituierten hZAP-L-Varianten dargestellt. Im Vergleich zu wt hZAP-L (YYV) wurde der antivirale Effekt nach Mutation der ersten- oder zweiten Triaden-Aminosäure zu Alanin kaum (AYV) oder gar nicht (YAV) verändert. Nach Austausch der dritten Aminosäure des Triadenmotivs gegen Alanin (YYA) wies hZAP-L hingegen eine deutlich eingeschränkte antivirale Aktivität auf. Durch kollektive Mutation aller drei Triaden-Aminosäuren zu Alanin (AAA) wurde die hZAP-L-vermittelte Virushemmung nahezu komplett aufgehoben.



Während die Aktivität des hZAP-L durch Austausch der dritten Aminosäure zu Glutaminsäure (YYE) nicht beeinflusst wurde, wurde sie durch Austausch der ersten Aminosäure zu Histidin (HYV) deutlich verringert. Die Insertion des PARP-typischen Triadenmotivs (HYE) führte zu einem fast vollständigen Verlust der inhibitorischen hZAP-L-Aktivität.

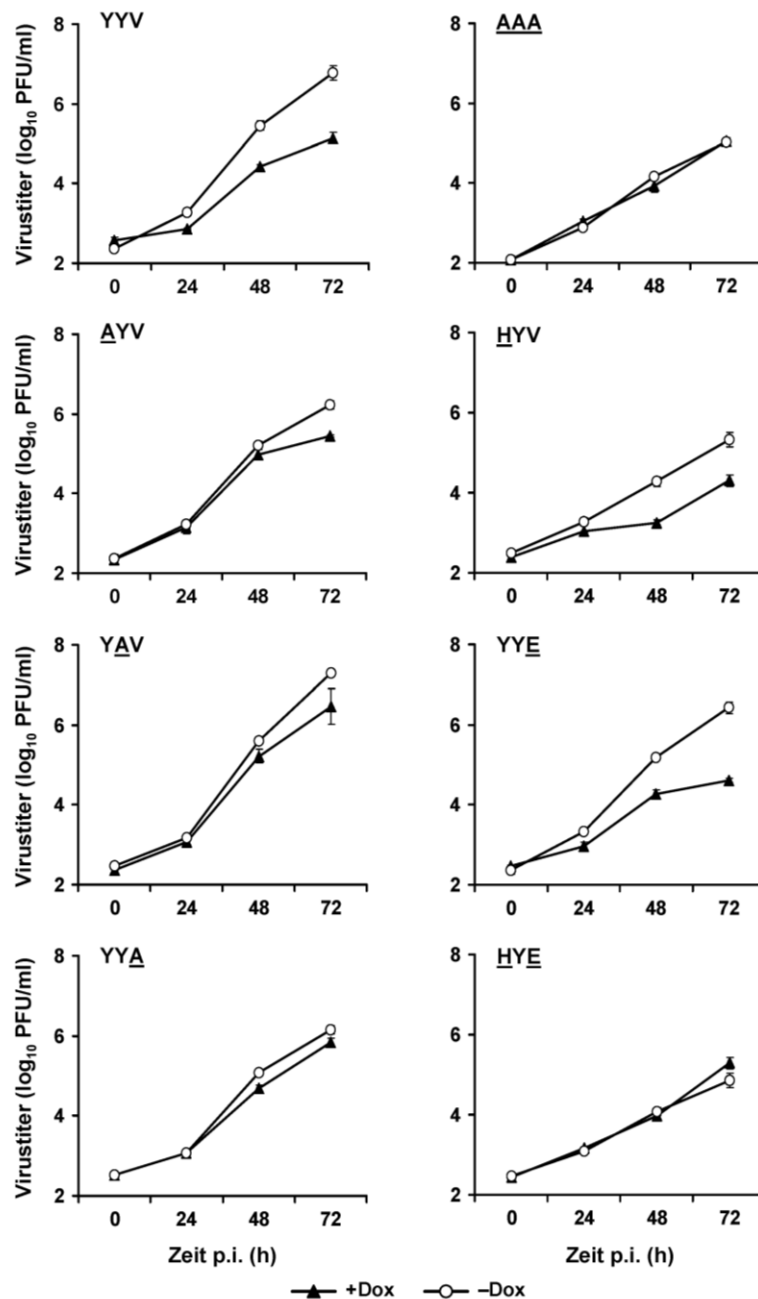


**Abb. 3.8: Wachstumskinetiken des SIN V auf hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten-exprimierenden Flp-In T-REx-293 Zelllinien.** Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Zellen der verschiedenen Triadenmutanten-Zelllinien wurden jeweils im Doppelansatz mit SIN V infiziert (MOI 0,1). Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die jeweilige Mutation des Triadenmotivs an. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein.

Entgegen den allgemeinen Vermutungen belegen diese Resultate eindeutig die Relevanz des Triadenmotivs für die antivirale Aktivität des hZAP-L.

In einer zweiten Infektionsserie wurden die Triadenmutanten-Zelllinien in analoger Vorgehensweise mit CHIKV infiziert (MOI 0,01). Aufgrund der generell geringeren Hemmung des CHIKV durch hZAP-L wurde im Gegensatz zu der Infektionsstudie mit SINV eine niedrigere MOI von 0,01 gewählt. Die inhibitorische Aktivität der verschiedenen hZAP-L-Varianten gegen CHIKV wurde anschließend anhand der Virustiter analysiert.

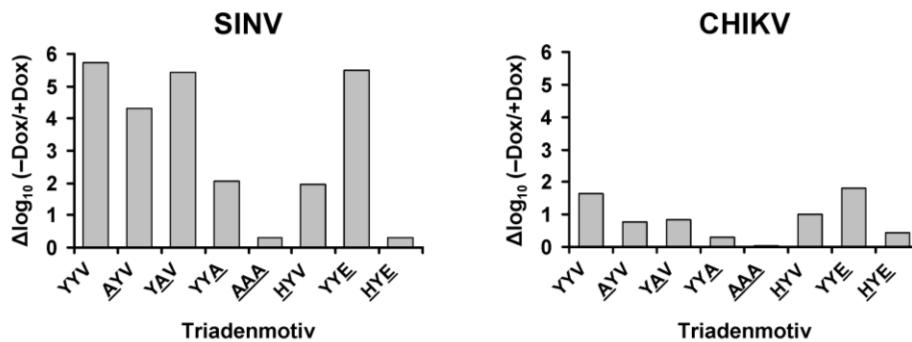
Die antivirale Aktivität der Alanin-Einzelmutanten (AYV, YAV, YYA) war, vor allem nach Mutation der dritten Triaden-Aminosäure, deutlich eingeschränkt und die der Tripelmutante (AAA) nahezu komplett verschwunden (Abb. 3.9). Ebenfalls im Einklang mit den Beobachtungen der SINV Infektion bewirkte die Substitution des Valins im Triadenmotiv durch Glutaminsäure (YYE) keine Aktivitätsänderung. Außerdem war auch hier nach Mutation des Histidins (HYV) eine leichte und nach Austausch des kompletten Triadenmotivs (HYE) eine fast vollständige Reduktion der antiviralen Aktivität des hZAP-L zu erkennen.



**Abb. 3.9: Wachstumskinetiken des CHIKV auf hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten-exprimierenden Flp-In T-REx-293 Zelllinien.** Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Zellen der verschiedenen Triadenmutanten-Zelllinien wurden jeweils im Doppelansatz mit CHIKV infiziert (MOI 0,01). Die unterstrichenen Aminosäuren zeigen die jeweilige Mutation des Triadenmotivs an. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein.

Die Hemmungsstärken der verschiedenen hZAP-L-Varianten gegen SINV und CHIKV sind für den Zeitpunkt 72 h p.i. in Abb. 3.10 gegenübergestellt. Der Vergleich beider Infektionsserien verdeutlicht, dass die Aktivität der Einzelmutanten (v.a. YYA) gegen beide Viren meist reduziert war, während die Mehrfachmutanten fast keine inhibitorische Aktivität mehr

aufwiesen. Die Hemmung gegen CHIKV war dabei generell geringer als gegen SINV (siehe auch Abschnitt 3.1.2). Die reduzierte Aktivität der Triadenmutanten war demnach nicht virusspezifisch, da sie sowohl bei SINV als auch bei CHIKV beobachtet werden konnte.



**Abb. 3.10: Vergleich der Hemmung des SINV und CHIKV durch die verschiedenen hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten 72 h p.i.** Dargestellt sind die Hemmungslevel des SINV (links) und CHIKV (rechts) als Differenzen zwischen den mittleren, logarithmierten Virustitern auf nicht-induzierten und induzierten hZAP-L Triadenmotiv-Mutanten-exprimierenden Zellen für den Zeitpunkt 72 h p.i. aus Abb. 3.8 (SINV) und Abb. 3.9 (CHIKV).

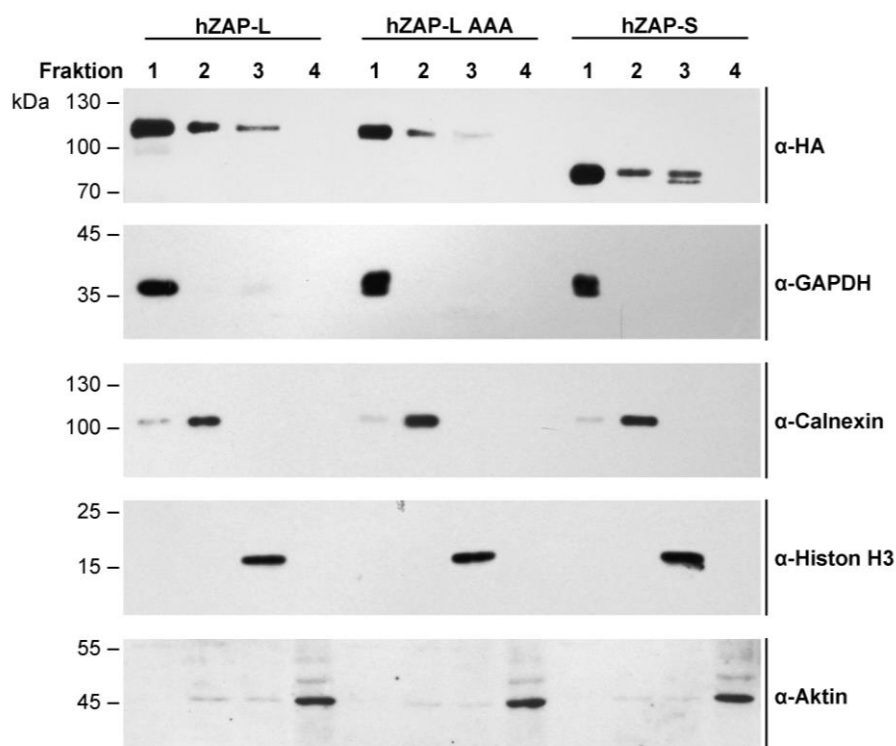
### 3.3.3 Subzelluläre Lokalisation des hZAP-S, hZAP-L und der Triadenmotiv-Mutante AAA

Da die inhibitorische Aktivität der Einzelmutanten des Triadenmotivs meist nur reduziert, die der Mehrfachmutanten aber fast vollständig verloren war, könnte durch den gleichzeitigen Austausch mehrerer Aminosäuren die korrekte Proteinfaltung gestört und dadurch die Konformation verändert worden sein. Dies wiederum könnte die subzelluläre Proteinlokalisierung beeinflussen und hZAP so von der Virushemmung abhalten. Um dieser Hypothese nachzugehen, sollte die subzelluläre Lokalisation des hZAP-S, hZAP-L und der hZAP-L Triadenmotiv-Mutante AAA untersucht werden.

Durch differenzielle Fraktionierung wurden jeweils induzierte Flp-In T-REx-hZAP-S, -hZAP-L und -hZAP-L-AAA Zellen in verschiedene Zellkompartimente aufgetrennt. Dazu wurden die pelletierten Zellen sequenziell in vier verschiedenen Extraktionspuffern resuspendiert und dabei selektiv die Proteine der Zellkompartimente Zytosol, Membranen, Kern bzw. Zytoskelett isoliert. Die verschiedenen Fraktionen wurden anschließend im Western Blot analysiert (Abb. 3.11). Der Nachweis des HA-getaggten hZAP in den verschiedenen Fraktionen erfolgte mittels anti-HA Antikörper. Die Integrität der Fraktionen sowie die

Vergleichbarkeit der Auftragsvolumina wurde mit Antikörpern gegen bekannte Markerproteine der verschiedenen Fraktionen verifiziert (GAPDH - Zytosol, Calnexin - Membranen, Histon H3 - Kern, Aktin - Zytoskelett). Alle drei hZAP-Varianten waren in der Zytosol-, Membranen- und Kernfraktion nachzuweisen, wobei der Proteinhauptanteil jeweils im Zytosol lokalisiert war. Eventuell war die Triadenmutante verglichen mit den beiden Wildtypproteinen im Kern leicht abgereichert, wobei diese Beobachtung auch einem etwas reduzierten Expressionsniveau der Mutante zugrunde liegen könnte. Die Banden der Mutante waren im HA-Blot generell etwas schwächer als die des hZAP-L und hZAP-S, während die Markerproteine der Mutanten-Fractionen in ihrer Intensität denen der Wildtyp-Fractionen glichen.

Insgesamt konnten keine eindeutigen Lokalisationsunterschiede zwischen den drei hZAP-Varianten festgestellt werden.



**Abb. 3.11: Nachweis der subzellulären Lokalisation des hZAP-S, hZAP-L und der hZAP-L Triadenmutante AAA.** Induzierte Zellen der jeweiligen hZAP-Zelllinie wurden durch differenzielle Detergenz-Fraktionierung in die Fraktionen Zytosol (1), Membranen (2), Kern (3) und Zytoskelett (4) aufgetrennt. Die Fraktionen wurden nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-HA Antikörper auf hZAP untersucht und die Reinheit anhand der Detektion spezifischer Markerproteine (GAPDH (1), Calnexin (2), Histon H3 (3) und Aktin (4)) mit entsprechenden Antikörpern überprüft.

### 3.4 Untersuchung von CHIKV Chimären nach Insertion des SINV ZRE

Offensichtlich leisten die Triadenmotiv-Aminosäuren einen entscheidenden Beitrag zur antiviralen Aktivität des hZAP-L, erklären aber nicht das unterschiedliche Ausmaß der hZAP-L-vermittelten Hemmung verschiedener Viren. Die verringerte Aktivität der Triadenmotiv-Mutanten wirkte sich sowohl auf gut gehemmte (SINV) als auch auf schwach gehemmte (CHIKV) Alphaviren aus. Daher stellte sich weiterhin die Frage, wodurch die unterschiedliche Inhibitionsstärke verschiedener Alphaviren durch hZAP bestimmt wird.

Vorherige Studien zeigten eine direkte Interaktion des ZAP über seine CCCH-Zinkfinger-motive mit viralen ZREs, definierten Struktur- oder Sequenzelementen der RNAs ZAP-sensitiver Viren (Guo *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007). Solche ZAP-sensitiven Bereiche wurden bisher für verschiedene Viren lokalisiert (Guo *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Wiederkehrende Sequenzmuster oder eine bestimmte Lokalisation innerhalb des Genoms konnten dabei jedoch nicht identifiziert werden. Bei SINV wurden mehrere sensitive Bereiche innerhalb des Genoms lokalisiert, wobei das Fragment mit der größten destabilisierenden Aktivität innerhalb der nsP3-/nsP4-kodierenden Region detektiert wurde (Guo *et al.*, 2004). Im Folgenden sollte überprüft werden, ob nach Integration des stark sensitiven ZRE des SINV in das Genom des schwach gehemmten CHIKV die resultierende Chimäre stärker durch hZAP-L gehemmt wird als CHIKV wt.

#### 3.4.1 Erzeugung der ZRE-Chimären

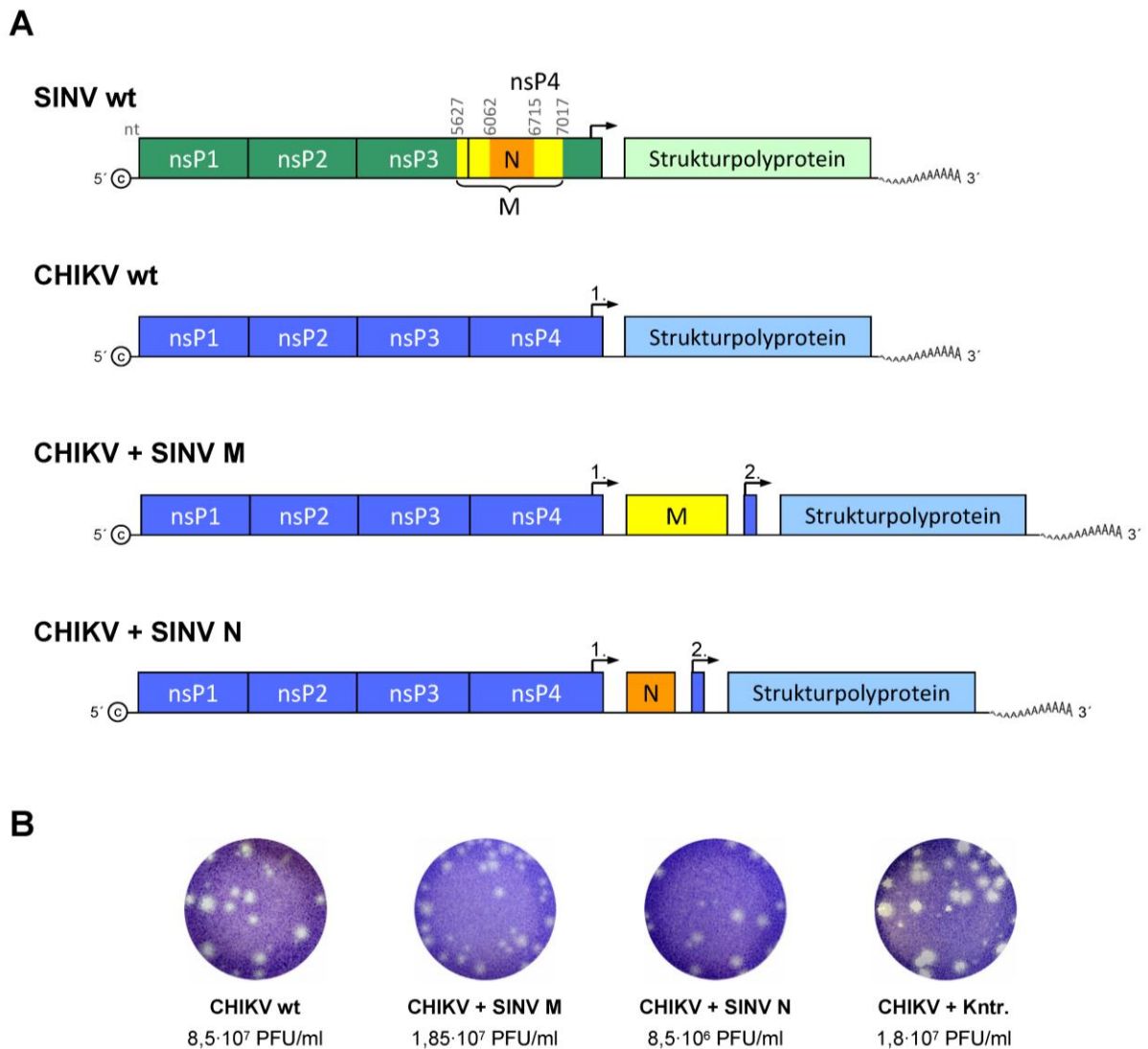
Durch sequenzielle Deletionsanalysen konnten Guo *et al.* (2004) das ZRE des SINV auf ein 1390 nt langes Fragment eingrenzen, welches das 3'-Ende der nsP3-kodierenden und einen Großteil der nsP4-kodierenden mRNA umfasst (M-Fragment, Abb. 3.12A). Nach weiteren Verkürzungsstudien wurde das M-Fragment auf eine minimale Sequenz mit maximaler Restsensitivität reduziert. Das resultierende, sogenannte N-Fragment umfasst 653 nt im nsP4-kodierenden Bereich (Abb. 3.12A). Beide Fragmente sollten jeweils in das CHIKV Genom inseriert werden. Da die RNA und nicht das exprimierte Protein die Zielstruktur der hZAP-vermittelten Degradation ist, sollte der Einfluss der jeweiligen ZRE-Sequenz auf RNA-Ebene untersucht werden. Deshalb wurden beide ZRE-Sequenzen ohne vorangehendes Translationsinitiationscodon ATG in das CHIKV Genom inseriert. Eine konventionelle Methode zur Integration exogener Sequenzen in das alphavirale Genom ist deren Expression

über einen zweiten subgenomischen Promotor (Olson *et al.*, 1994; Vanlandingham *et al.*, 2005; Ziegler *et al.*, 2011). Auf diese Weise werden die Integrität und Expression beider ORFs weiterhin gewährleistet.

Basierend auf der Variante pCHIKV-M-2SG-FLuc des infektiösen cDNA-Klons pCHIKV-M, welcher die *Firefly* Luciferase (FLuc) unter Kontrolle eines duplizierten subgenomischen Promotors exprimiert (Vgl. LR2006-OPY1-FLuc (Teo *et al.*, 2013)), sollten die beiden ZRE-Chimären generiert werden (Klonierungsschema siehe 8.3.3). Dazu wurde die Sequenz des SINV M- bzw. N-Fragments von dem Plasmid pToto1101 amplifiziert und dabei mit den Schnittstellen der Enzyme *AvrII* und *PmeI* fusioniert. Anschließend wurde die Luciferase-Sequenz des Plasmids pCHIKV-M-2SG-FLuc via *AvrII*/*PmeI*-Restriktion gegen das jeweilige SINV ZRE-Fragment ausgetauscht. Daraus resultierten die beiden Konstrukte pCHIKV+SINV-M und pCHIKV+SINV-N (Abb. 3.12A). Da ZAP gegen YFV keine inhibitorische Aktivität besitzt (Bick *et al.*, 2003), wurde als Kontrolle ein chimäres CHIKV Konstrukt mit einem Fragment des YFV entwickelt. Hierzu wurde eine der Größe des M-Fragments entsprechende, 1390 nt lange Insertion aus der NS5-, d.h. der RdRP-kodierenden Region des YFV, nach der gleichen Klonierungsstrategie unter die Kontrolle des duplizierten subgenomischen Promotors gebracht (pCHIKV+Kntr.; nicht dargestellt).

Zur Erzeugung der chimären Viren wurden die etablierten Plasmide zunächst mit *NotI* linearisiert, um ein authentisches 3'-Ende des viralen Genoms zu generieren. Die linearisierten DNA-Matrizen wurden mithilfe der T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und die erhaltenen RNAs anschließend in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurde der Zellkulturüberstand mit den infektiösen Partikeln geerntet und auf BHK-J Zellen titriert. Die Titer der Virusstocks waren miteinander vergleichbar. Auch die Plaquemorphologie im *Infectious Center Assay* war zwischen den Viruschimären und dem unmodifizierten Wildtypvirus einheitlich (Abb. 3.12B).

Die ZRE-Chimären wurden demnach erfolgreich produziert und konnten für anschließende Infektionsstudien verwendet werden.



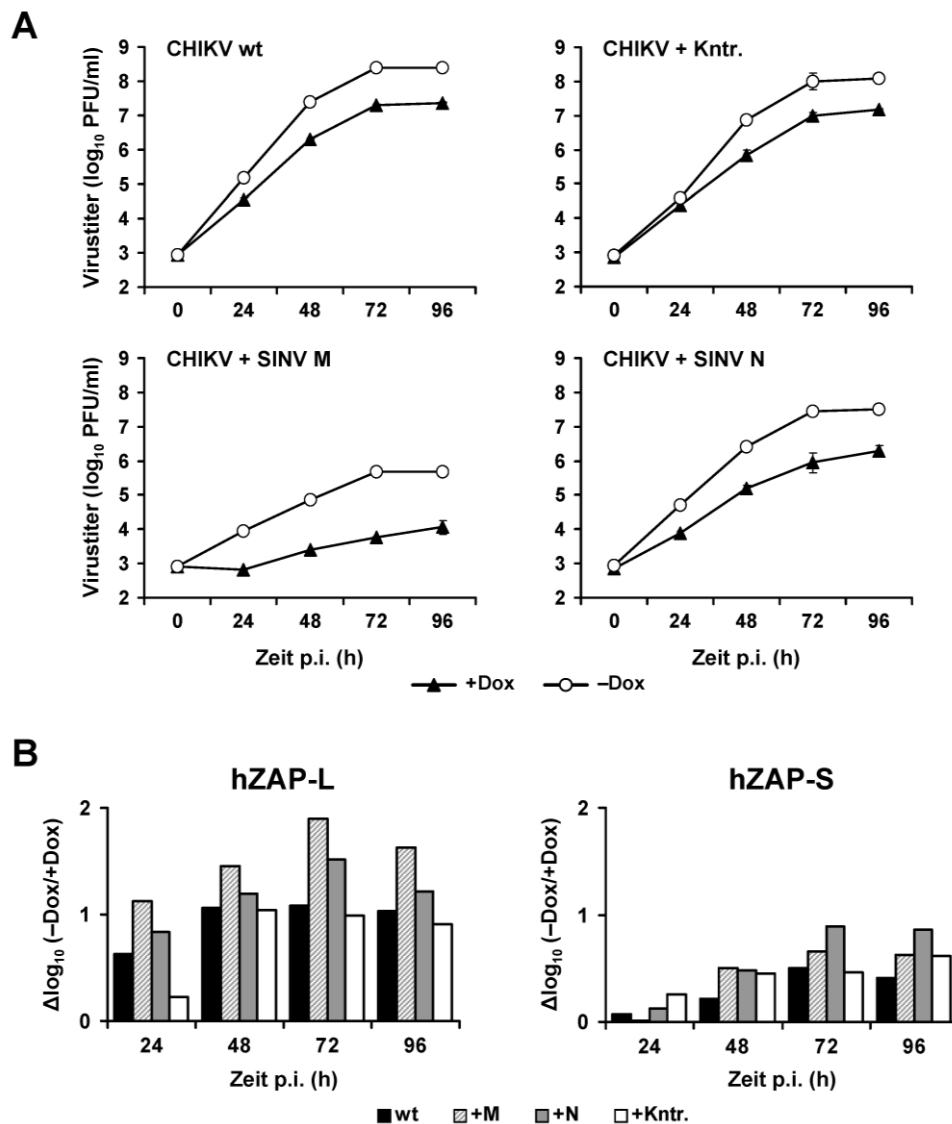
**Abb. 3.12: Etablierung von CHIKV Chimären mit integrierten SINV ZRE-Fragmenten. (A)** Schemata der volle Länge cDNA-Klone. Dargestellt sind SINV wt mit Hervorhebung des ZRE-Fragments M (gelb) bzw. N (orange), CHIKV wt sowie die rekombinanten CHIKV ZRE-Chimären mit dupliziertem subgenomischen Promotor (1. + 2.) nach Integration des SINV ZRE-Fragments M bzw. N. **(B)** Plaquemorphologie der Chimären. Die *in vitro* Transkripte der 3'-linearisierten Konstrukte wurden in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die *Infectious Center Assays* fixiert und mit Kristall-Violett gefärbt. Dargestellt sind die Zellen mit Plaques in einer Kavität der 6-well-Platte. Die Virustiter wurden durch Titration auf BHK-J Zellen im Plaquesassay bestimmt.

### 3.4.2 Hemmung der ZRE-Chimären durch hZAP

Mögliche Effekte der integrierten SINV ZRE-Fragmente auf die Hemmbarkeit der Chimären durch hZAP wurden in parallelen Infektionsansätzen untersucht. Nicht-induzierte und induzierte Flp-In T-REx hZAP-Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den einzelnen Viren infiziert (MOI 0,01) und die Virustiter zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt.



Verglichen zu dem Wildtypvirus und der Kontrollchimäre zeigten beide ZRE-Chimären eine etwas stärkere Hemmbarkeit durch hZAP-L (Abb. 3.13A und B). Dabei war die Zunahme der Hemmung für CHIKV + SINV M mit bis zu 0,8 Log-Stufen geringfügig höher als die für CHIKV + SINV N mit bis zu 0,5 Log-Stufen. Das generelle Replikationsniveau der Chimäre CHIKV + SINV M war gegenüber den anderen Viren deutlich reduziert.



**Abb. 3.13: Wachstumskinetiken der CHIKV ZRE-Chimären auf hZAP-Expressionszelllinien. (A)** Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den verschiedenen Viren infiziert (MOI 0,01). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein. **(B)** Vergleich der Hemmungslevel der einzelnen Viren durch hZAP-L (links) und hZAP-S (rechts). Für hZAP-L sind die Differenzen zwischen den mittleren, logarithmierten Titern auf nicht-induzierten und induzierten Zellen aus (A) dargestellt. Die Differenzen für hZAP-S wurden nach gleicher Vorgehensweise wie in (A) beschrieben mit Flp-In T-REx-293-hZAP-S Zellen ermittelt.

Abb. 3.13B zeigt die Hemmungslevel der verschiedenen Viren durch hZAP-L und hZAP-S zu den verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Im Gegensatz zu hZAP-L ist die ohnehin schwache Hemmung der beiden ZRE-Chimären durch hZAP-S kaum verändert. Das generelle Wachstum der Chimäre CHIKV + SINV M war auch auf den hZAP-S-Zellen im Vergleich zu den anderen Viren deutlich verringert (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt wurde die Chimäre CHIKV + SINV M zwar etwas stärker durch hZAP-L gehemmt als CHIKV wt, aber gleichzeitig nicht so stark wie SINV wt. Möglicherweise könnte die starke Hemmung des SINV wt durch additive Effekte des ZRE mit den weiteren, etwas weniger ZAP-sensitiven Regionen der viralen RNA verursacht werden. Andererseits könnte die schwache Hemmung des CHIKV wt und der CHIKV Chimären auch durch einen viralen Mechanismus bedingt sein, der der antiviralen Aktivität des hZAP aktiv entgegenwirkt.

### **3.5 Bedeutung der viralen Makrodomäne für die Hemmung durch hZAP-L**

Die virale Makrodomäne wird als potenzieller ZAP-spezifischer Antagonist diskutiert (Egloff *et al.*, 2006; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009). Der dabei zugrunde liegende Mechanismus ist jedoch noch unbekannt. Möglicherweise wird hZAP-L durch die virale Makrodomäne inaktiviert oder über den gemeinsamen Liganden ADP-Ribose sequestriert und so an der Ausübung seiner inhibitorischen Funktion gehindert (Egloff *et al.*, 2006; Kerns *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009). Eine ähnliche Strategie wurde der Makrodomäne der Histonvariante mH2A1.1 bei der Repression der katalytischen Aktivität der PARP1 nachgewiesen (Ouararhni *et al.*, 2006). Im Folgenden sollte ein möglicher Einfluss der Makrodomäne des CHIKV und SINV auf die alphavirale Hemmung durch hZAP näher untersucht werden.

#### **3.5.1 Untersuchung von SINV Chimären nach Insertion der CHIKV Makrodomäne**

Im Vergleich zu SINV wird CHIKV nur gering von hZAP-L gehemmt. Der Theorie folgend, dass hZAP-L von der viralen Makrodomäne antagonisiert wird, stellt die Makrodomäne des CHIKV möglicherweise einen stärkeren Antagonisten dar, der die inhibitorische Aktivität des hZAP-L effektiver hindert als die Makrodomäne des SINV. Nach Insertion der CHIKV Makrodomäne in das Genom des SINV sollte untersucht werden, ob die Chimäre durch die Anwesenheit der

potenziell effektiveren Makrodomäne weniger gut von hZAP-L gehemmt wird, hZAP-L also besseren antagonisieren kann als SINV wt.

Da die Asparaginsäure an Aminosäureposition 10 der CHIKV Makrodomäne essenziell für deren ADP-Ribose-Bindung ist (Malet *et al.*, 2009), sollte außerdem eine SINV Chimäre mit D10A-mutierter CHIKV Makrodomäne generiert werden. Basierend auf dieser Variante sollte untersucht werden, ob eine mögliche Steigerung des antagonistischen Verhaltens nach Integration der CHIKV Makrodomäne durch Mutation der ADP-Ribose-Bindung wieder reduziert wird.

### 3.5.1.1 Erzeugung der Makrodomänen-Chimären

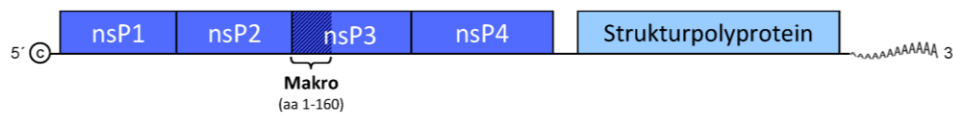
Die SINV Chimären wurden im reversen Genetiksistem auf Basis des infektiösen cDNA-Klons pToto1101 generiert. Dabei sollte die jeweilige CHIKV Insertion über die *SpeI*-Restriktionschnittstelle gemäß der Vorgehensweise von Bick *et al.* (2003) in die nsP3-Sequenz des SINV eingebracht werden (Abb. 3.14A) (Klonierungsschemata siehe 8.3.4). Die Sequenz der HA-getaggten CHIKV Makrodomäne wurde aus dem CHIKV Konstrukt pMakro-HA amplifiziert und dabei mit *SpeI*-Schnittstellen versehen. Für die D10A-Mutante wurde zunächst das Zwischenkonstrukt CHIKV pMakro-D10A-HA durch Mutagenese-/Fusions-PCRs des Konstruktes pMakro-HA generiert. Anschließend wurde das D10A-mutierte Insert über PCR amplifiziert und dabei mit *SpeI*-Schnittstellen ausgestattet. Nach *SpeI*-Restriktion wurden die beiden CHIKV Makrodomänen-Varianten (wt und D10A-mutiert) jeweils in den analog linearisierten Vektor pToto1101 ligiert. Die korrekte Insertorientierung in den resultierenden Konstrukten pSINV+CHIKV-Makro und pSINV+CHIKV-Makro-D10A (Abb. 3.14A) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Zur Erzeugung der chimären Viren, die die jeweilige Makrodomänen-Insertion als Fusionsprotein mit dem SINV nsP3 exprimieren, wurden die mit *XhoI* 3'-linearisierten Konstrukte *in vitro* transkribiert und die erhaltenen RNAs in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurde der Zellkulturüberstand mit den viralen Partikeln geerntet und auf BHK-J Zellen titriert. Die Titer der verschiedenen Virusstocks waren untereinander sehr ähnlich und auch die Plaquemorphologie im *Infectious Center Assay* war zwischen den Viruschimären und dem unmodifizierten Wildtypvirus einheitlich (Abb. 3.14B).

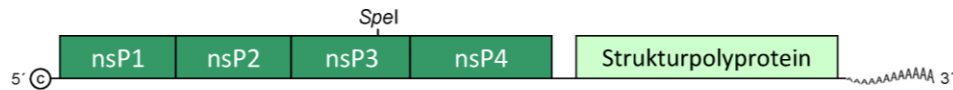
Die Makrodomänen-Chimären konnten demnach erfolgreich produziert und für anschließende Infektionsstudien verwendet werden.

**A**

**CHIKV wt**



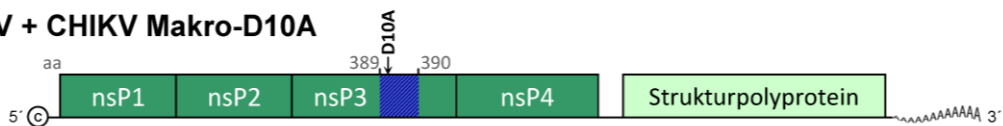
**SINV wt**



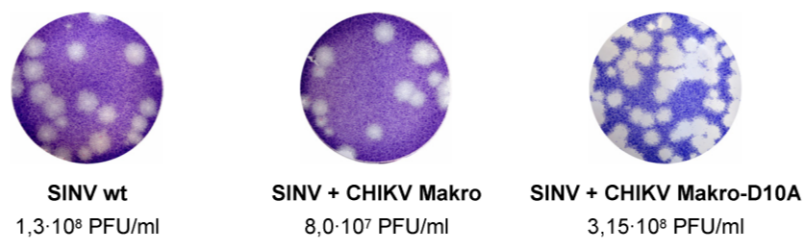
**SINV + CHIKV Makro**



**SINV + CHIKV Makro-D10A**



**B**



**Abb. 3.14: Etablierung von SINV Chimären mit integrierter CHIKV Makrodomäne. (A)** Schemata der volle Länge cDNA-Klone. Dargestellt sind CHIKV wt mit Hervorhebung der Makrodomäne (Makro), SINV wt mit Position der *SpeI*-Schnittstelle und die rekombinanten SINV Chimären nach Integration der CHIKV Makrodomänen-Sequenzen über *SpeI*. **(B)** Plaquemorphologie der Chimären. Die *in vitro* Transkripte der 3'-linearisierten Konstrukte wurden in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die *Infectious Center Assays* fixiert und mit Kristall-Violett gefärbt. Dargestellt sind die Zellen mit Plaques in einer Kavität der 6-well-Platte. Die Virustiter wurden durch Titration auf BHK-J Zellen im Plaqueassay bestimmt.

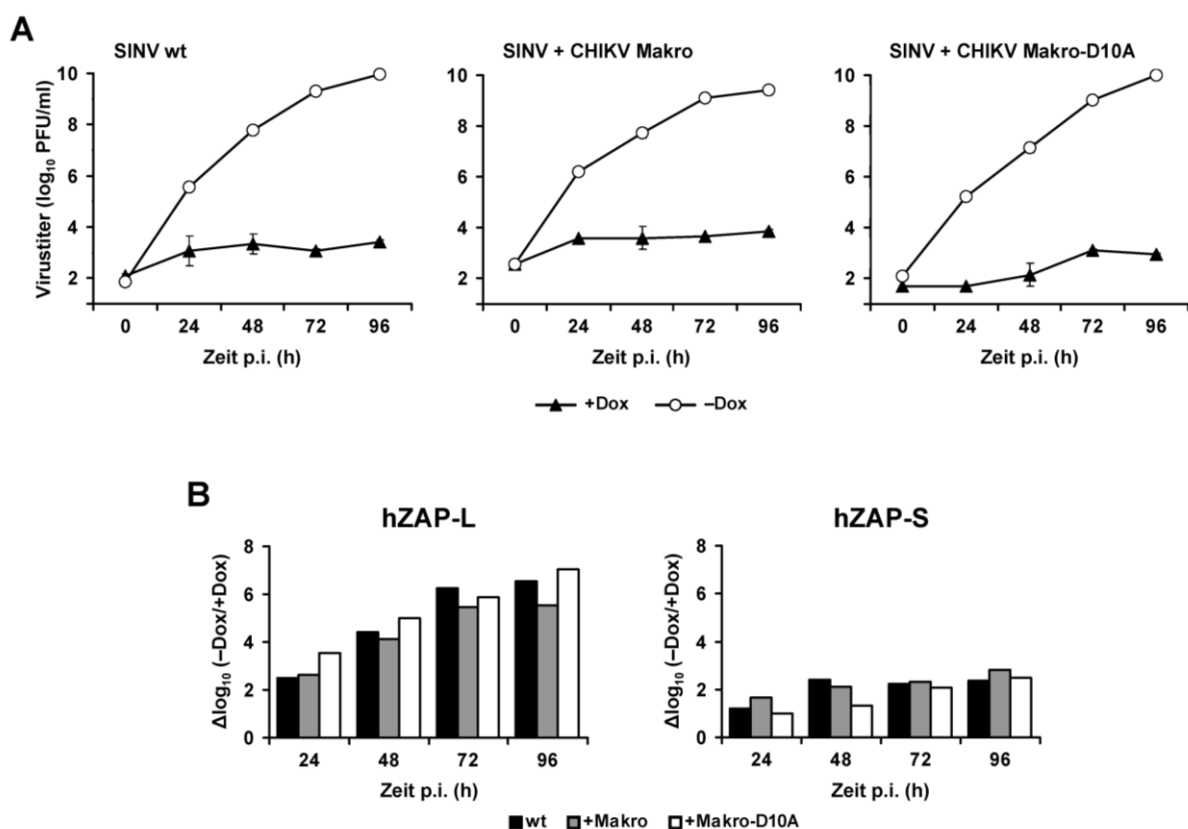
### 3.5.1.2 Hemmung der Makrodomänen-Chimären durch hZAP

Die hZAP-vermittelte Hemmung beider Chimären und des SINV wt sollte in parallelen Infektionen miteinander verglichen werden. Nicht-induzierte und induzierte Flp-In T-REx hZAP-Zellen wurden im Doppelansatz mit den verschiedenen Viren infiziert (MOI 0,01) und die viralen Titer mittels Plaqueassay zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt.

Verglichen mit dem Wildtypvirus zeigte die Chimäre SINV + CHIKV Makro eine um bis zu 1 Log-Stufe reduzierte Hemmung durch hZAP-L im späteren Infektionsverlauf (Abb. 3.15A und B). Bei der Chimäre SINV + CHIKV Makro-D10A konnte dagegen keine entsprechende Inhibitionsreduktion beobachtet werden.

Im direkten Vergleich der Hemmungslevel der verschiedenen Viren durch hZAP-L und hZAP-S bestätigte sich zwar die große Diskrepanz zwischen der antiviralen Aktivität beider hZAP-Isoformen gegen SINV, es konnte aber keine Sensitivitätsabnahme der Makro-Chimäre gegenüber hZAP-S ähnlich der für hZAP-L beobachteten Tendenz gezeigt werden (Abb. 3.15B).

Demzufolge scheint die Makrodomäne des CHIKV bevorzugt der hZAP-L-vermittelten Hemmung entgegenwirken zu können, wofür offensichtlich deren Aminosäure D10 von Bedeutung ist.



**Abb. 3.15: Wachstumskinetiken der SINV Chimären auf hZAP-Expressionszelllinien. (A)** Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den verschiedenen Viren infiziert (MOI 0,01). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein. **(B)** Vergleich der Hemmungslevel der einzelnen Viren durch hZAP-L (links) und hZAP-S (rechts). Für hZAP-L sind die Differenzen zwischen den mittleren, logarithmierten Titern auf nicht-induzierten und induzierten Zellen aus (A) dargestellt. Die Differenzen für hZAP-S wurden nach gleicher Vorgehensweise wie in (A) beschrieben mit Flp-In T-REx-293-hZAP-S Zellen ermittelt.

### 3.5.2 Untersuchung alphaviraler Makrodomänen-Mutanten

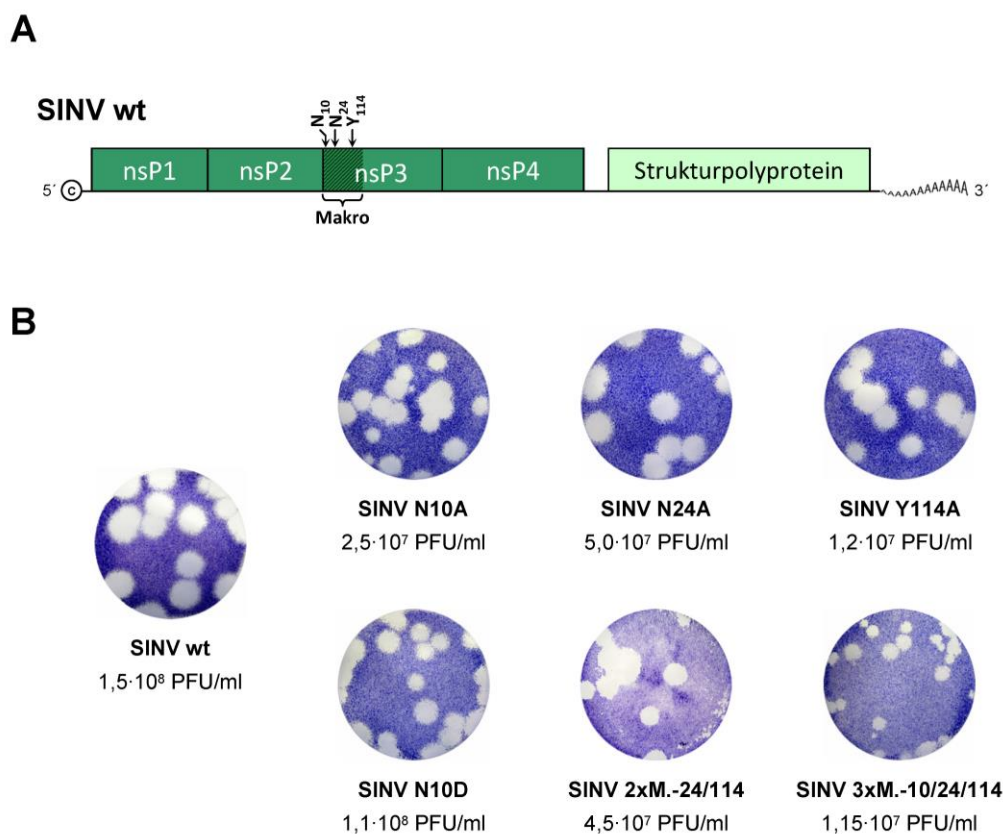
Die veränderte Hemmbarkeit der Makrodomänen-Chimäre in Abschnitt 3.5.1.2 deutet einen direkten Einfluss der Makrodomäne auf die virale Sensitivität gegenüber hZAP-L an. Bei Mutation einer einzelnen konservierten Aminosäure in der integrierten Makrodomäne konnte diese Sensitivität wiederum etwas modifiziert werden. Infolgedessen sollte die Relevanz verschiedener konservierter und funktionell wichtiger Aminosäuren der Makrodomänen des SINV und CHIKV auch im endogenen Viruskontext erforscht werden. Im Rahmen mehrerer Struktur- und Funktionsanalysen wurden bereits einzelne konservierte Aminosäuren identifiziert und spezifischen Funktionen zugeordnet. Die schon erwähnte Asparaginsäure D10 ist für die spezifische ADP-Ribose-Bindung der CHIKV Makrodomäne verantwortlich (Malet *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu den meisten Makrodomänen besitzt SINV an dieser Position die Aminosäure Asparagin (N10), die allerdings aufgrund ihrer verwandten molekularen Struktur ähnliche Bindungen eingehen könnte (Malet *et al.*, 2009). Den Aminosäuren Asparagin an Position 24 (N24) und Tyrosin an Position 114 (Y114) konnte katalytische Appr-1''-pase-Aktivität nachgewiesen werden, wobei das Tyrosin Y114 zusätzlich an der Substratbindung beteiligt ist (Egloff *et al.*, 2006; Malet *et al.*, 2009). Diese drei Aminosäuren sollten bei SINV und CHIKV einzeln bzw. gemeinsam durch Alanin ausgetauscht und eventuelle Konsequenzen auf die virale Replikation sowie die hZAP-L-vermittelte Restriktion untersucht werden.

#### 3.5.2.1 Erzeugung und Wachstumskinetiken der SINV Makrodomänen-Mutanten

Die Makrodomänen-Mutanten des SINV wurden auf Basis des infektiösen cDNA-Klons pToto1101 generiert (Klonierungsschemata siehe 8.3.5). Dabei wurden die einzelnen Aminosäuren N10, N24 und Y114 (Abb. 3.16A) auf Nukleotidebene via Mutagenese-/Fusions-PCRs in entsprechenden PCR-Fragmenten gegen Alanin ausgetauscht. Die Fragmente wurden an der *Bgl*II- und *Spe*I-Schnittstelle innerhalb der amplifizierten Region geschnitten und in den analog verdauten Vektor pToto1101 ligiert. Dadurch wurden die infektiösen cDNA-Klone pSINV-N10A, pSINV-N24A und pSINV-Y114A erzeugt. Die Doppel- (pSINV-2xM.-24/114) und Tripelalaninmutante (pSINV-3xM.-10/24/114) wurde durch sequenzielle Mutagenese der Konstrukte mit bereits integriertem ersten bzw. ersten und zweiten Codonaustausch etabliert. Außerdem wurde mit gleicher Vorgehensweise eine SINV

Mutante konstruiert, die wie die anderen bisher bekannten Alphaviren an Makrodomänenposition 10 Asparaginsäure statt Asparagin besitzt (pSINV-N10D).

Zur Erzeugung der Virusmutanten wurden die mit *Xho*I 3'-linearisierten Konstrukte *in vitro* transkribiert und die RNAs in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurden die Zellkulturüberstände mit den viralen Partikeln geerntet und auf BHK-J Zellen titriert. Die Titer der Mutanten waren zwar etwas geringer, aber noch in einem vergleichbaren Bereich mit dem des Wildtypvirus. Im *Infectious Center Assay* wiesen die beiden SINV Mutanten N24A und Y114A sowie SINV wt eine einheitliche Plaquemorphologie auf (Abb. 3.16B). Die Doppelmutante (2xM.-24/114) sowie die beiden Mutanten N10A und N10D zeigten hingegen etwas kleinere und die Tripelmutante (3xM.-10/24/114) deutlich kleinere Plaques als das Wildtypvirus. Insgesamt konnten alle Makrodomänen-Mutanten erfolgreich produziert werden und standen für anschließende Infektionsstudien zur Verfügung.



**Abb. 3.16: Etablierung von SINV Makrodomänen-Mutanten. (A)** Schemazeichnung des SINV Genoms mit Darstellung der drei konservierten, zu mutierenden Aminosäuren der Makrodomäne (Makro). **(B)** Plaquemorphologie der Virusmutanten. Die *in vitro* Transkripte der 3'-linearisierten Konstrukte wurden in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die *Infectious Center Assays* fixiert und mit Kristall-Violett gefärbt. Dargestellt sind die Zellen mit Plaques in einer Kavität der 6-well-Platte. Die Virustiter wurden durch Titration auf BHK-J Zellen im Plaquesassay bestimmt.

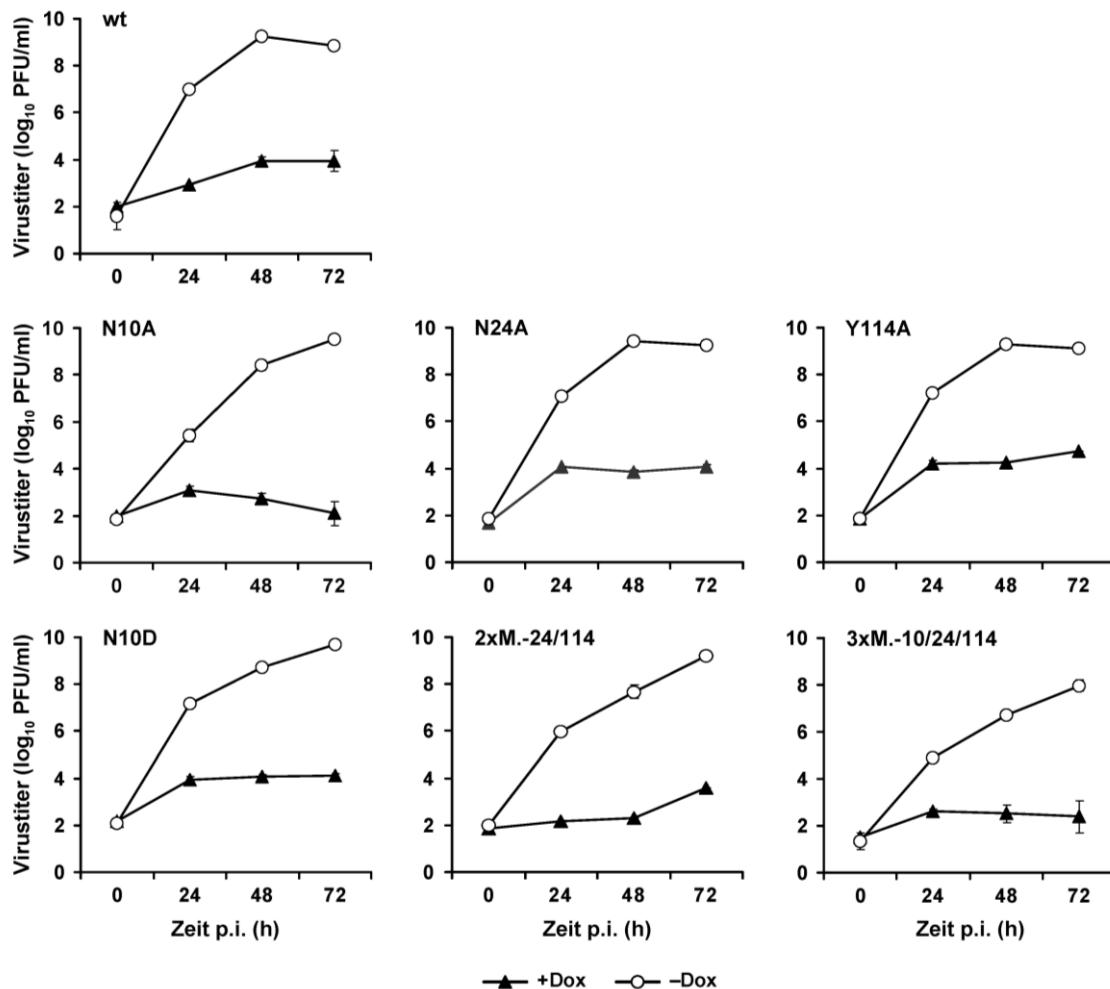
Das Replikationsverhalten der erzeugten Virusmutanten sowie mögliche Effekte der Makrodomänen-Mutationen auf die Sensitivität gegenüber hZAP-L wurden in parallelen Infektionsansätzen untersucht. Dazu wurden nicht-induzierte und induzierte Flp-In T-REx-hZAP-L Zellen im Doppelansatz mit den einzelnen Viren inokuliert (MOI 0,01) und die viralen Titer mittels Plaqueassay zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt.

Das generelle Replikationsniveau aller SINV Mutanten, außer N24A und Y114A, war verglichen mit dem Wildtypvirus jeweils beeinträchtigt, wobei das Viruswachstum nur etwas verzögert (N10D) oder deutlich eingeschränkt (3xM.-10/24/114) war (Abb. 3.17, -Dox).

Eine erhebliche Sensitivitätszunahme gegenüber hZAP-L konnte bei der Mutante N10A festgestellt werden (Abb. 3.17). Im Gegensatz zu den anderen Virusvarianten wurde das Wachstum der N10A-Mutante in hZAP-L-Anwesenheit ab 24 h p.i. deutlich reduziert. So war die Hemmung der N10A-Mutante durch hZAP-L bereits 48 h p.i. verglichen zu SINV wt tendenziell erhöht. Die Wachstumskinetik des SINV wt zeigte jedoch einen schnelleren Verlauf als die der Mutante, was dazu führte, dass der Titer bei SINV wt aufgrund des CPes ab 48 h p.i. wieder abnahm und sich somit auch die hZAP-L-vermittelte Hemmung verringerte. Stattdessen stieg die Replikation der N10A-Mutante auf nicht-induzierten Zellen und damit auch die Gesamthemmung durch hZAP-L weiterhin erheblich an. Auch die Hemmbarkeit der beiden Mehrfachmutanten 2xM.-24/114 und 3xM.-10/24/114 durch hZAP-L war im Vergleich zu SINV wt leicht erhöht. Allerdings nahm die Replikation der Doppelmutante dabei im Gegensatz zu den Mutanten N10A und 3xM.-10/24/114 im Infektionsverlauf tendenziell eher zu als ab. Die Mutanten N10D, N24A und Y114A zeigten verglichen zu SINV wt keine veränderte Sensitivität gegenüber hZAP-L.

Da die N10A-Mutation der Makrodomäne den größten Effekt auf die hZAP-L-Sensitivität des SINV ausübte, scheint diese Aminosäure eine besondere Bedeutung für die virale Stabilität und/oder mögliche Schutzmechanismen gegen die hZAP-L-Aktivität zu besitzen.





**Abb. 3.17: Wachstumskinetiken der SINV Makrodomänen-Mutanten auf hZAP-L-Expressionszelllinien.** Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden jeweils im Doppelansatz mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (MOI 0,01). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infektion wurden Überstandproben entnommen und die Virustiter durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Abweichungen der logarithmierten Titer. Die Fehlerbalken der Messpunkte können durch das Symbol verdeckt sein.

### 3.5.2.2 Erzeugung und Wachstumskinetiken der CHIKV Makrodomänen-Mutanten

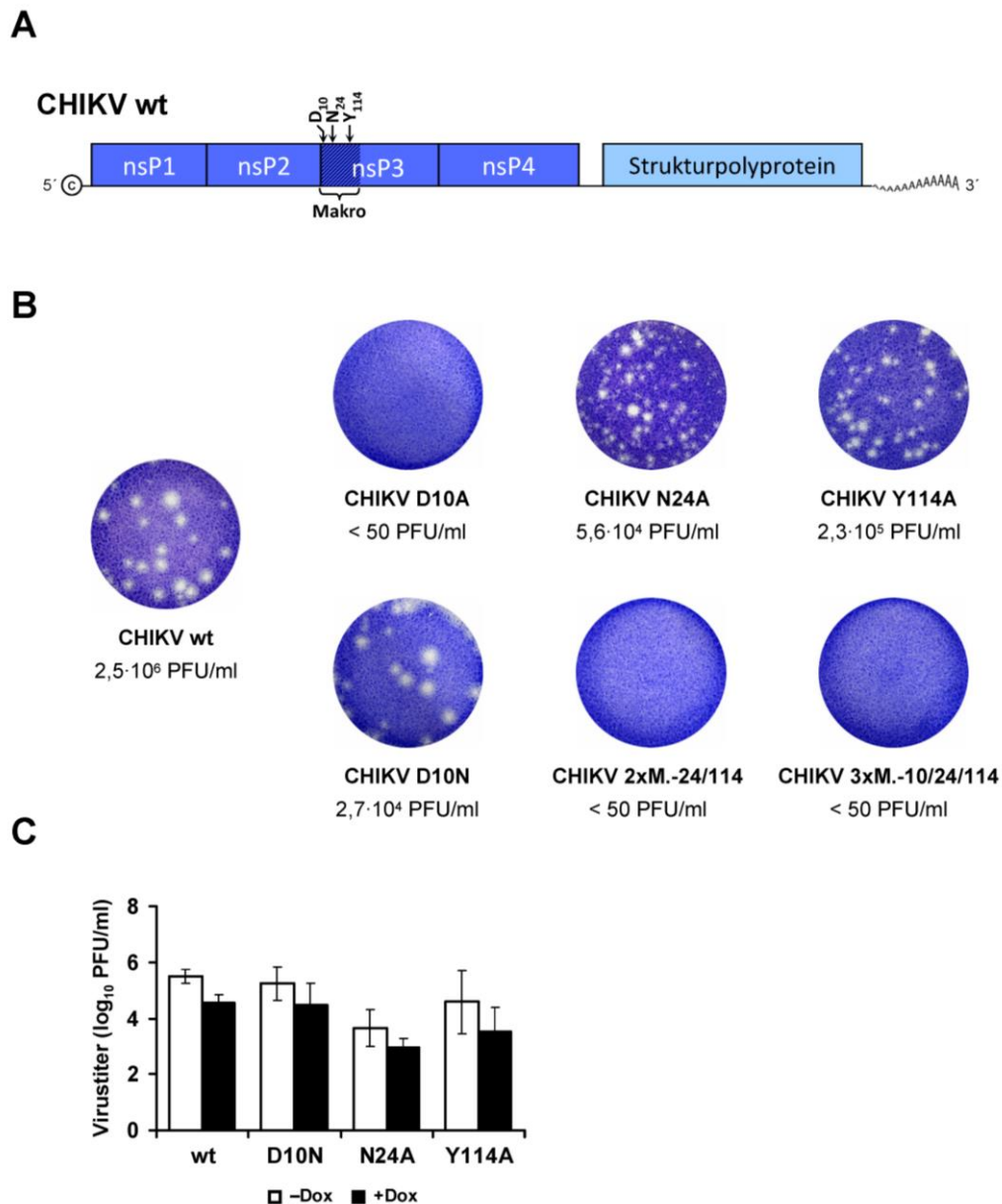
Analog zu SINV sollten die gleichen Makrodomänen-Mutanten für CHIKV auf Basis des infektiösen Klons pCHIKV-M generiert werden (Klonierungsschemata siehe 8.3.6). Über Mutagenese-/Fusions-PCRs entsprechender Sequenzabschnitte wurden die Aminosäurecodons D10, N24 und Y114 der CHIKV Makrodomäne (Abb. 3.18A) gegen Alanin-Codons ausgetauscht. Die PCR-Fragmente wurden an den *Bgl*II-Schnittstellen innerhalb der amplifizierten Region geschnitten und in den gleichermaßen verdauten Vektor pCHIKV-M ligiert. Auf diese Weise wurden die infektiösen cDNA-Klone pCHIKV-D10A, -N24A, -Y114A, -2xM.-24/114 und -3xM.-10/24/114 erzeugt. Zusätzlich wurde eine Makrodomänen-Variante gemäß der

Aminosäuresequenz des SINV mit Asparagin statt Asparaginsäure (pCHIKV-D10N) etabliert. Die korrekte Orientierung der Inserts und die Einführung der Mutationen wurde jeweils durch Sequenzierung überprüft.

Zur Erzeugung der Virusmutanten wurden die mit *NotI* 3'-linearisierten Konstrukte *in vitro* transkribiert und die erhaltenen RNAs in BHK-J Zellen elektroporiert. Die Viruspartikel im Überstand wurden nach 48 h geerntet. Die CHIKV Mutante D10A sowie die beiden Mehrfachmutanten 2xM.-24/114 und 3xM.-10/24/114 bildeten im *Infectious Center Assay* und auch bei der Titration der geernteten Überstände keine Plaques, induzierten also entweder keinen CPE oder waren nicht lebensfähig (Abb. 3.18B). Verglichen zum Wildtypvirus verursachten die beiden Mutanten N24A und Y114A wenige große Plaques vor dem Hintergrund mehrerer kleinerer, während die Plaquemorphologie der Mutante D10N vergleichbar zu der des Wildtyps war. Die Virustiter dieser drei Mutanten waren niedriger als der des Wildtypvirus.

Die zytopathischen CHIKV Mutanten sollten wie die SINV Mutanten in parallelen Infektionsansätzen auf mögliche Auswirkungen der Makrodomänen-Mutationen auf die hZAP-L-Sensitivität untersucht werden. Nach Infektion nicht-induzierter und induzierter Flp-In T-REx-hZAP-L Zellen (MOI 0,01) wurden die viralen Titer mittels Plaqueassay zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion bestimmt. Trotz mehrfacher Wiederholung des Infektionsversuchs konnten jedoch keine eindeutigen Resultate gewonnen werden, die auf mögliche Auswirkungen der Mutationen auf die virale Replikation oder die hZAP-L-Sensitivität hätten hinweisen können. Abb. 3.18C zeigt exemplarisch die mittleren Titer 48 h p.i. von vier Infektionsversuchen jeweils im Doppelansatz. Wie bei CHIKV wt war auch das Wachstum der Mutanten in hZAP-L-Anwesenheit tendenziell reduziert. Allerdings war wegen der großen Variabilität der Titer bei der ohnehin geringen Hemmung durch hZAP-L von nur etwa 1 Log-Stufe kein zuverlässiger Vergleich der verschiedenen Virusvarianten möglich.

Insgesamt waren die CHIKV D10A-Mutante sowie die beiden Mehrfachmutanten nicht lebensfähig, während die zytopathischen Mutanten keinen eindeutigen Vergleich der hZAP-L-vermittelten Hemmung zuließen. Demzufolge kann über die Bedeutung der drei untersuchten Aminosäuren der CHIKV Makrodomäne für die Hemmung durch hZAP-L hier keine Aussage gemacht werden.



**Abb. 3.18: Etablierung von CHIKV Makrodomänen-Mutanten und Wachstum auf hZAP-L-Expressionszelllinien.** (A) Schemazeichnung des CHIKV Genoms mit Darstellung der drei konservierten, zu mutierenden Aminosäuren der Makrodomäne (Makro). (B) Plaquemorphologie der Virusmutanten. Die *in vitro* Transkripte der 3'-linearisierten Konstrukte wurden in BHK-J Zellen elektroporiert. Nach 48 h wurden die Überstände geerntet und die *Infectious Center Assays* fixiert und mit Kristall-Violett gefärbt. Dargestellt sind die Zellen mit Plaques in einer Kavität der 6-well Platte. Die Virustiter wurden durch Titration auf BHK-J Zellen im Plaqueassay bestimmt. (C) Induzierte (+Dox) und nicht-induzierte (-Dox) Flp-In T-REx-293-hZAP-L Zellen wurden mit den verschiedenen Virusmutanten infiziert (MOI 0,01). Die Virustiter 48 h p.i. wurden durch Plaqueassay auf BHK-J Zellen bestimmt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD der logarithmierten Titer von vier Infektionsversuchen jeweils im Doppelansatz (n = 8).

### 3.5.2.3 Untersuchung der CHIKV Makrodomänen-Mutante D10A

Besonders interessant war, dass die CHIKV Makrodomänen-Mutante D10A ihre Viabilität oder zumindest ihren CPE verloren hat, während die anderen CHIKV Einzelmutanten sowie die analoge SINV N10A-Mutante nur eine verzögerte Replikation aufwiesen, die anhand der reduzierten Plaquegröße und zum Teil niedrigeren Titer nach Infektion deutlich wurde (vgl. Abb. 3.16, Abb. 3.17 und Abb. 3.18). Die Ursache für diesen Funktionsverlust der CHIKV D10A-Mutante sollte im Folgenden näher untersucht werden. Die Klonierungsschemata aller hierzu etablierten Konstrukte sind Abschnitt 8.3.7 zu entnehmen.

Die Insertintegrität des infektiösen cDNA-Klons pCHIKV-D10A wurde zwar schon während des Klonierungsvorganges überprüft, dennoch wurde auch die Gesamtsequenz des Klons auf eventuell zusätzliche Mutationen kontrolliert. Obwohl die korrekte Sequenz nachgewiesen werden konnte, wurde die Klonierung mit einer alternativen Ligationsstrategie noch einmal wiederholt. Das via Mutagenese-/Fusions-PCRs generierte Amplikon mit Kodierung des D10A-Austausches wurde hierzu mit den Restriktionsenzymen *SacII* und *BglII* geschnitten. In einer Dreifach-Ligation wurde dieses zusammen mit einem *NgoMIV*-/*SacII*-verdauten Fragment aus pCHIKV-M in das *NgoMIV*-/*BglII*-restringierte Vektorrückgrat des pCHIKV-M eingebracht. Nachdem das Konstrukt sequenziert und *in vitro* transkribiert wurde, wurde die erhaltene RNA in BHK-J Zellen elektroporiert. Auch diesmal zeigte die Mutante im *Infectious Center Assay* keine Plaques (Daten nicht gezeigt).

Die Option, dass die CHIKV D10A-Mutante möglicherweise replizierte, ohne dabei einen zytopathischen Effekt auszubilden, wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbungen der elektroporierten Zellen ausgeschlossen (Daten nicht gezeigt).

Durch die Rückmutation des cDNA-Klons pCHIKV-D10A zur Wildtypsequenz sollte zudem geprüft werden, ob dadurch der CHIKV wt Phänotyp wiederhergestellt werden konnte. Neben der Sequenzierung ist dies eine weitere Möglichkeit, das Genom auf zusätzliche lethale Mutationen zu kontrollieren. Durch *BglII*-Restriktion wurde das Fragment mit der Wildtypsequenz der Makrodomäne aus dem pCHIKV-M Konstrukt isoliert und in den gleichsam verdauten cDNA-Klon pCHIKV-D10A inseriert. Die korrekte Insertorientierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach *in vitro* Transkription und Elektroporation war das zytopathische Viruswachstum wiederhergestellt und demnach keine weitere lethale Mutation in dem Plasmid pCHIKV-D10A vorhanden (Daten nicht gezeigt).

Zuletzt sollte untersucht werden, ob das Wachstum der D10A-Mutante durch die Expression des nsP3 *in trans* komplementiert werden konnte. Um die Replikationsrate dabei einfacher verfolgen zu können, sollten entsprechende Reporterviren generiert werden. Zur Erzeugung eines CHIKV wt Reportervirus wurde die Sequenz der *Renilla* Luciferase (RLuc) analog zu mCherry in Kümmerer *et al.* (2012) hinter Codon 490 der nsP3-kodierenden Region des infektiösen cDNA-Klons pCHIKV-M inseriert (Abb. 3.19A). Dazu wurde die RLuc-Sequenz aus dem Konstrukt phRL-CMV amplifiziert und über Fusions-PCR an beiden Seiten jeweils mit der die Integrationsstelle flankierenden nsP3-Sequenz fusioniert. Über die in den angefügten Sequenzen lokalisierten Restriktionsschnittstellen *NheI* (5'-Bereich) und *AgeI* (3'-Bereich) wurde das Fragment verdaut. In einer Dreifach-Ligation wurde dieses zusammen mit einem *NgoMIV*-/*NheI*-verdauten Fragment aus pCHIKV-M in das *NgoMIV*-/*AgeI*-restringierte Vektorrückgrat des pCHIKV-M eingebracht. Von dem resultierenden Konstrukt pCHIKV-RLuc wird die Luciferase als Fusionsprotein mit dem nsP3 exprimiert.

Das Reporterkonstrukt pCHIKV-RLuc-Makro-D10A mit der Makrodomänen-Mutation D10A (Abb. 3.19A) wurde auf Basis des pCHIKV-RLuc Plasmids produziert. Die Nukleotidsequenz mit dem D10A-Austausch wurde dafür aus dem cDNA-Klon pCHIKV-D10A durch *SacII*-/*BglII*-Restriktion isoliert. Diese wurde zusammen mit einem *NgoMIV*-/*SacII*-verdauten Fragment aus pCHIKV-RLuc via Dreifachligation in das *NgoMIV*-/*BglII*-restringierte Vektorrückgrat des pCHIKV-RLuc integriert.

Als Kontrollkonstrukt zur Messung des Luciferase-Hintergrundes durch initiale Translation der elektroporierten RNA wurde ein replikationsdefizientes Reportervirus konstruiert. Durch Mutation des konservierten Aminosäuremotivs GDD zu GAA in der RdRP (nsP4) verliert das Enzym seine katalytische Aktivität, so dass keine Virusreplikation stattfinden kann (Rubach *et al.*, 2009; Tomar *et al.*, 2006). Mittels Mutagenese-/Fusions-PCRs wurde dazu ausgehend von dem infektiösen cDNA-Klon pCHIKV-M ein Fragment erzeugt, das die entsprechenden Codonaustausche für die beiden Asparaginsäure-Substitutionen kodierte. Dieses wurde nach *AgeI*-/*BglII*-Restriktion in den entsprechend verdauten Vektor pCHIKV-RLuc ligiert und somit das Kontrollkonstrukt pCHIKV-RLuc-nsP4-GAA generiert (Abb. 3.19A).

Die nach *NotI*-Linearisierung und *in vitro* Transkription der Konstrukte pCHIKV-RLuc, pCHIKV-RLuc-Makro-D10A und pCHIKV-RLuc-nsP4-GAA gewonnenen RNAs wurden in BHK-J Zellen elektroporiert. Von den elektroporierten Zellen wurde jeweils die gleiche Zellzahl in mehrere Kavitäten einer 24-well Platte eingesät, um so die Messung der RLuc-Aktivität zu

verschiedenen Zeitpunkten nach Elektroporation zu ermöglichen. Während die Luciferase-Aktivität des CHIKV-RLuc ab 4 h nach Elektroporation auf ca. 1,1 Mio. *Relative Light Units* (RLU) nach 24 h anstieg, blieb die Aktivität des D10A-Reportervirus auf dem Niveau der replikationsdefizienten GAA-Mutante (43.000 bzw. 62.000 RLU nach 24 h) (Abb. 3.19B). Demnach ist offensichtlich die D10A-Mutante wie die GAA-Mutante nicht zur Replikation fähig, was das Ausbleiben des zytopathischen Effektes der vorherigen Versuche bestätigte.

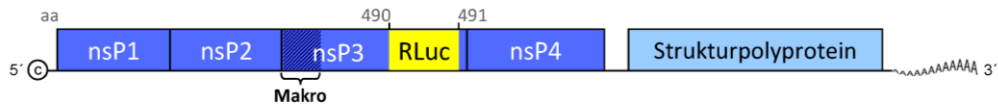
Schließlich sollte überprüft werden, ob das Wachstum der D10A-Mutante durch Transkomplementation mit wt CHIKV nsP3 wiederhergestellt werden konnte. Die Sequenz des nsP3 mit C-terminalem HA-Tag wurde dazu via PCR aus dem CHIKV Plasmid pnsP3-HA isoliert und über die Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *NotI* in den Expressionsvektor pCAGGS integriert. Mit dem erhaltenen Plasmid pCAGGS-nsP3-HA wurden BHK-J Zellen transfiziert. Die erfolgreiche Transfektion und Expression des nsP3 wurde nach 24 h in dem Zelllysate durch Detektion des HA-Tags im Western Blot nachgewiesen (Abb. 3.19C).

Anschließend wurden BHK-J Zellen mit dem Plasmid pCAGGS-nsP3-HA transfiziert und 24 h später mit den *in vitro* Transkripten der einzelnen CHIKV-RLuc-Reporterkonstrukte (wt, Makro-D10A und nsP4-GAA) elektroporiert. Nach 48 h wurden die Kulturüberstände geerntet und einmal auf BHK-J Zellen passagiert, die ebenfalls 24 h zuvor mit pCAGGS-nsP3-HA transfiziert wurden. Parallel dazu wurde die Elektroporation und die anschließende Passage der Überstände auch mit nicht-transfizierten BHK-J Zellen durchgeführt. Die Luciferase-Aktivität der Reporterviren wurde 48 h nach der Passage in den Lysaten der verschiedenen Ansätze gemessen (Abb. 3.19D). Das Reportervirus CHIKV-RLuc mit viraler Wildtypsequenz demonstrierte sowohl ohne als auch mit nsP3-Expression *in trans* jeweils ausgeprägte Luciferase-Aktivität (380.000 RLU bzw. 310.000 RLU). Die beiden Reporter-mutanten CHIKV-RLuc Makro-D10A und CHIKV-RLuc nsP4-GAA hingegen zeigten auch nach Transkomplementation keine Luciferase-Aktivität mit Messwerten von jeweils ca. 90 RLU.

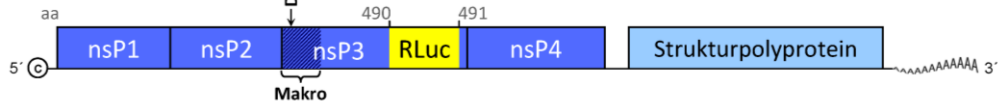
Ein funktioneller Ausgleich der D10A-Mutation und damit die Rekonstruktion der Virusreplikation war demnach durch die Expression des korrekten nsP3 *in trans* nicht möglich.

**A**

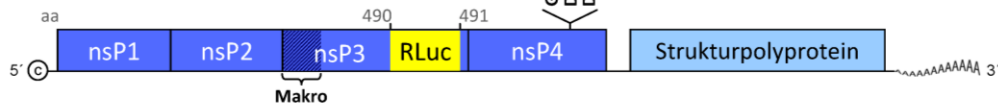
**CHIKV-RLuc**



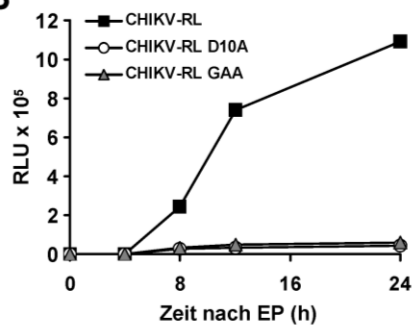
**CHIKV-RLuc Makro-D10A**



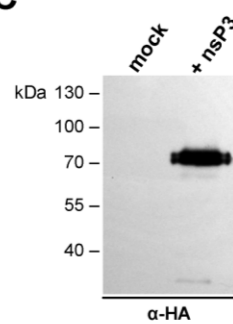
**CHIKV-RLuc nsP4-GAA**



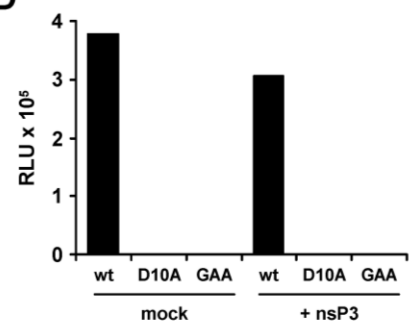
**B**



**C**



**D**



**Abb. 3.19: Untersuchung der CHIKV D10A-Mutation mit Reporterkonstrukten. (A)** Schemata der Genome der CHIKV Reporterviren nach Integration der *Renilla* Luciferase (RLuc) in das nsP3 mit Hervorhebung der Makrodomäne (Makro). Mutationen in den Konstrukten sind an den entsprechenden Positionen angegeben. **(B)** Messung der RLuc-Aktivität der drei Reporterkonstrukte. Die *in vitro* Transkripte der Reporterkonstrukte wurden in BHK-J Zellen elektroporiert (EP). Zu den angegebenen Zeitpunkten nach EP wurde die Aktivität der RLuc in *Relative Light Units* (RLU) gemessen. **(C)** Überprüfung der nsP3-Expression. BHK-J Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid pCAGGS-nsP3-HA transfiziert. Nach 24 h wurde die nsP3-HA-Expression im Zelllysät nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-HA Antikörper überprüft. Das Lysat untransfizierter Zellen (mock) diente als Kontrolle. **(D)** Überprüfung der Transkomplementation. Die *in vitro* Transkripte der drei Reporterkonstrukte wurden in mock oder mit nsP3 transfizierte (+ nsP3) BHK-J Zellen elektroporiert. Die Überstände wurden nach 48 h geerntet und entsprechend auf mock oder mit nsP3 transfizierten (+ nsP3) BHK-J Zellen passagiert. Nach 48 h wurde die RLuc-Aktivität in *Relative Light Units* (RLU) gemessen.

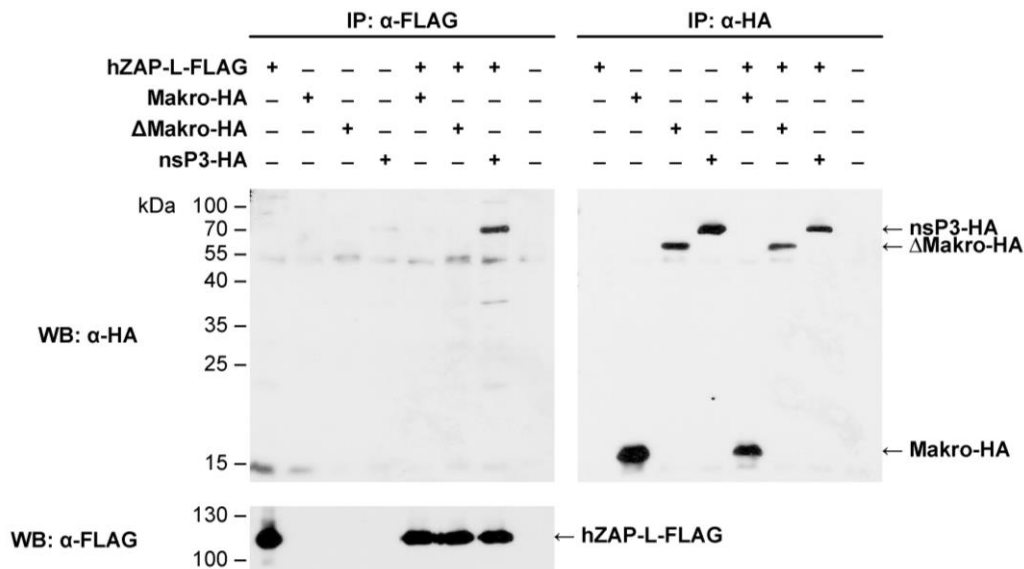
### 3.6 Interaktion des hZAP-L mit nsP3-Varianten des CHIKV

Die vorangegangenen Untersuchungen der alphaviralen Makrodomäne legen nahe, dass die Makrodomäne die virale Sensitivität gegenüber hZAP-L beeinflusst, und unterstützen damit die Theorien über deren mögliche Funktion als ZAP-Antagonist (Egloff *et al.*, 2006; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009). Ob hZAP-L und das alphavirale nsP3 bzw. die darin lokalisierte Makrodomäne dabei direkt miteinander interagieren, wurde bislang noch nicht nachgewiesen. Daher sollte dies zunächst für CHIKV überprüft werden, da CHIKV verglichen zu SINV den offenbar effektiveren ZAP-Antagonisten darstellt. Ähnlich der Interaktionsstudie von Park und Griffin (2009a) mit PARP1 und dem SINV nsP3 sollte hier die Interaktion des hZAP-L mit dem kompletten nsP3 (nsP3), der Makrodomäne (Makro) und dem C-terminalen Teil des nsP3 ohne Makrodomäne ( $\Delta$ Makro) des CHIKV mittels CoIP untersucht werden.

Ein hZAP-L-kodierendes Konstrukt mit C-terminalem Tripel-FLAG-Tag (phZAP-L-FLAG) sowie die beiden CHIKV Plasmide pnsP3-HA und pMakro-HA, jeweils mit C-terminalem HA-Tag, waren bereits verfügbar (Töller, 2012). Das  $\Delta$ Makro-Konstrukt musste zunächst auf Basis des pnsP3-HA Plasmids generiert werden (Klonierungsschema siehe 8.3.8). Der entsprechende Sequenzabschnitt wurde aus dem nsP3-Konstrukt amplifiziert und dabei mit den Schnittstellen für die beiden Enzyme *NdeI* und *BamHI* fusioniert. Nach entsprechender Restriktion wurde das Fragment in das pnsP3-HA Vektorrückgrat integriert und dadurch das Plasmid pnsP3- $\Delta$ Makro-HA etabliert. Da die Expression aller Konstrukte unter Kontrolle eines T7-Promotors steht, wurden zunächst BHK-J Zellen mit MVA-T7 zur Bereitstellung der T7-RNA-Polymerase infiziert (Sutter *et al.*, 1995). Anschließend wurden die Zellen mit dem hZAP-L-Konstrukt und jeweils einem der drei CHIKV Konstrukte cotransfiziert. Transfektionen der Einzelplasmide dienten als Kontrollen. Nach 24 h wurden die Zellen nicht-denaturierend lysiert und hZAP-L mit möglichen Assoziationspartnern über seinen Tag mit anti-FLAG Antikörper komplexiert. Die Detektion der eventuell copräzipitierten, HA-getaggten CHIKV Proteine erfolgte mit anti-HA Antikörper im Western Blot. Eine erfolgreiche CoIP und damit direkte Interaktion mit hZAP-L wurde nur für das komplette nsP3 nachgewiesen, während die beiden trunkierten nsP3-Varianten keine Interaktion mit hZAP-L zeigten (Abb. 3.20 IP:  $\alpha$ -FLAG, WB:  $\alpha$ -HA). Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde das FLAG-getaggte hZAP-L zudem mit anti-FLAG Antikörper detektiert (Abb. 3.20 IP/WB:  $\alpha$ -FLAG) sowie die HA-getaggten CHIKV Konstrukte mit anti-HA Antikörper komplexiert und detektiert (Abb. 3.20 IP/WB:  $\alpha$ -HA).



Im Vergleich zu der Interaktion des SINV nsP3 mit PARP1, die durch den C-terminalen Bereich des nsP3 ohne die Makrodomäne vermittelt wird (Park & Griffin, 2009a), ist für die Interaktion des CHIKV nsP3 mit hZAP-L offensichtlich das gesamte nsP3 inklusive der Makrodomäne relevant. Dies suggeriert eine funktionelle Bedeutung der Makrodomäne für die Interaktion mit hZAP-L oder eine dafür erforderliche Proteinfaltung, die nur von dem vollständigen nsP3 eingenommen werden kann.

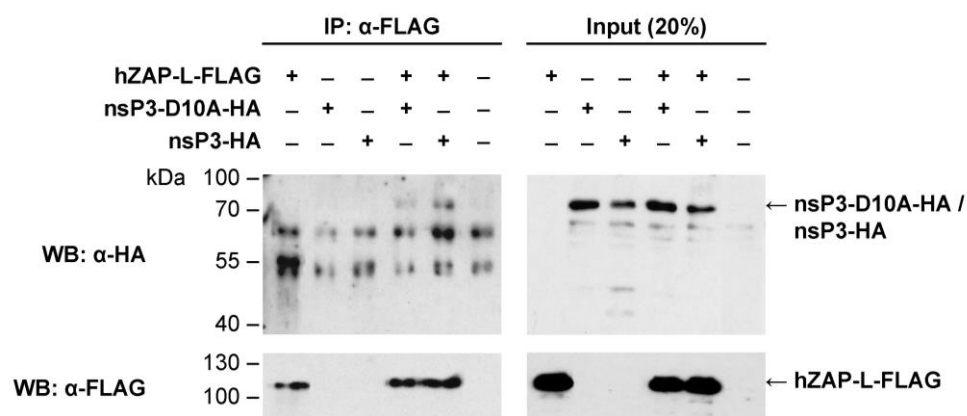


**Abb. 3.20: CoIP des hZAP-L mit CHIKV nsP3 und nsP3-Fragmenten.** MVA-T7 infizierte BHK-J Zellen wurden mit den Plasmiden für hZAP-L-FLAG und CHIKV nsP3-HA, CHIKV Makro-HA (Makrodomäne) oder CHIKV ΔMakro-HA (C-terminales nsP3 ohne Makrodomäne) cotransfiziert. Nach nicht-denaturierender Zelllyse wurden die Komplexe mit anti-FLAG Antikörper präzipitiert. Die Detektion der copräzipitierten Proteine erfolgte nach SDS-PAGE im Western Blot mit anti-HA Antikörper (links oben). Die Transfektion der Einzelplasmide diente als Kontrolle der CoIP-Spezifität und der Proteinexpression. Für letztere wurden die Proteine mit gegen den eigenen Tag gerichteten Antikörpern immunpräzipitiert und detektiert (anti-FLAG, links unten; anti-HA, rechts). IP = Immunpräzipitation, WB = Western Blot.

Da die CHIKV Makrodomänen-Mutante D10A aufgrund ihres Replikationsdefizits nicht in Infektionsexperimenten untersucht werden konnte (siehe Abschnitt 3.5.2.2), sollte ein möglicher Effekt des Aminosäureaustausches auf das Interaktionsverhalten mit hZAP-L durch CoIP analysiert werden. Dabei sollte die Interaktion des hZAP-L mit dem CHIKV nsP3 bzw. dem CHIKV nsP3-D10A verglichen werden, da die Makrodomäne alleine zur Bindungsvermittlung in der CoIP nicht ausreichte (s.o.). Die beiden Konstrukte phZAP-L-FLAG und pnsP3-HA standen bereits zur Verfügung (Töller, 2012). Zur Herstellung des Konstruktes für die nsP3-Mutante wurde ein kurzes Fragment mit Kodierung des D10A-Austausches via

*NdeI/HincII*-Verdau aus dem Plasmid pMakro-D10A-HA (siehe Abschnitt 3.5.1.1) isoliert (Klonierungsschema siehe 8.3.8). Dieses Fragment wurde in das ebenso verdaute Plasmid pnsP3-HA integriert. Hierdurch wurde das Konstrukt pnsP3-D10A-HA etabliert, in dem die Expression der nsP3-Mutante unter Kontrolle eines T7-Promotors steht.

Nach Infektion von BHK-J Zellen mit MVA-T7 für die Expression der T7-RNA-Polymerase wurden die Zellen mit phZAP-L-FLAG und jeweils einem der beiden CHIKV Konstrukte cotransfiziert. Transfektionen der drei Einzelplasmide dienten als Kontrollen. Nach 24 h wurden die Zellen nicht-denaturierend lysiert und hZAP-L zusammen mit möglichen Assoziationspartnern über seinen FLAG-Tag mit anti-FLAG Antikörper komplexiert. Die Detektion der eventuell copräzipitierten CHIKV Proteine erfolgte mit anti-HA Antikörper im Western Blot (Abb. 3.21, IP:  $\alpha$ -FLAG, WB:  $\alpha$ -HA). Beide nsP3-Varianten konnten mit hZAP-L coimmunpräzipitiert werden. Dabei war die Bandenintensität des wt nsP3 jedoch etwas stärker als die des nsP3-D10A. Auch das immunpräzipitierte hZAP-L (Abb. 3.21, IP/WB:  $\alpha$ -FLAG) sowie die Expressionslevel der Proteine im Direktlysat und dadurch die eingesetzten Proteinmengen in der CoIP (Abb. 3.21, Input) wurden im Western Blot mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Obwohl der Bandenstärke zufolge das Input des wt nsP3 in die CoIP etwas geringer war als das der nsP3-Mutante, wurde das wt nsP3 im Nachweis der CoIP stärker detektiert.



**Abb. 3.21: CoIP des hZAP-L mit CHIKV nsP3 und D10A-mutiertem nsP3.** MVA-T7 infizierte BHK-J Zellen wurden mit den Plasmiden für hZAP-L-FLAG und CHIKV nsP3-HA oder CHIKV nsP3-D10A-HA cotransfiziert. Die Transfektionen der Einzelplasmide dienten als Kontrollen. Die Komplexe wurden nach nicht-denaturierender Zelllyse mit anti-FLAG Antikörper präzipitiert. Nach SDS-PAGE wurden copräzipitierte CHIKV Proteine mit anti-HA (links oben) und direkt präzipitiertes hZAP-L mit anti-FLAG Antikörper (links unten) detektiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression wurde den verschiedenen Zelllysaten vor der CoIP  $\frac{1}{6}$  des Probenvolumens entnommen (Input (20 %)) und mit anti-HA (rechts oben) bzw. anti-FLAG Antikörper (rechts unten) detektiert. IP = Immunpräzipitation, WB = Western Blot.

Demnach scheint die Interaktion des D10A-mutierten nsP3 mit hZAP-L verglichen zu wt nsP3 mit hZAP-L schwächer zu sein. Insgesamt ist also für die Interaktion mit hZAP-L das vollständige CHIKV nsP3 erforderlich und die Integrität der Aminosäure D10, welche für die ADP-Ribose-Bindung der Makrodomäne verantwortlich ist, von wichtiger Bedeutung.

### **3.7 Untersuchung der ADP-Ribose-Bindung alphaviraler Makrodomänen und der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L**

Anscheinend übt die Makrodomäne einen gewissen Einfluss auf die jeweilige Hemmbarkeit der verschiedenen Alphaviren durch hZAP-L aus. Dabei agiert sie offenbar als hZAP-L-Antagonist (Egloff *et al.*, 2006; Kerns *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009), wobei eine Interaktion über ADP-Ribose als gemeinsamen Liganden naheliegend ist. Für einige Alphaviren wurde bereits die Bindungsaffinität ihrer Makrodomäne zu ADP-Ribose bestimmt (Malet *et al.*, 2009; Neuvonen & Ahola, 2009; Rungrotmongkol *et al.*, 2010). CHIKV und VEEV zeigen eine relativ hohe Affinität (Malet *et al.*, 2009), während SFV keine Affinität für ADP-Ribose zu besitzen scheint (Neuvonen & Ahola, 2009). In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurden CHIKV und VEEV kaum bzw. gar nicht, SFV dagegen deutlich von hZAP-L gehemmt. Diese Beobachtungen deuten auf eine mögliche Korrelation der viralen ADP-Ribose-Affinität mit dem Inhibitionslevel durch hZAP-L hin. Um diese Theorie zu überprüfen, sollte die ADP-Ribose-Bindungsaffinität weiterer, unterschiedlich stark gehemmter Alphaviren sowie der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L mittels ITC bestimmt werden. Bei der ITC kann anhand der freiwerdenden (exotherme Reaktion) oder aufgenommenen Energie (endotherme Reaktion) während einer Bindungsreaktion unter anderem die Dissoziationskonstante  $K_d$  als Maß für die Affinität dieser Reaktion bestimmt werden.

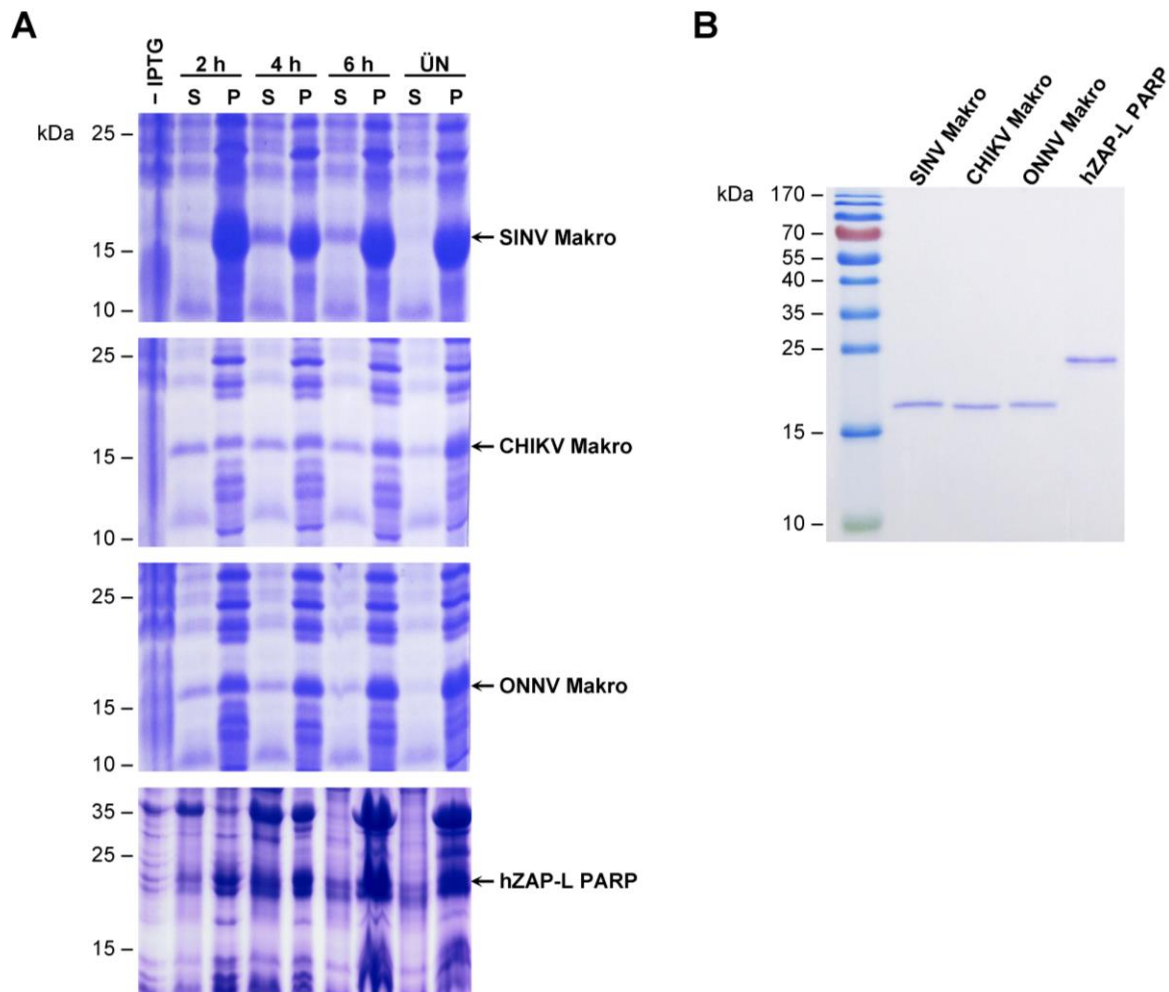
#### **3.7.1 Proteinexpression und -aufreinigung**

Für die ITC-Messungen wurden die Makrodomänen des SINV, ONNV und CHIKV als Vertreter für Alphaviren, die durch hZAP-L stark, mittel bzw. schwach gehemmt werden, ausgewählt. Da die Messung der Bindungsaffinität auf Proteinebene erfolgt, mussten die entsprechenden Proteine zunächst produziert und aufgereinigt werden.

Die virale Makrodomäne umfasst jeweils die ersten 160 Aminosäuren des nsP3 (Malet *et al.*, 2009), die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L die Aminosäuren 716 - 902 des Gesamtproteins (UniProtKB ID Q7Z2W4; The UniProt Consortium, (2013)). Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden von den Konstrukten pToto1101 (SINV Makrodomäne), pCHIKV-M (CHIKV Makrodomäne) bzw. pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L (PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L) durch PCR amplifiziert (Klonierungsschemata siehe 8.3.9). Da von ONNV kein infektiöser cDNA-Klon verfügbar war, wurde die Sequenz der ONNV Makrodomäne aus viralem RNA-Extrakt revers transkribiert. Die PCR-Fragmente wurden über die LIC-Methode (Aslanidis & de Jong, 1990) in den prokaryotischen Expressionsvektor pNIC28-Bsa4 kloniert, von dem das jeweilige Insert als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexahistidin (His)-Tag exprimiert wird (Savitsky *et al.*, 2010). Die durch IPTG induzierbare Proteinexpression erfolgte heterolog mit dem *E. coli*-Stamm BL21-(DE3)-R2-pRARE2 als Wirtsorganismus (Burgess-Brown *et al.*, 2008).

Zunächst wurden die geeigneten Bedingungen für die bakterielle Expression bezüglich Induktionsparameter ( $OD_{600}$  und IPTG-Konzentration) und Expressionsdauer bestimmt. Nach Induktion gemäß Savitsky *et al.* (2010) (0,1 mM IPTG bei  $OD_{600} = 2$ ) waren die Proteinexpressionslevel relativ gering, während die Induktion bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 mit 1 mM IPTG eine deutlich bessere Proteinausbeute erzielte (Daten nicht gezeigt).

Für die Optimierung der Expressionsdauer wurden die Bakterien nach Induktion mit 1 mM IPTG bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und mit einem chemischen Protein-Extraktionsreagenz lysiert. Nach Zentrifugation der Lysate wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der Gele detektiert, wie viel Protein zu den verschiedenen Zeitpunkten jeweils löslich im Überstand bzw. in der unlöslichen Pelletfraktion vorhanden war (Abb. 3.22A). Für die verschiedenen Proteine wurde der optimale Erntezeitpunkt mit einem möglichst hohen Anteil an löslichem Protein für eine anschließende Aufreinigung bestimmt. Für die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L (24,5 kDa) sowie die Makrodomäne des SINV (20,3 kDa) wurde dieser auf 4 h, für die Makrodomänen des CHIKV und ONNV (beide 20,2 kDa) auf 2 h nach Induktion festgelegt (Abb. 3.22A). Ein hoher Proteinanteil, vermutlich in Form sogenannter *inclusion bodies*, sedimentierte vor allem mit zunehmender Expressionsdauer mit dem Zelldebris als Pellet, wo er für eine anschließende Proteinaufreinigung nicht mehr zugänglich ist.



**Abb. 3.22: Expression und Aufreinigung viraler Makrodomänen und der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L. (A)** Bestimmung der Proteinexpressionsdauer. Die Proteinexpression in den mit verschiedenen Konstrukten transformierten Bakterien wurde durch IPTG-Zugabe induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Induktion wurden gleiche Volumina der Bakterienkulturen geerntet, lysiert und zentrifugiert. Proben des Überstands (S) und des Pellets (P) wurden durch SDS-PAGE (14%) aufgetrennt. Mittels Coomassie-Färbung der Gele wurde die Anwesenheit der exprimierten Proteine untersucht. Bakterienlysat ohne IPTG-Induktion (-IPTG) diente als Kontrolle. Makrodomänen ca. 20 kDa, PARP-ähnliche Domäne 24,5 kDa. **(B)** Aufreinigung der bakteriell exprimierten Proteine. Die Proteindomänen wurden für die jeweils in (A) ermittelte Dauer exprimiert (SINV Makro und hZAP-L PARP 4 h, CHIKV und ONNV Makro 2 h). Anschließend wurden die Expressionsbakterien geerntet und durch Sonifikation lysiert. Die Proteine wurden aus dem geklärten Lysat via Metall-Chelat-Chromatografie und Gelfiltration im FPLC-System aufgereinigt. Jeweils 1 µg der eluierten Proteine wurde nach SDS-PAGE (14%) durch Coomassie-Färbung des Gels nachgewiesen.

Um ausreichende Proteinmengen für die ITC-Messungen zu erhalten, wurden die Proteine in präparativem Maßstab unter Berücksichtigung der etablierten Parameter exprimiert. Nach bakterieller Lyse durch Sonifizieren wurden die löslichen Proteine aus dem Zentrifugationsüberstand in zwei aufeinanderfolgenden Schritten automatisiert im FPLC-System aufgereinigt. Zuerst wurden die Proteine durch Metall-Chelat-Chromatografie über die

Affinität ihrer His-Tags zu einer Nickel-Sepharose-Matrix weitgehend von den bakteriellen Proteinen getrennt. Eine größenabhängige Fraktionierung durch Gelfiltration ermöglichte anschließend, letzte Verunreinigungen von den Zielproteinen zu entfernen. Die Konzentration der Proteineluate wurde photometrisch mit dem Bradford Assay bestimmt und die Gesamtmenge an aufgereinigtem Protein davon ausgehend berechnet (Makrodomäne des SINV 860 µg, CHIKV 1800 µg, ONNV 2020 µg; PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L 550 µg). Die Reinheit der Proteineluate wurde mittels SDS-PAGE von jeweils 1 µg der aufgereinigten Proteine und anschließender Coomassie-Färbung des Gels verifiziert (Abb. 3.22B).

Die Proteindomänen konnten demnach erfolgreich in der Menge und Reinheit produziert werden, die jeweils den Anforderungen für anschließende ITC-Messungen entsprachen.

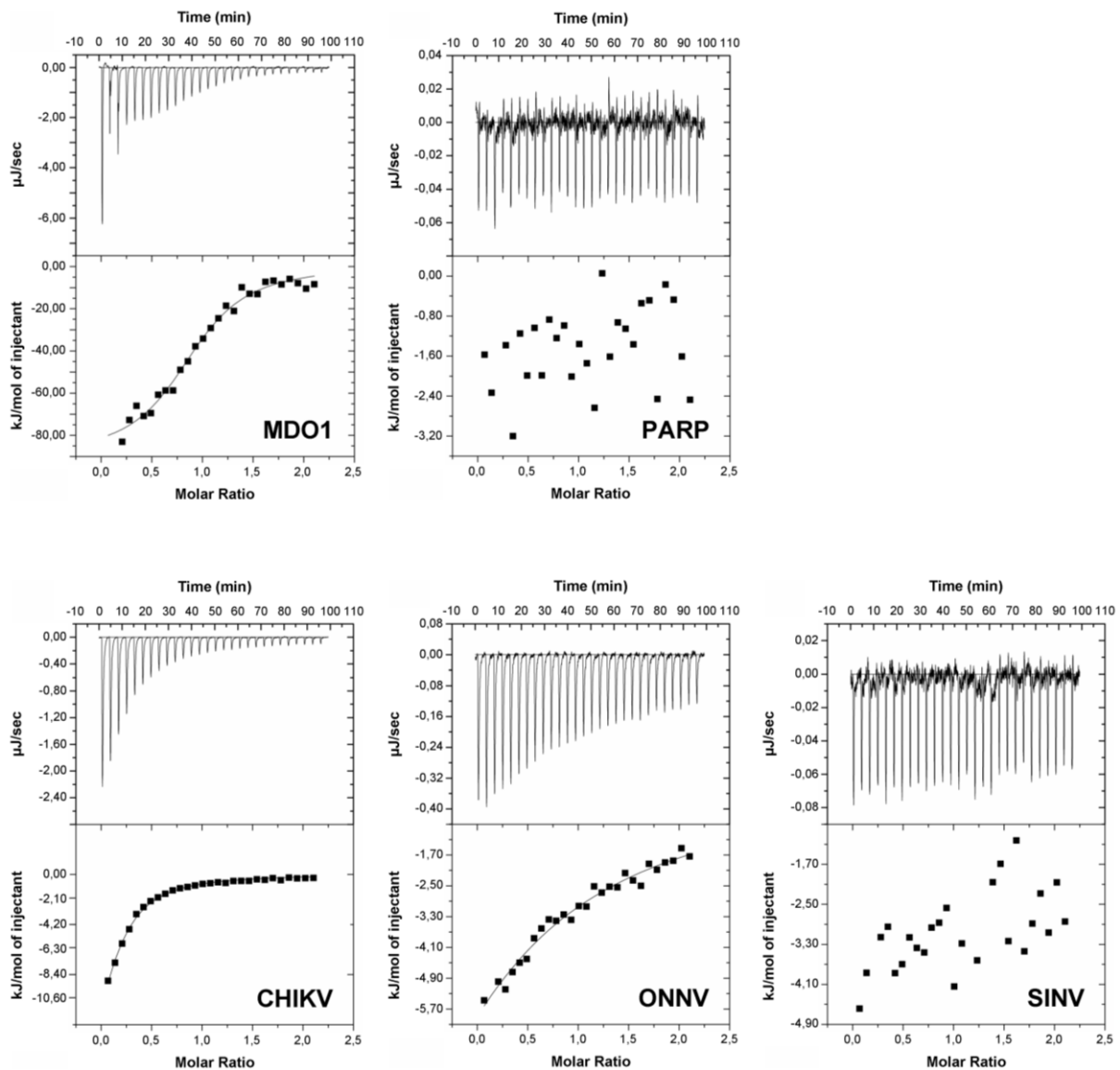
### 3.7.2 Bestimmung der ADP-Ribose-Affinität

Die ITC-Messungen der Proteinaffinität zu ADP-Ribose wurden unter Anleitung von Dr. Tero Ahola am Institut für Biotechnologie der Universität Helsinki in Finnland durchgeführt. Seine Arbeitsgruppe verfügt über die entsprechende maschinelle Ausstattung, vor allem aber über die Sachkenntnis, die die derartige Analyse viraler Makrodomänen erfordert (Egloff *et al.*, 2006; Malet *et al.*, 2009; Neuvonen & Ahola, 2009). Der ITC-Messung vorausgehend wurde der Puffer der Proteineluate durch Analysepuffer ausgetauscht und die Proteinkonzentration der erhaltenen Lösungen photometrisch bestimmt. Bei der PARP-ähnlichen Domäne sowie der SINV Makrodomäne wurde nach dem Pufferaustausch ein Proteinverlust von ca. 50% bzw. 75% festgestellt. Mithilfe der bekannten Konzentration und Molekularmasse der einzelnen Proteine konnten jeweils Proteinlösungen mit definierter Molarität zubereitet werden. Zu jeder Proteinlösung wurde von dem Liganden ADP-Ribose jeweils eine Lösung mit entsprechend zehnfacher Molarität in exakt dem gleichen Analysepuffer präpariert. Als Positivkontrolle für die ITC-Messungen wurde die Bindungsreaktion einer 10 µM Lösung der Makrodomäne des humanen *MACRO domain-containing protein 1* (MDO1) mit einer 100 µM ADP-Ribose-Lösung gemessen. Für CHIKV und ONNV wurden ebenfalls Messungen mit dieser Protein- und Ligandenkonzentration durchgeführt. Aufgrund der starken Streuung der Messdaten (Daten nicht gezeigt) wurde jedoch beschlossen, für zuverlässige Affinitätsbestimmungen die jeweils maximal verfügbare Proteinmenge bei den Messungen einzusetzen. Die Makrodomänen des CHIKV und ONNV wurden demnach als 35 µM bzw.

25  $\mu\text{M}$  Lösung zusammen mit einer 350  $\mu\text{M}$  bzw. 250  $\mu\text{M}$  ADP-Ribose-Lösung verwendet. Aufgrund des großen Proteinverlustes während der Probenvorbereitung konnte die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L sowie die Makrodomäne des SINV jeweils nur als 5  $\mu\text{M}$  Lösung zusammen mit einer 50  $\mu\text{M}$  ADP-Ribose-Lösung bei der Messung eingesetzt werden.

Die bei der ITC durch sukzessive Titration der ADP-Ribose zu dem jeweiligen Protein entstehenden Wärmeänderungen wurden von einem Mikrokalorimeter gemessen, verarbeitet und grafisch dargestellt. Abb. 3.23 zeigt für die hier analysierten Proteine die ITC-Messresultate mit jeweiliger Darstellung der ITC-Rohdaten (Diagramm oben) sowie der von diesen Daten abgeleiteten Bindungsisotherme (Diagramm unten). Die Bindungsisotherme von den Messungen der Makrodomänen des MDO1 sowie des CHIKV und ONNV zeigten ein exothermes Reaktionsprofil und damit ADP-Ribose-Bindung der Proteine. Dabei unterschied sich die jeweilige Bindungsaffinität der einzelnen Proteine, was anhand der verschiedenen großen Energiedifferenzen, d.h. der Größenunterschiede der jeweils höchsten Peaks, deutlich wurde (die unterschiedliche Skalierung der Diagramme ist hierbei zu beachten). Als genaues Maß für die Bindungsstärke wurde zudem die von der jeweiligen Bindungsisotherme abgeleitete Dissoziationskonstante  $K_d$  angegeben. Der hier für die Makrodomäne des MDO1 erhaltene  $K_d$ -Wert von  $0,99 \pm 0,17 \mu\text{M}$  für die ADP-Ribose-Bindung stimmte mit dem Literaturwert von  $0,9 \mu\text{M}$  nahezu überein (Neuvonen & Ahola, 2009). Für die ADP-Ribose-Affinität der CHIKV Makrodomäne wurde hier ein  $K_d$ -Wert von  $25,3 \pm 2,0 \mu\text{M}$  angegeben, der im Vergleich zu dem Literaturwert von  $5 \pm 0,4 \mu\text{M}$  eine geringere Bindungsstärke anzeigte (Malet *et al.*, 2009). Der  $K_d$ -Wert der ONNV Makrodomäne betrug  $53,8 \pm 21,5 \mu\text{M}$ . Trotz der großen Variation deutet dies auf eine insgesamt schwächere ADP-Ribose-Affinität verglichen zu der CHIKV Makrodomäne hin. Für die Makrodomäne des SINV und die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L konnte keine ADP-Ribose-Bindung detektiert werden; jedoch ist hierbei zu beachten, dass die Messungen nur mit einer sehr geringen Proteinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  durchgeführt werden konnten.

Insgesamt entsprechen die gemessenen  $K_d$ -Werte für die ADP-Ribose-Bindung der viralen Makrodomänen und der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L den Erwartungen, wenngleich eine Validierung der Ergebnisse ratsam wäre. Die Resultate unterstützen damit die Theorie, dass ein Zusammenhang zwischen starker ADP-Ribose-Affinität der Makrodomäne und schwacher Hemmung des entsprechenden Virus durch hZAP-L bestehen könnte.



**Abb. 3.23: ITC-Messungen zur Bestimmung der ADP-Ribose-Affinität.** Die Titrationskurven der ITC (jeweils oben) zeigen die Wärmeänderungen durch sukzessive Titration von ADP-Ribose zu Lösungen mit dem jeweils aufgereinigten Protein MDO1 (10 µM; Positivkontrolle), PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L (PARP, 5 µM), Makrodomäne des CHIKV (35 µM), ONNV (25 µM) bzw. SINV (5 µM) bei 25°C. Die von diesen Daten abgeleitete Bindungsisotherme ist jeweils im unteren Diagrammabschnitt dargestellt.

### 3.8 Transribosylierungsstudie des hZAP-L mit PARP12 und PARP15

Bei der ITC-Messung konnte unter den gegebenen Versuchsbedingungen keine Bindung der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L zu ADP-Ribose detektiert werden. Dieses Resultat ist im Einklang mit der Beobachtung von Kleine *et al.* (2008), dass hZAP-L zumindest zur Auto-ADP-Ribosylierung nicht fähig und dessen PARP-ähnliche Domäne demnach katalytisch inaktiv ist. Dennoch konnten Leung *et al.* (2011a) deutliche (Poly)ADP-Ribose-Modifikationen an



immunpräzipitiertem endogenen und transfizierten hZAP nachweisen. Diese Modifikationen könnten hZAP von anderen PARP-Familienmitgliedern angefügt worden und trotz der katalytischen Inaktivität des hZAP-L für dessen Funktion notwendig sein (Leung *et al.*, 2011a). Derartige Transmodifikationen sind unter PARPs bereits bekannt (Gibson & Kraus, 2012; Loseva *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2011; Sbodio *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 2002). Da eine Interaktion des hZAP-L mit PARP12 sowie PARP15 bereits nachgewiesen werden konnte, sind diese beiden PARPs möglicherweise auch an der ADP-Ribosylierung des hZAP-L beteiligt (Leung *et al.*, 2011a).

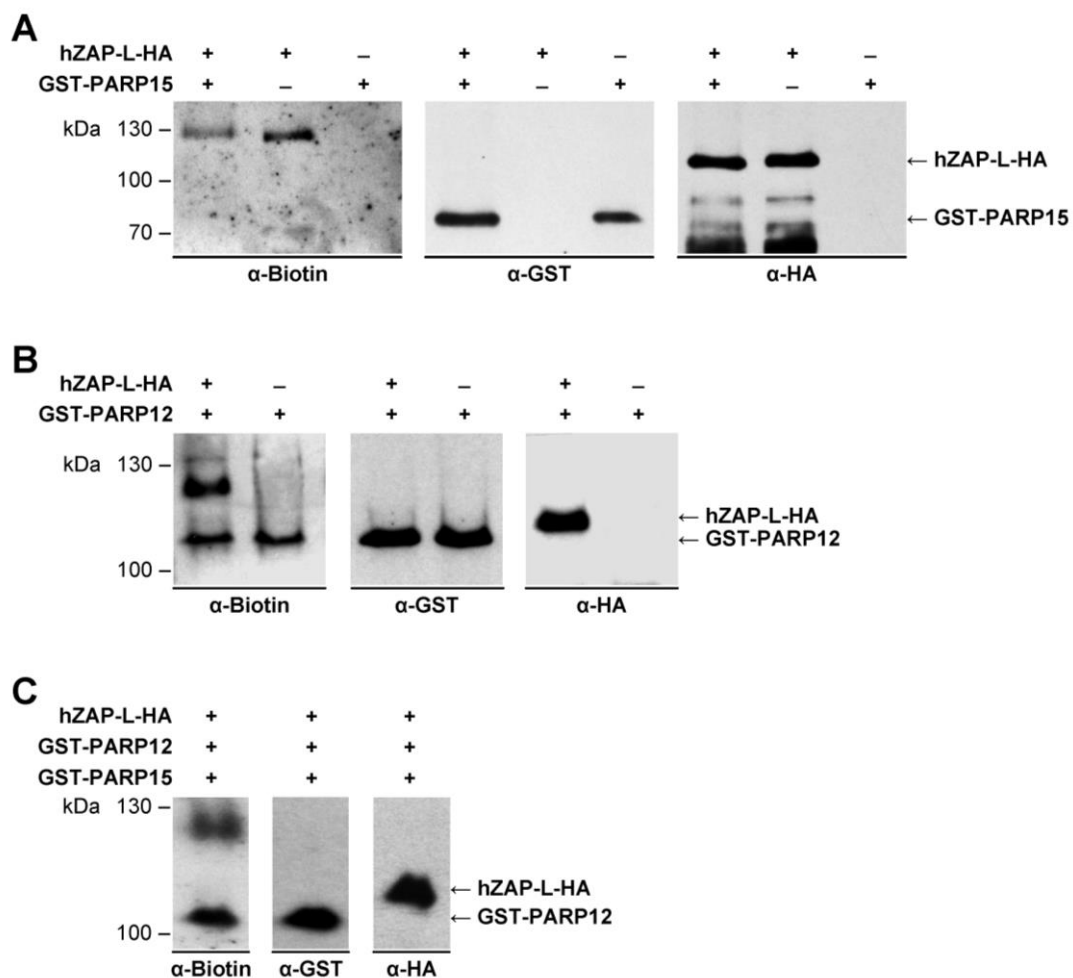
Diese Hypothese wurde im Folgenden in enzymatischen ADP-Ribosylierungsuntersuchungen überprüft. Dazu wurde hZAP-L aus induzierten Flp-In T-REx-hZAP-L Zellen über seinen HA-Tag aufgereinigt und die beiden Glutathion-S-Transferase (GST)-getaggten, ebenfalls eukaryotisch exprimierten Proteine PARP12 und PARP15 kommerziell erworben. In verschiedenen Reaktionsansätzen wurden die Proteine entweder einzeln oder zusammen auf mögliche Auto- bzw. Transribosylierung untersucht. Hierbei wurde eine analoge Vorgehensweise zu den in Kleine *et al.* (2008) beschriebenen *Enzymatic PARP assays* angewandt, jedoch mit biotinyliertem statt radioaktiv markiertem NAD<sup>+</sup> als ADP-Ribose-Donor (Bachran *et al.*, 2007). In einer ersten Versuchsreihe wurden hZAP-L-HA (Substrat) und GST-PARP15 (Enzym) jeweils einzeln und zusammen auf ADP-Ribosylierung untersucht. Nach Reaktionsablauf wurden die Ansätze im Western Blot durch serielle Immundetektion mit Antikörpern gegen eventuelle ADP-Ribosylierung (anti-Biotin), PARP15 (anti-GST) und hZAP-L (anti-HA) getestet (Abb. 3.24A). Auf dem Biotin-Blot waren weder Banden auf Höhe der GST-PARP15 (76 kDa) noch des hZAP-L-HA (103 kDa) nachweisbar, es hatte also weder Auto- noch Transribosylierung bei einem der beiden Proteine stattgefunden. Die unspezifischen Banden bei etwa 130 kDa waren bereits in den Eluaten nach hZAP-L-HA Aufreinigung vorhanden (Daten nicht gezeigt). Anhand der Detektion mit anti-GST bzw. anti-HA Antikörper wurde die Anwesenheit der GST-PARP15 bzw. hZAP-L-HA in den Reaktionsansätzen bestätigt.

In der zweiten Versuchsreihe wurden hZAP-L-HA und GST-PARP12 analysiert. Die anschließende gelelektrophoretische Auftrennung zwischen hZAP-L-HA und GST-PARP12 war aufgrund der sehr ähnlichen Molekularmassen beider Proteine von 103 bzw. 106 kDa etwas erschwert. Nach langer Laufzeit eines 5%igen Gels waren auf dem anschließenden Biotin-Blot in beiden Ansätzen nur Banden auf der Höhe der GST-PARP12, aber nicht des hZAP-L-HA detektierbar (Abb. 3.24B). Demnach erfolgte nur die Autoribosylierung der GST-PARP12,

aber keine Transribosylierung des hZAP-L-HA. Die Anwesenheit der GST-PARP12 bzw. des hZAP-L-HA wurde durch die Analyse mit anti-GST bzw. anti-HA Antikörper überprüft.

Auch in einem Reaktionsansatz mit allen drei Proteinen zusammen erfolgte keine Transribosylierung des hZAP-L-HA, der anti-Biotin-Nachweis zeigte lediglich autoribosylierte GST-PARP12 (Abb. 3.24C). Aufgrund der langen Laufzeit des Gels war GST-PARP15 aus diesem bereits herausmigriert und in dem GST-Blot nicht mehr nachweisbar.

Letztendlich konnte für hZAP-L weder Autoribosylierung noch Transribosylierung durch die beiden anderen PARP-Familienmitglieder detektiert werden. Möglicherweise sind an der erfolgreichen Transmodifikation des hZAP-L aber noch weitere Faktoren beteiligt.



**Abb. 3.24: ADP-Ribosylierungsstudien des hZAP-L mit PARP12 und PARP15. (A)** Aufgereinigtes hZAP-L-HA (103 kDa) und GST-PARP15 (76 kDa) wurden mit biotinyliertem NAD<sup>+</sup> 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionsansätze wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine bzw. Proteinmodifikationen im Western Blot mit anti-Biotin (ADP-Ribosylierung), anti-GST (PARP15) und anti-HA Antikörper (hZAP-L) nachgewiesen. Zwischen den verschiedenen Antikörper-Detektionen wurde die Membran jeweils gestrippt. **(B)** Durchführung wie in (A) mit hZAP-L-HA (103 kDa) und GST-PARP12 (106 kDa). Wegen sehr ähnlicher Molekularmassen beider Proteine wurde ein 5%iges SDS-Gel verwendet. **(C)** Durchführung wie in (A) mit hZAP-L-HA, GST-PARP12 und GST-PARP15; SDS-PAGE wie in (B).

## 4. Diskussion

### 4.1 Ausmaß der hZAP-vermittelten Hemmung von Alphaviren

Die ständige Dynamik der Virus-Wirt-Interaktion übt einen starken Einfluss auf die virale Pathogenese aus und veranlasst den Wirt zur Entwicklung von Strategien und zellulären Faktoren, um die virale Replikation zu verhindern. Zu diesen gehört auch ZAP, das zuerst als antiviraler Wirtsfaktor gegen Retroviren und anschließend gegen weitere Vertreter verschiedener Virusfamilien entdeckt wurde, indem es die Degradation der viralen mRNA veranlasst (Gao *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Xuan *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Bick *et al.* (2003) zeigten die inhibitorische Aktivität des Ratten-ZAP-Orthologs gegen verschiedene Alphaviren, wobei die einzelnen Viren unterschiedlich stark gehemmt werden. Die Hemmung gegen SINV ist am größten, gefolgt von RRV, SFV und VEEV. Die antialphavirale Aktivität des hZAP wurde bislang nur gegen SFV demonstriert, wobei die lange Spleißvariante hZAP-L ein größeres Hemmungspotenzial besitzt als das kurze hZAP-S (Kerns *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der beiden hZAP-Isoformen gegen die humanpathogenen Alphaviren BFV, CHIKV, EEEV, ONNV, RRV, SFV, SINV, VEEV und WEEV untersucht. Wie bei rZAP variierte auch das Ausmaß der Virushemmung bei hZAP, wobei hZAP-L entsprechend der Beobachtung von Kerns *et al.* (2008) gegen alle Viren einen potenteren Inhibitor darstellte als hZAP-S. Die Reihenfolge der Hemmungsintensität der verschiedenen Alphaviren stimmte zwischen den beiden hZAP-Isoformen weitestgehend überein.

Um den antiviralen Maßnahmen einer Wirtszelle zu entkommen, haben Viren verschiedene Strategien entwickelt. Abhängig von deren Effektivität kann so das Ausmaß der zellulären Restriktion beeinflusst werden. Hier sowie in der Studie von Bick *et al.* (2003) konnte SINV am stärksten und VEEV am geringsten bzw. gar nicht durch ZAP gehemmt werden. Ob die unterschiedliche Hemmbarkeit mit der verschieden stark ausgeprägten Virulenz bei beiden Viren direkt zusammenhängt, ist nicht eindeutig bewiesen. Während VEEV im Mausmodell hoch virulent war, erwies SINV sich als avirulent (Ryman *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2009). Alphaviren blockieren durch den *host shutoff* die Induktion antiviraler ISGs (Akhrymuk *et al.*, 2012; Atasheva *et al.*, 2010; Toribio & Ventoso, 2010; Yin *et al.*, 2009). SINV und VEEV zeigen *in vitro* die gleiche Effektivität des *host shutoff* und verhindern gleichermaßen die

Aufregulation verschiedener ISGs, darunter auch ZAP (Yin *et al.*, 2009). Im Gegensatz zu SINV besitzt VEEV jedoch deutlich geringere Sensitivität gegenüber der initialen Immunantwort des Wirts sowie einem bereits etablierten antiviralen Status (Yin *et al.*, 2009). Ob und wie VEEV die Effektoren des antiviralen Status besser umgehen oder blockieren kann, ist dabei allerdings weitgehend unklar, verstärkt aber offensichtlich dessen Virulenz (Yin *et al.*, 2009). Beispielsweise inhibiert VEEV mithilfe seines C-Proteins die Funktion des Exportrezeptors CRM1 der Kernpore (Atasheva *et al.*, 2010; Atasheva *et al.*, 2008). Dieser Rezeptor gewährleistet jedoch die vorwiegend zytoplasmatische statt nukleäre Lokalisation des ZAP, das sowohl Kern-Ex- als auch Kern-Importsequenzen kodiert (Liu *et al.*, 2004). Ein direkter Einfluss eines funktional gestörten Kernporenkomplexes auf die antivirale ZAP-Aktivität wurde aber bisher noch nicht untersucht. Auch WEEV wurde in der vorliegenden Arbeit nur gering durch hZAP gehemmt. Peltier *et al.* (2013) konnten zeigen, dass das C-Protein des WEEV unabhängig von der Induktion des *host shutoff* den IRF-3-Signalweg unterdrückt, vermutlich durch Inhibition der Kerntranslokation des aktivierten IRF-3. Da die Induktion des hZAP zumindest in der frühen Phase nach Infektion direkt von IRF-3 abhängig ist (Wang *et al.*, 2010a), könnte WEEV auf diese Weise die hZAP-vermittelte Restriktion verzögern.

Neben der indirekten Manipulation der ZAP-Expression und -Lokalisation bietet auch die Wirkweise des ZAP mögliche Angriffspunkte für den viralen Antagonismus. Nach der direkten Bindung der viralen mRNA rekrutiert ZAP unter anderem die Deadenylase PARN und das RNA-Exosom zur 3'-5'-Degradation der viralen mRNA (Guo *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2011; Zhu & Gao, 2008). Auch der Hauptabbauweg zellulärer mRNA funktioniert gemäß der Deadenylierungs-abhängigen Vorgehensweise (Couttet *et al.*, 1997; Guhaniyogi & Brewer, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002; Parker & Song, 2004). Bei der genomischen und subgenomischen RNA des SINV und VEEV, die wie alle alphaviralen mRNAs strukturell der zellulären mRNA ähneln, wurde von Garneau *et al.* (2008) ein Mechanismus zu deren Schutz vor Deadenylierung und exosomalem Abbau entdeckt. Die Transkripte unterdrücken durch bestimmte Strukturelemente in der 3'-UTR die Degradierung ihres Poly(A)-Schwanzes und vermeiden so zum einen den mRNA-Abbau und gewährleisten zum anderen eine effiziente Translation der Virusproteine. Da die 3'-UTRs der Alphaviren sehr heterogen sind (Pfeffer *et al.*, 1998), unterscheidet sich vermutlich auch deren protektive Wirksamkeit gegen die generelle zelluläre und möglicherweise auch die ZAP-vermittelte

mRNA-Degradation. Ob zusätzlich auch Komponenten des 5'-3'-RNA-Abbaus in der antiviralen ZAP-Aktivität involviert sind, ist noch unbekannt (Zhu & Gao, 2008).

Neben diesen allgemeinen Schutz- und Verteidigungsmechanismen haben einige Viren offenbar auch eine spezifische, ZAP-gerichtete Abwehrstrategie entwickelt (Egloff *et al.*, 2006; Kerns *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009; Zhu & Gao, 2008). Von den allgemeinen Mechanismen betreffen die IFN-assoziierten vermutlich auch nur hZAP-S, aber nicht das konstitutiv exprimierte hZAP-L (Hayakawa *et al.*, 2011). Daher wird diskutiert, dass der gerichtete Antagonismus vor allem die antivirale Aktivität des hZAP-L angreift (Egloff *et al.*, 2006; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009). Dieser Konflikt zwischen Virus und hZAP wird hier im weiteren Verlauf diskutiert.

## 4.2 Antivirale Aktivität des endogenen hZAP-L

Die inhibitorische Aktivität des überexprimierten hZAP-L gegen Alphaviren konnte in den hier durchgeführten Infektionsexperimenten deutlich gezeigt werden. Um zusätzlich die antivirale Potenz des endogenen hZAP-L in den humanen Flp-In T-REx-293 Zellen zu untersuchen, wurde dessen konstitutive Expression posttranskriptionell über den Mechanismus der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz manipuliert (Orban & Izaurralde, 2005; Tomari & Zamore, 2005). In vorhergehenden ZAP-*knockdown*-Studien befand sich die Zielregion der siRNAs jeweils in der N-terminalen Region des ZAP, so dass beide Isoformen vom *knockdown* betroffen waren (MacDonald *et al.*, 2007; Mao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Zur selektiven Analyse der langen Isoform wurde hier eine siRNA konstruiert, die gegen einen Bereich in der PARP-ähnlichen Domäne und somit spezifisch gegen hZAP-L gerichtet war. Der hZAP-L-*knockdown* wurde auf Translationsebene via Immundetektion und auf Transkriptionsebene mittels quantitativer *Real-time* RT-PCR überprüft. Während bisherige Studien lediglich relative Konzentrationsänderungen der hZAP-mRNAs nach Zellstimulation zeigen (Hayakawa *et al.*, 2011; Mao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011), wurde bei der etablierte hZAP-*Real-time* RT-PCR die absolute zelluläre Konzentration der hZAP-L- und hZAP-S-mRNA detektiert und konnte direkt miteinander verglichen werden (Gläser *et al.*, 2014).

In den Kontrollzellen war die Konzentration der hZAP-L-mRNA um ca. 1 Log-Stufe höher als die der hZAP-S-mRNA. Im Gegensatz zu hZAP-L war das endogene hZAP-S auf der

Proteinebene nicht detektierbar, obwohl überexprimiertes hZAP-S erfolgreich nachgewiesen werden konnte. Vermutlich reichte die Sensitivität des hZAP-spezifischen Antikörpers nicht aus, um die geringe intrinsische Expression des hZAP-S zu detektieren (Hayakawa *et al.*, 2011). Nach *reverse/forward* Transfektion (Yi *et al.*, 2011) der hZAP-L-spezifischen siRNA war die Konzentration der hZAP-L-mRNA auf das Niveau der hZAP-S-mRNA reduziert, während letztere von dem *knockdown* unbeeinflusst war. Auch hZAP-L konnte nun auf der Proteinebene nicht mehr detektiert werden. Demnach reichte die Reduktion der mRNA um 1 Log-Stufe entweder aus, um die Proteinsynthese weitgehend zu unterbinden oder zumindest die Sensitivitätsgrenze des Antikörpers durch Verringerung der Proteinmenge zu unterschreiten. Neben dem siRNA-vermittelten exonukleolytischen Abbau einer mRNA kann diese auch ohne abgebaut zu werden nur an der Translation gehindert werden (Carthew & Sontheimer, 2009; Tomari & Zamore, 2005). Die mRNA wird so zwar weiterhin in der quantitativen Analyse erfasst, aber das entsprechende Protein kann aufgrund der Translationshemmung nicht produziert und detektiert werden. Da generell in Säugerzellen die Produktionsrate einer mRNA viel geringer ist als die des entsprechenden Proteins (Vogel & Marcotte, 2012) und das Ausmaß eines *knockdown* zwischen mRNA und Protein oftmals nicht korreliert, ist es wichtig, den siRNA-vermittelten Effekt sowohl durch Messung des mRNA- als auch des Proteinlevels zu untersuchen (Alemán *et al.*, 2007). Es ist demnach gut möglich, dass die Proteinmenge nach dem *knockdown* des hZAP-L nicht proportional zu der mRNA-Menge abgenommen hat, die Konzentrationsdifferenz auf Proteinebene also mehr als 1 Log-Stufe betrug.

Die vergleichende Infektion von Kontroll- und *knockdown*-Zellen mit SINV und CHIKV zeigte, dass durch hZAP-L-Abwesenheit die virale Replikation deutlich begünstigt wurde und bereits 24 h p.i. die Plateauphase des Wachstums erreicht war. Der Titer des SINV war zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den Kontrollzellen um 2,5 Log-Stufen, der des CHIKV um 0,6 Log-Stufen erhöht. Die unterschiedliche Begünstigung der SINV und CHIKV Replikation ist im Einklang mit den Resultaten der Infektionsexperimente im Überexpressionssystem, bei denen SINV durch das überexprimierte hZAP-L auch viel stärker gehemmt wurde als CHIKV. Die Hemmung des Viruswachstums nach hZAP-L-Überexpression und dessen Förderung nach hZAP-L-*knockdown* sind also proportional zueinander. Das Ausmaß bei dem *knockdown* ist dabei insgesamt etwas schwächer, da die physiologische Konzentration des endogenen hZAP-L in der Zelle geringer ist als nach der induzierten Überexpression. Folglich ist auch das

endogen exprimierte hZAP-L bereits in der frühen Phase nach Infektion wichtig für die alphavirale Restriktion, indem es deren Replikation effektiv einschränkt. Unterstützt wird diese Feststellung zusätzlich von Karki *et al.* (2012), die bereits eine starke antivirale Aktivität des endogenen rZAP gegen SINV detektieren konnten.

### 4.3 Einfluss des ZRE auf die hZAP-vermittelte Inhibition

Die N-terminale Domäne mit den vier CCCH-Zinkfingermotiven wurde als die dominante funktionelle Domäne für die antivirale Aktivität des ZAP beschrieben (Gao *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010b). Die Zinkfinger motive vermitteln die direkte Interaktion mit dem ZRE einer viralen mRNA und leiten die mRNA-Degradation ein (Guo *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2007; Jeong *et al.*, 2010). Für verschiedene ZAP-sensitive Viren wurde bereits deren ZRE(s) lokalisiert, jedoch ohne gemeinsame Sequenz- oder Strukturelemente identifizieren zu können (Guo *et al.*, 2004; Mao *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2011). Da SINV vergleichsweise stark von ZAP inhibiert wird (Bick *et al.*, 2003), wurde erwogen, ob das ZRE des SINV möglicherweise besonders effektiv von ZAP gebunden wird. Daraus wiederum folgte die Frage, ob die ZAP-Sensitivität eines ZRE mit der Hemmung des Virus durch ZAP korreliert, ob also ein sensitives ZRE gleichbedeutend mit einer starken ZAP-vermittelten Hemmung ist.

Werden die Literaturwerte für die Sensitivität verschiedener ZREs gegenüber der rZAP-vermittelten Degradation jeweils verglichen mit der Hemmung des entsprechenden Virus durch rZAP, kann eine dieser Theorie entsprechende Tendenz festgestellt werden. Das ZRE des SINV zeigt die höchste Sensitivität (45-fach) und gleichzeitig wird das Viruswachstum am stärksten gehemmt (ca. 6 Log-Stufen) (Bick *et al.*, 2003; Guo *et al.*, 2004). Das Ebola-Virus folgt mit 35-fach erhöhter ZRE-Sensitivität und ca. 4 Log-Stufen Virusinhibition (Müller *et al.*, 2007). Bei MLV und Marburg-Virus ist das entsprechende ZRE-Fragment 25- bzw. 20-fach sensitiver und die Virusreplikation um 2 bzw. 1 Log-Stufen reduziert (Guo *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2013; Müller *et al.*, 2007). Demzufolge träfe es zu, dass die Sensitivität eines ZRE mit der Stärke der Hemmung durch rZAP korreliert. Allerdings ist fraglich, inwieweit die Resultate von unabhängigen Experimenten direkt miteinander verglichen werden können und ob die Theorie pauschalisiert und auch auf hZAP übertragen werden kann.

Für CHIKV wurde bislang noch kein ZRE identifiziert und in den hier durchgeführten Experimenten wurde das Viruswachstum um maximal 1 Log-Stufe von hZAP inhibiert. Deshalb wurde überprüft, ob CHIKV nach Integration des vermutlich stark sensitiven ZRE des SINV stärker von hZAP gehemmt wird. Das ZRE des SINV wurde von Guo *et al.* (2004) als das sogenannte M-Fragment lokalisiert und durch weitere Verkürzungsversuche auf ein minimales, sogenanntes N-Fragment reduziert. Mit beiden Fragmenten wurde eine CHIKV Chimäre erzeugt, bei der SINV M bzw. N unter der Kontrolle eines duplizierten subgenomischen Promotors steht, um die Integrität und Expression der nsPs und sPs weiterhin zu gewährleisten. Da die RNA und nicht das Protein die Zielstruktur der ZAP-vermittelten Degradation ist (Guo *et al.*, 2004; Zhu & Gao, 2008), wurden die Fragmente jeweils ohne Translationsinitiationscodon ATG in das Genom eingebracht. Die Chimäre CHIKV + SINV M zeigte verglichen zu den anderen Viren ein generell schlechteres Wachstum und wurde außerdem nach hZAP-L-Induktion um zusätzlich fast 1 Log-Stufe mehr gehemmt als CHIKV wt. Da die Flp-In T-REx-Zellen konstitutiv endogenes hZAP-L exprimieren, könnte das von der Induktion unabhängige Wachstumsdefizit eventuell auf dessen antivirale Aktivität zurückzuführen sein. Die exponierte Position des integrierten M-Fragments zwischen den beiden ORFs der mRNA könnte die Zugänglichkeit und damit die Abbaurrate zusätzlich erhöhen. Da außerdem die Translation aufgrund des fehlenden Initiationscodons verhindert ist, wird dieser RNA-Bereich auch nicht von ribosomalen Translationskomplexen geschützt (Zhu *et al.*, 2012). Die zusätzliche Hemmung bei Induktion des transgenen hZAP-L könnte durch die mengenmäßige Proteinzunahme an hZAP-L erklärt werden. Die CHIKV + SINV M Chimäre wuchs auch auf hZAP-S-Zellen generell schlechter, möglicherweise weil auch diese endogenes hZAP-L exprimieren. Eine weitere Zunahme der Hemmung bei hZAP-S-Induktion konnte nicht detektiert werden. Die beschriebenen Effekte waren bei der Chimäre CHIKV + SINV N deutlich schwächer ausgeprägt. Allerdings zeigte das N-Fragment auch bereits in der Studie von Guo *et al.* (2004) eine geringere Sensitivität gegenüber der ZAP-vermittelten Degradation als das M-Fragment.

Das veränderte Replikationsverhalten der CHIKV + SINV M Chimäre ist nicht lediglich durch das größere Insert (1390 nt) im Vergleich zu CHIKV + SINV N (653 nt) verursacht. In die Kontrollchimäre wurde ein der Größe des M-Fragments entsprechendes Fragment des ZAP-unempfindlichen YFV eingebracht, ohne dabei das Wachstum oder die Hemmbarkeit der



Chimäre zu modifizieren. Außerdem erreichte die CHIKV + SINV M Chimäre auf BHK-J Zellen, die kein humanes ZAP exprimieren, einen ähnlichen Titer wie die anderen Viren.

Um besser einordnen zu können, ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf die Insertion des vermutlich sehr sensitiven SINV ZRE zurückzuführen ist, müsste zunächst der grundlegende Mechanismus der ZAP-ZRE-Interaktion aufgeklärt werden. Bislang ist unbekannt, wie die Erkennungssequenz innerhalb einer viralen mRNA beschaffen sein muss, um von den CCCH-Motiven des ZAP gebunden zu werden. Für Zinkfinger motive des CCCH-Typs erfolgt die Bindung einzelsträngiger RNA vornehmlich sequenzspezifisch (Auweter *et al.*, 2006). Die Zinkfinger motive des ZAP zeigen in ihrem Aufbau jedoch Heterogenität gegenüber dem typischen CCCH-Konsensusmotiv (Guo *et al.*, 2004). Auch wenn jedes der vier Motive zur RNA-Bindung fähig ist (McColl *et al.*, 1999; Michel *et al.*, 2003), sind vor allem das zweite und vierte Motiv für die antivirale Aktivität entscheidend (Chen *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2004). Vermutlich erkennt ZAP spezifische Tertiärstrukturen der viralen mRNA mit einigen bestimmten, präzise positionierten Nukleotiden, was die theoretische Vorhersage möglicher ZREs erheblich erschwert (Chen *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2004).

Scheinbar determiniert das ZRE einer viralen mRNA in gewissem Maße deren Sensitivität gegenüber der ZAP-vermittelten Degradation. Obwohl aber die ZRE-bindenden CCCH-Motive der beiden hZAP-Isoformen identisch sind, unterscheidet sich deren antivirale Aktivität erheblich voneinander. Außerdem erreichte die CHIKV Chimäre trotz Insertion des ZRE des SINV nicht das gleiche Inhibitionslevel durch hZAP-L wie SINV wt. Verantwortlich für die starke Hemmung des SINV wt könnte ein additiver Effekt des ZRE mit weiteren, etwas weniger ZAP-sensitiven Bereichen innerhalb der SINV RNA sein. Andererseits scheinen aber neben der ZAP-ZRE-Interaktion weitere Faktoren oder Mechanismen zu existieren, die das Ausmaß der ZAP-vermittelten Restriktion modifizieren.

#### **4.4 Relevanz der PARP-ähnlichen Domäne für die antivirale Aktivität des hZAP-L**

Von den beiden hZAP-Spleißvarianten besitzt hZAP-L ein deutlich größeres antivirales Potenzial gegen Alphaviren als hZAP-S (Kerns *et al.*, 2008). Beide Isoformen unterscheiden sich lediglich durch die zusätzliche C-terminale PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L (Kerns *et al.*, 2008). Die genaue Funktion der Domäne bei ZAP ist noch unbekannt, führt aber

offensichtlich zu einer stärkeren antiviralen Aktivität. Dementsprechend wurden in der PARP-ähnlichen Domäne verschiedener Primaten-Orthologe des ZAP, aber nicht in den Zinkfingermotiven, Merkmale der positiven Selektion gefunden (Cagliani *et al.*, 2012; Kerns *et al.*, 2008). Generell stehen vor allem die an der Wirtsimmunantwort beteiligten Gene unter besonders hohem Selektionsdruck (Barreiro & Quintana-Murci, 2010), der oftmals viral bedingt ist (Cagliani *et al.*, 2012). ZAP könnte sich also entweder auf eine effektivere Erkennung und Inhibition viraler Komponenten hin oder von der eigenen Erkennung durch virale Antagonisten weg entwickelt haben (Cagliani *et al.*, 2012; Kerns *et al.*, 2008). Das für die PARP-Familie typische Triadenmotiv der PARP-ähnlichen Domäne ist bei hZAP-L (YYV) gegenüber dem *bona fide*-Motiv katalytisch aktiver PARPs (HYE) stark verändert (Hottiger *et al.*, 2010; Kleine *et al.*, 2008). Entsprechend zeigt die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L *in vitro* keine katalytische ADP-Ribosylierungs-Aktivität (Kleine *et al.*, 2008).

Dass das alternative Triadenmotiv der katalytisch inaktiven PARP-ähnlichen Domäne dennoch unentbehrlich für die antialphavirale Aktivität des hZAP-L ist, konnte hier anhand verschiedener Triadenmotiv-Mutanten eindeutig demonstriert werden. Die Triaden-Aminosäuren wurden einzeln und gemeinsam durch Alanin oder die entsprechende Aminosäure des *bona fide*-Motivs ausgetauscht. Der Effekt der Mutation auf die antivirale Aktivität der jeweiligen hZAP-L-Variante war bei SINV und CHIKV vergleichbar. Bei allen Mutanten waren die CCCH-Motive, denen die hauptsächliche antivirale Aktivität zugesprochen wird (Guo *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2010b), unverändert. Dennoch war die Aktivität der Tripelmutanten (AAA und HYE) fast vollständig aufgehoben und damit sogar noch geringer als die des hZAP-S, das gar keine PARP-ähnliche Domäne besitzt. Bei Law *et al.* (2010) führte die Expression einer mutierten ZAP-Variante nicht nur zu ungehemmtem sondern sogar leicht erhöhtem Viruswachstum. Ihre Erklärung war ein von der mutierten ZAP-Variante ausgehender dominant negativer Effekt auf die Aktivität des endogenen, funktionell aktiven ZAP, unter der Annahme dass ZAP homotypische Interaktionen eingehe (Chen *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2010; Law *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2011a). Interessant ist auch, dass die Insertion des *bona fide*-Motivs einen negativen Effekt auf die antivirale Aktivität des hZAP-L ausübte. Eine ähnliche Beobachtung machten Kleine *et al.* (2008) für PARP10, eine Mono-ADP-Ribosyltransferase mit dem Triadenmotiv HYI. Der Austausch zum *bona fide*-Motiv führte statt zu ADP-Ribose-Polymerase-Aktivität zum kompletten Aktivitätsverlust des Proteins.

Während die inhibitorische Aktivität der hZAP-L-Mehrfachmutanten fast vollständig verloren war, war die der Einzelmutanten meist nur reduziert. Eventuell könnte dies auf funktionelle Kompensation der einzelnen Aminosäuren untereinander zurückzuführen sein. Wahrscheinlicher wären allerdings strukturelle Veränderungen des Proteins durch den gleichzeitigen Austausch mehrerer Aminosäuren. Dadurch könnte die korrekte Proteinfaltung gestört und die gesamte Konformation verändert werden. So könnte z.B. auch die Zugänglichkeit der Zinkfinger motive für die Bindung der viralen RNA oder weiterer, an der Degradation beteiligter Faktoren beeinträchtigt sein. Ebenfalls könnte die subzelluläre Proteinlokalisierung beeinflusst und wegen der resultierenden räumlichen Umverteilung die entsprechende hZAP-Variante von der Virushemmung abgehalten werden. Ob durch die Mutationen tatsächlich die subzelluläre Lokalisation der hZAP-Varianten verändert war, wurde in der vorliegenden Studie anhand der Verteilung von hZAP-L, der Triadenmutante AAA und hZAP-S in verschiedenen Zellkompartimenten durch differenzielle Fraktionierung (Ramsby & Makowski, 2011) untersucht. Alle drei hZAP-Varianten wurden in Zytosol und Kern sowie Membran-assoziiert detektiert. Am meisten Protein befand sich jeweils im Zytosol, am wenigsten im Kern. Eine vorwiegend zytoplasmatische statt nukleäre Lokalisation des ZAP, das sowohl Kern-Ex- als auch Kern-Importsequenzen kodiert, wurde bereits von Liu *et al.* (2004) anhand des rZAP-S festgestellt. Die Lokalisation an zellulären Membranen wurde jedoch erst kürzlich von Charron *et al.* (2013) anhand des mZAP entdeckt. Während mZAP-S zu gleichen Teilen in Kern, Zytosol und an Membranen lokalisiert ist, ist mZAP-L aufgrund des S-Farnesylierungsmotivs CaaX an dessen C-Terminus im Zytosol abgereichert und stattdessen membranständig (Charron *et al.*, 2013; Zhang & Casey, 1996). Die Integrität des Motivs und die daraus resultierende Lokalisation ist wichtig für die optimale und gegenüber mZAP-S erhöhte antivirale Aktivität des mZAP-L (Charron *et al.*, 2013). Auch hZAP-L besitzt ein C-terminales CaaX S-Farnesylierungsmotiv. Allerdings wurden alle hZAP-Varianten dieser Arbeit als Fusionsprotein mit einem C-terminalen HA-Tag generiert, so dass eine potenzielle S-Farnesylierung, bei der das Cystein an der -4 Position des C-Terminus modifiziert und dabei die letzten drei Aminosäuren abgespalten werden (Winter-Vann & Casey, 2005), wahrscheinlich verhindert wurde. Möglicherweise wurde so aufgrund des HA-Tags die subzelluläre Verteilung des hZAP-L zugunsten des zytosolischen Proteinanteils verändert. Dennoch war hZAP-L hier im Gegensatz zu mZAP-L auch unabhängig von einer möglichen S-Farnesylierung deutlich antiviral aktiver als die kurze Isoform. Ohnehin werden nicht alle

Proteine, die ein CaaX-Motiv besitzen, auch tatsächlich modifiziert (Winter-Vann & Casey, 2005). Generell sind Unterschiede bezüglich der Modifikation, Lokalisation und Aktivität zwischen mZAP und hZAP denkbar, da mZAP-L zudem das Triadenmotiv HYV in seiner PARP-ähnlichen Domäne aufweist und deshalb immerhin Mono-ADP-Ribosyltransferase-Aktivität besitzen sollte (Hottiger *et al.*, 2010; Kleine *et al.*, 2008).

Da hZAP-L wegen seines Triadenmotivs YYV stattdessen als katalytisch inaktiv klassifiziert wird und auch *in vitro* keine Autoribosylierungsaktivität besitzt (Kleine *et al.*, 2008), wurde in der vorliegenden Studie untersucht, ob dessen PARP-ähnliche Domäne überhaupt Affinität zu ADP-Ribose besitzt. Dazu wurde die PARP-ähnliche Domäne bakteriell exprimiert und aufgereinigt und dessen Bindung zu ADP-Ribose durch ITC charakterisiert (Leavitt & Freire, 2001). Dabei konnte keine Affinität festgestellt werden. Das Resultat entspräche so zwar der Erwartung, allerdings war die verfügbare Proteinmenge für die Messung wegen des großen Proteinverlustes während der Probenvorbereitung nur sehr gering. Eine Wiederholung der Messung mit einer höheren Proteinkonzentration wäre zur Verifikation des Resultats hilfreich. Dennoch detektierten Leung *et al.* (2011a) starke ADP-Ribosylierung bei hZAP-L und hZAP-S. Da hZAP-S keine PARP-ähnliche Domäne besitzt, kann diese zumindest nicht die einzige Akzeptorregion im Protein darstellen. Beispielsweise wurde auch die WWE-Domäne als ADP-Ribose-Bindemodul identifiziert (Aravind, 2001; He *et al.*, 2012). Die WWE-Domäne des ZAP wurde aber bislang nicht näher untersucht.

Die ADP-Ribose wird hZAP vermutlich von anderen Mitgliedern der PARP-Familie angefügt (Leung *et al.*, 2011a). Dieses Phänomen der Transribosylierung ist unter PARPs bereits bekannt (Gibson & Kraus, 2012; Loseva *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2011; Sbodio *et al.*, 2002; Schreiber *et al.*, 2002). Da hZAP mit PARP12 und PARP15, beides Mono-ADP-Ribosyltransferasen (Aguiar *et al.*, 2005; Leung *et al.*, 2011a), interagiert, könnten diese auch die Transribosylierung des hZAP vermitteln (Leung *et al.*, 2011a). Diese Theorie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit in enzymatischen ADP-Ribosylierungsuntersuchungen überprüft. Es konnte jedoch weder Transribosylierung zwischen PARP12 und hZAP-L noch PARP15 und hZAP-L oder einer Kombination beider PARPs mit hZAP-L detektiert werden. Da im Gegensatz zu PARP12 für PARP15 allerdings auch nicht die erwartete Autoribosylierung nachgewiesen werden konnte (Aguiar *et al.*, 2005), ist fraglich, ob das Protein überhaupt enzymatisch aktiv war. Möglicherweise sind an einer erfolgreichen Ribosylierung des hZAP aber noch weitere Faktoren oder Proteine, vielleicht auch als ein funktioneller Komplex,

beteiligt. So zeigt z.B. PARP12 aber nicht hZAP zusätzlich eine Interaktion mit PARP5a (Leung *et al.*, 2011a).

PARP12 besitzt große strukturelle Ähnlichkeit zu hZAP-L (Welsby *et al.*, 2012) und gehört ebenfalls, wie auch PARP7, zu der Unterfamilie der CCCH-Zinkfingermotiv-enthaltenden PARPs (Schreiber *et al.*, 2006). Wie bei hZAP existieren auch von PARP12 zwei Spleißvarianten, eine lange mit und eine kurze ohne C-terminale PARP-ähnliche Domäne (Atasheva *et al.*, 2012). Kürzlich wurde PARP12-L als antiviral aktives Protein gegen u.a. VEEV, SINV und CHIKV identifiziert, während PARP12-S keine Aktivität zeigte (Atasheva *et al.*, 2012). Zudem konnte PARP7 sowie PARP10 inhibitorische Aktivität gegen VEEV nachgewiesen werden (Atasheva *et al.*, 2012; Atasheva *et al.*, 2014). Die antivirale Wirkweise dieser PARPs verläuft vermutlich über die Translationsinhibition viraler Transkripte, unterscheidet sich dabei aber mechanistisch von der hZAP-L-vermittelten Translationshemmung viraler mRNAs (Atasheva *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2012). Auch die strukturell und phylogenetisch weiter distanzierte PARP1, die zu der DNA-abhängigen PARP-Unterfamilie gehört (Otto *et al.*, 2005; Schreiber *et al.*, 2006), besitzt antivirale Aktivität. Die Inhibition des Humanen Herpesvirus 4 (Tempera *et al.*, 2010) und des Humanen Herpesvirus 8 (Ohsaki *et al.*, 2004) ist hierbei jedoch direkt von der katalytischen ADP-Ribose-Polymerase-Aktivität der PARP1 abhängig.

Die genaue Funktion der katalytisch inaktiven PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L bleibt zwar weiterhin unbekannt, in der vorliegenden Arbeit konnte aber eindeutig gezeigt werden, dass deren alternatives Triadenmotiv für die antialphavirale Aktivität des hZAP-L von entscheidender Bedeutung ist. Die PARP-ähnliche Domäne verleiht hZAP-L offensichtlich einen funktionellen und/oder strukturellen Vorteil bei der Virushemmung. Möglicherweise fungiert sie als Plattform, die die Interaktion mit anderen antiviralen Faktoren ermöglicht, oder begünstigt die Gesamtkonformation des Proteins, vielleicht auch in Verbindung mit ADP-Ribosylierung, so dass auch die N-terminalen Zinkfinger motive und damit die Bindung und Degradation der viralen RNA positiv beeinflusst werden könnten.

#### **4.5 Alphavirale Makrodomänen als hZAP-L-Antagonisten**

Neben Eu- und Prokaryoten sind Makrodomänen auch bei einigen Plusstrang-RNA-Virusfamilien verbreitet, wie z.B. den *Togaviridae* und *Coronaviridae* (Gorbalenya *et al.*, 1991; Karras *et al.*, 2005; Koonin *et al.*, 1992). Manche der viralen Makrodomänen zeigen Appr-1''-

pase-Aktivität und/oder ADP-Ribose-Bindung (Egloff *et al.*, 2006; Karras *et al.*, 2005; Malet *et al.*, 2009; Neuvonen & Ahola, 2009; Putics *et al.*, 2005; Saikatendu *et al.*, 2005). Verschiedene Studien weisen darauf hin, dass bei Alphaviren das nsP3 mit der darin lokalisierten Makrodomäne einen wichtigen Pathogenitätsfaktor in infizierten Zellen darstellt (Park & Griffin, 2009b; Suthar *et al.*, 2005; Tuittila & Hinkkanen, 2003; Tuittila *et al.*, 2000). Die Makrodomäne könnte zelluläre Signalwege beeinflussen, um die virale Replikation und Verbreitung zu fördern oder um die antivirale Immunantwort des Wirts zu stören oder dieser zu entkommen (Eriksson *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009). Aufgrund der jeweiligen Assoziation zu ADP-Ribose ist eine funktionelle Verbindung zwischen der alphaviralen Makrodomäne und der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L naheliegend. Über den Effekt und Mechanismus dieser potenziellen Interaktion kann derzeit aber nur spekuliert werden. Möglicherweise stellt sie eine von Virusseite entwickelte Strategie dar, um die Aktivität des ZAP-L zu antagonisieren (Egloff *et al.*, 2006; Kerns *et al.*, 2008; Neuvonen & Ahola, 2009; Tan *et al.*, 2009; Zhu & Gao, 2008). Die inhibitorische Aktivität zellulärer Makrodomänen gegen PARPs wurde bereits von Ouararhni *et al.* (2006) demonstriert. Da die PARP-ähnliche Domäne des ZAP-L zudem Merkmale der positiven Selektion aufweist, könnte sie sich dahingehend entwickelt haben, der Bindung durch virale Antagonisten zu entgehen (Cagliani *et al.*, 2012; Kerns *et al.*, 2008). Die virale Makrodomäne wiederum könnte ZAP-L sequestrieren und an der Ausübung der inhibitorischen Funktion hindern (Neuvonen & Ahola, 2009). Auch die Aktivität der eigentlich kernständigen PARP1 kann durch deren Misslokalisierung reguliert werden, wenn sie von dem virionassoziierten Protein R des HIV im Zytoplasma sequestriert und dadurch von der möglichen Aktivierung antiviraler Signalwege abgehalten wird (Hakmé *et al.*, 2008; Muthumani *et al.*, 2006). Da Makrodomänen an verschiedene Reste des ADP-Ribose-Moleküls binden können (Protein-Anheftungsstelle der distalen Ribose oder Adenin-Anteil) (Barkauskaite *et al.*, 2013), wäre die gleichzeitige Bindung eines bereits mit ZAP-L assoziierten ADP-Ribose-Moleküls durchaus möglich. Denkbar wäre auch, dass die Aktivität des ZAP-L durch ADP-Ribosylierung reguliert wird und ZAP-L nur mit an der PARP-ähnlichen Domäne gebundener ADP-Ribose inhibitorisch aktiv ist. Um dem entgegenzuwirken könnte die virale Makrodomäne die ADP-Ribose von der PARP-ähnlichen Domäne hydrolysieren und ZAP-L somit inaktivieren. Die effektive Mono-ADP-Ribosyl-Hydrolase-Aktivität von Makrodomänen wurde erst kürzlich in

mehreren unabhängigen Studien entdeckt (Jankevicius *et al.*, 2013; Rosenthal *et al.*, 2013; Sharifi *et al.*, 2013; Steffen & Pascal, 2013).

In den hier durchgeführten Infektionsexperimenten wurde CHIKV deutlich schwächer von hZAP-L gehemmt als SINV. Das könnte bedeuten, dass die Makrodomäne des CHIKV die hZAP-L-vermittelte Restriktion effektiver antagonisiert als SINV. Diese Theorie wurde anhand zweier Chimären untersucht. Die Chimäre SINV + CHIKV Makro, bei der die potenziell effektivere Makrodomäne des CHIKV in das Genom des SINV integriert wurde, wurde von hZAP-L tatsächlich etwas weniger gehemmt als SINV wt. Da die Aminosäure D10 der CHIKV Makrodomäne wichtig für deren ADP-Ribose-Bindungs-fähigkeit ist (Malet *et al.*, 2009), wurde bei der zweiten Chimäre die D10A-mutierte CHIKV Makrodomäne integriert. Durch den D10A-Austausch war die hZAP-L-vermittelte Hemmung der Chimäre wieder erhöht und vergleichbar mit der Hemmung des SINV wt. Auf hZAP-S-exprimierenden Zellen konnte zwischen allen drei Virusvarianten kein Unterschied detektiert werden. Dies zeigt, dass die Makrodomäne einen gewissen Einfluss auf die alphavirale Sensitivität gegenüber hZAP-L ausübt und dass einzelne konservierte Aminosäuren diese Sensitivität offensichtlich modifizieren können.

Dieser Beitrag auf die Hemmbarkeit durch hZAP-L wurde für die konservierten und funktionell bekannten Aminosäuren N/D10 (ADP-Ribose-Bindung bei SINV bzw. CHIKV), N24 (Appr-1''-pase-Aktivität) sowie Y114 (Bindung und enzymatische Aktivität) (Egloff *et al.*, 2006; Malet *et al.*, 2009) der Makrodomäne des SINV und CHIKV in Mutationsstudien genauer untersucht. Die Aminosäuren wurden einzeln und gemeinsam durch Alanin substituiert und zusätzlich wurde bei SINV die Mutante N10D bzw. bei CHIKV D10N generiert. Offensichtlich ist die Aminosäure N10 (SINV) bzw. D10 (CHIKV) der alphaviralen Makrodomäne von wichtiger Bedeutung, da deren Alanin-Mutation einen jeweils drastischen Effekt bezüglich der hZAP-L-vermittelten Inhibition bzw. der Virusviabilität erzeugte. Während die SINV N10A-Mutante deutlich stärker durch hZAP-L gehemmt wurde als SINV wt, war die CHIKV D10A-Mutante gar nicht erst lebensfähig. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Varianten CHIKV D10N und SINV N10D keine Auffälligkeiten. Allerdings wurde die Aminosäure an Position 10 hier auch jeweils durch diejenige substituiert, die bei dem anderen Virus natürlicherweise an dieser Position lokalisiert ist. Außerdem konnten Park und Griffin (2009b) die Aminosäure D10 sogar in einer Revertante des SINV nach zuvoriger N10A-Mutation identifizieren. In derselben Studie wird neben der Mutante N10A auch die Mutante N24A

des SINV untersucht. Der negative Effekt auf die Virusreplikation und die nsP3-Stabilität ist ebenfalls bei der N10A-Mutante weitaus stärker als bei der N24A-Mutante und hebt die besondere Bedeutung der Aminosäure N10 hervor. Auch von einigen Coronaviren (CoV) wurden im Rahmen verschiedener Mutationsstudien zu den alphaviralen N24A-Mutanten analoge Mutanten generiert. Dabei zeigt die Mutante des Murinen Hepatitis-Virus (N1348A) einen apathogenen Phänotyp bei unverändertem Replikationslevel *in vivo* (Eriksson *et al.*, 2008), während die Virulenz der Mutanten des Humanen CoV 229E (N1305A) und des SARS-CoV (N1040A) durch deren gesteigerte IFN-Sensitivität eingeschränkt wird (Kuri *et al.*, 2011; Putics *et al.*, 2005).

Bei der CHIKV D10A-Mutante war keine Komplementation durch die Expression des nsP3 *in trans* möglich. Allerdings sind nicht alle viralen Proteine transkomplementierbar und der Erfolg einer Transkomplementation somit nicht pauschalisierbar (Sanz & Carrasco, 2001; Yi *et al.*, 2009). Um trotzdem einen möglichen Einfluss der D10A-Mutation auf das Interaktionsverhalten mit hZAP-L zu untersuchen, wurden CoIPs des hZAP-L zusammen mit dem nsP3 und dem D10A-mutierten nsP3 des CHIKV durchgeführt. Die Voraussetzung für eine Interaktion zwischen hZAP-L und viralen Komponenten *in vivo* ist deren gleiche zelluläre Lokalisation. Die alphavirale mRNA und auch das nsP3 befinden sich während der Replikation an den zytoplasmatischen Öffnungen kleiner Membraneinstülpungen verschiedener zellulärer Membranen (Frolova *et al.*, 2010; Froshauer *et al.*, 1988; Spuul *et al.*, 2010; Sreejith *et al.*, 2012). Bei der subzellulären Fraktionierung im Rahmen der vorliegenden Studie wurde auch hZAP-L im Zytoplasma sowie mit zellulären Membranen assoziiert detektiert. Im Einklang damit konnte zudem eine direkte Interaktion zwischen dem CHIKV nsP3 und hZAP-L nachgewiesen werden, die, im Gegensatz zu SINV nsP3 und PARP1 (Park & Griffin, 2009a), jedoch nur unter Beteiligung der Makrodomäne stattfand. Die CHIKV Makrodomäne alleine ist allerdings nicht für die Vermittlung dieser Interaktion ausreichend. Demnach ist das komplette CHIKV nsP3 für die Bindung relevant und interagiert nur als solches mit hZAP-L. Möglicherweise ist für die Interaktion eine bestimmte Proteinfaltung notwendig, die nur von dem vollständigen nsP3 gewährleistet wird. Die Interaktion des D10A-mutierten nsP3 mit hZAP-L war deutlich schwächer gegenüber der des wt nsP3 mit hZAP-L. Somit scheint die Aminosäure D10 der Makrodomäne aus strukturellen Gründen oder aufgrund ihrer Fähigkeit zur ADP-Ribose-Bindung für die Interaktion mit hZAP-L bedeutsam zu sein. Auch Park und Griffin (2009b) betonten bereits, dass die Interaktionen



des alphaviralen nsP3 mit Wirtsfaktoren von der Aminosäuresequenz der Makrodomäne beeinflusst werden.

Die Theorien über potenzielle antagonistische Strategien der Makrodomäne gegen hZAP-L beruhen ebenfalls darauf, dass die alphavirale Makrodomäne ADP-Ribose bindet. Viren, die nur schwach von hZAP-L gehemmt werden, diesem also gut entgegenwirken können, könnten demnach eine starke Affinität zu ADP-Ribose aufweisen. Daraus ergibt sich die Frage, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der ADP-Ribose-Affinität der Makrodomäne und dem Inhibitionslevel des Virus durch hZAP-L besteht. Für die Makrodomänen einiger Alphaviren wurde bereits deren ADP-Ribose-Affinität in Form der Dissoziationskonstante  $K_d$  durch ITC bestimmt. CHIKV und VEEV zeigen beide relativ große Affinität, wobei die des VEEV noch etwas stärker ist (Malet *et al.*, 2009; Rungrotmongkol *et al.*, 2010). Analog dazu wurde VEEV in der vorliegenden Studie gar nicht und CHIKV nur schwach von hZAP-L gehemmt. SFV konnte keine ADP-Ribose-Affinität nachgewiesen werden (Neuvonen & Ahola, 2009) und wurde hier recht stark von hZAP-L inhibiert. Um die Theorie zu validieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Bindungsaffinität weiterer alphaviraler Makrodomänen zu ADP-Ribose bestimmt. Neben den Makrodomänen des SINV und ONNV wurde die des CHIKV als Referenz für die Messungen mit eingeschlossen. Nach Expression und Aufreinigung der Makrodomänen wurde deren Bindungsverhalten zu ADP-Ribose mittels ITC thermodynamisch charakterisiert (Leavitt & Freire, 2001). Deutliche ADP-Ribose-Affinität demonstrierte CHIKV, in geringerem Maße auch ONNV, während für SINV keine Affinität messbar war. Die erzielten Resultate entsprechen grundsätzlich den Erwartungen, die sich von dem jeweiligen Hemmungslevel der einzelnen Viren in den Infektionsexperimenten ableiten. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass v.a. bei SINV nur eine sehr geringe Proteinkonzentration aufgrund des hohen Proteinverlustes bei der Probenvorbereitung gemessen werden konnte. Eine Wiederholung der Messung mit höherer Molarität zur Verifikation des erzielten Ergebnisses wäre durchaus sinnvoll. So auch für ONNV, obwohl die Messung zwar insgesamt erfolgreich, aber die Abweichungen der Messdaten und damit der Fehler des  $K_d$ -Wertes relativ groß waren. Aber auch in Anbetracht des Fehlers war die ADP-Ribose-Affinität der ONNV Makrodomäne schwächer als die der CHIKV Makrodomäne. Dies ist im Einklang mit der etwas stärkeren hZAP-L-vermittelten Inhibition des ONNV im Vergleich zu CHIKV. Die hier für CHIKV durchgeführte Messung zeigte zwar eindeutig Affinität zu ADP-Ribose, allerdings ist sie mit  $25,3 \pm 2,0 \mu\text{M}$  insgesamt deutlich geringer als

der Literaturwert mit  $5 \pm 0,4 \mu\text{M}$  (Malet *et al.*, 2009). Die genaue Ursache dafür ist unbekannt, könnte aber eventuell an der Zubereitung und Beschaffenheit der Proben, der Charge des Liganden und/oder generell der Durchführung des Experiments liegen.

Offensichtlich werden die Spezifität der antiviralen Aktivität des hZAP und die alphavirale Sensitivität gegenüber hZAP durch verschiedene Faktoren bestimmt. Die Zinkfinger motive des hZAP binden virale RNAs an deren ZREs, wodurch die RNA-Degradation eingeleitet wird. Somit wird die Spezifität des hZAP durch die Sequenz und/oder Struktur der viralen ZREs bzw. deren Vorhandensein in einer viralen RNA festgelegt. Hier wurde gezeigt, dass ein sensitives ZRE die generelle Angreifbarkeit eines Virus für den hZAP-vermittelten Abbau erhöhen kann. Anhand des direkten Vergleichs mit hZAP-S wurde deutlich, dass die PARP-ähnliche Domäne die antivirale Aktivität des hZAP-L gegen Alphaviren erheblich verstärkt. Das alternative Triadenmotiv der PARP-ähnlichen Domäne hat dabei trotz der autokatalytischen Inaktivität eine essenzielle Funktion für die Virusinhibition. Gleichzeitig versucht die alphavirale Makrodomäne hZAP-L anscheinend über die PARP-ähnliche Domäne zu antagonisieren. Für die Effektivität ausschlaggebend scheinen dabei vor allem die ADP-Ribose-Bindungsfähigkeit und die dafür verantwortlichen Aminosäuren der Makrodomäne zu sein. Vieles deutet darauf hin, dass eine hohe ADP-Ribose-Affinität der Makrodomäne mit einer geringen Hemmung durch hZAP-L einhergeht. Demnach determiniert die Stärke dieser Bindung das antagonistische Vermögen des Virus und somit dessen Sensitivität gegenüber hZAP-L.

## 5. Zusammenfassung

Das Zinkfinger antivirale Protein (ZAP) wurde als antiviraler Wirtsfaktor identifiziert, der die Replikation und Verbreitung verschiedener Viren inhibiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die antivirale Aktivität der beiden Isoformen des humanen ZAP-Orthologs, hZAP-L und hZAP-S, gegen Alphaviren untersucht. Beide Isoformen unterscheiden sich lediglich anhand der zusätzlichen C-terminalen Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP)-ähnlichen Domäne des hZAP-L, die aber offenbar katalytisch inaktiv ist.

Für beide Isoformen wurden induzierbare Expressionszelllinien generiert und die Hemmung verschiedener humanpathogener Alphaviren durch hZAP-L und hZAP-S in Infektionskinetiken analysiert. Während das Ausmaß der Inhibition generell zwischen den einzelnen Viren variierte, war die Hemmung durch hZAP-L dabei jeweils stärker als durch hZAP-S. Mithilfe eines spezifischen, siRNA-vermittelten hZAP-L-*knockdown* konnte auch die effektive antivirale Aktivität des endogenen hZAP-L nachgewiesen werden.

Die Relevanz des charakteristischen Triadenmotivs der PARP-ähnlichen Domäne für die antivirale Aktivität des hZAP-L konnte anhand von Mutationsstudien eindeutig demonstriert werden. Interessanterweise wurde die antivirale Aktivität des hZAP-L nach Einbringen des Triadenmotivs katalytisch aktiver PARPs nicht verstärkt, sondern nahezu aufgehoben und dadurch sogar weniger wirksam als die des hZAP-S. Trotz der katalytischen Inaktivität ist die PARP-ähnliche Domäne demnach essenziell für die effektive antivirale Aktivität des hZAP-L. Eine zelluläre Umverteilung der inaktiven hZAP-L-Mutante konnte dabei nicht als Ursache für den Aktivitätsverlust identifiziert werden.

ZAP inhibiert das Viruswachstum, indem es die virale Translation hemmt, vor allem aber die Degradation der viralen RNA veranlasst, nachdem es an spezifische *ZAP responsive elements* (ZRE) der viralen RNA gebunden hat. Hier konnte gezeigt werden, dass die Insertion eines bekannten ZAP-sensitiven ZRE die Empfindlichkeit eines Virus gegen hZAP-L zwar geringfügig erhöht, die virale Sensitivität aber offenbar stärker durch andere Faktoren bestimmt wird. In der Literatur wird die Makrodomäne des alphaviralen nsP3 als möglicher ZAP-Antagonist diskutiert. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit anhand verschiedener Makrodomänen-Chimären und -Mutanten auf Basis der verfügbaren reversen Genetiksysteme des Chikungunya-Virus (CHIKV) und Sindbis-Virus (SINV) analysiert. Dabei fiel vor allem der Aminosäure eine besondere Bedeutung zu, die für die ADP-Ribose-Bindung der

Makrodomäne verantwortlich ist (SINV N10, CHIKV D10). Zudem konnte eine direkte Interaktion zwischen hZAP-L und dem nsP3 des CHIKV nachgewiesen werden, die von der Anwesenheit der Makrodomäne abhängt und von der Integrität der Aminosäure D10 beeinflusst wird.

Um zu untersuchen, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Hemmbarkeit eines Alphavirus mit dessen Vermögen ADP-Ribose zu binden besteht, wurde die ADP-Ribose-Affinität der Makrodomänen des CHIKV, SINV und O'nyong-nyong-Virus durch isothermale Titrationskalorimetrie definiert. Tatsächlich stieg mit der gemessenen ADP-Ribose-Affinität die Unempfindlichkeit der Viren gegenüber der hZAP-L-vermittelten Inhibition.

Für die PARP-ähnliche Domäne des hZAP-L konnte dabei keine ADP-Ribose-Affinität detektiert werden. Die Theorie, dass hZAP-L von anderen Mitgliedern der PARP-Familie transkribosyliert wird, wurde hier mit PARP12 und PARP15 untersucht, konnte jedoch nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte in der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen hZAP, der PARP-ähnlichen Domäne des hZAP-L und der alphaviralen Makrodomäne bei der hZAP-vermittelten Alphavirus-Hemmung tiefgehend analysiert werden. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse über die Spezifität des hZAP und die alphavirale Sensitivität gegenüber hZAP liefern eine wertvolle Grundlage für zukünftige Studien zur weiterführenden Untersuchung der antiviralen Aktivität des hZAP.

## 6. Summary

The zinc finger antiviral protein (ZAP) was identified as an antiviral host factor which inhibits the replication and dissemination of various viruses. In the present study the antiviral activity against alphaviruses was explored for the two isoforms of the human ZAP ortholog, hZAP-L and hZAP-S. The only difference between both isoforms is the accessory poly(ADP-ribose) polymerase (PARP)-like domain in the C-terminus of hZAP-L which, however, has shown to be catalytically inactive.

For both, hZAP-L and hZAP-S, inducible expression cell lines were generated and the inhibitory action against different human-pathogenic alphaviruses was analyzed by growth kinetics. Despite the fact that the level of inhibition varied among different alphaviruses, hZAP-L-mediated inhibition was in general more potent compared to hZAP-S. Using siRNA-mediated knockdown specifically targeting hZAP-L, the antiviral activity of endogenous hZAP-L was also proven.

Mutational studies clearly demonstrated the importance of the characteristic triad motif within the PARP-like domain for the antiviral activity of hZAP-L. Intriguingly, the introduction of the triad motif of catalytically active PARPs did not enhance, but virtually abolish the antiviral activity of hZAP-L thus rendering hZAP-L even less effective than hZAP-S. Hence, the PARP-like domain is essential for an effective antiviral activity of hZAP-L albeit its catalytic inactivity. A subcellular redistribution of the inactive hZAP-L mutant could not be found to account for the observed loss of activity.

ZAP inhibits virus growth by repressing viral translation and especially by inducing the degradation of viral RNA after binding to specific ZAP responsive elements (ZRE). In the present study it could be shown that introduction of a known ZAP-sensitive ZRE only slightly enhanced viral susceptibility to ZAP-mediated inhibition suggesting that another factor might determine alphaviral sensitivity more strongly. Different studies consider the macro domain of the alphaviral nsP3 to be a possible ZAP antagonist. This hypothesis was tested employing various chimeras and macro domain mutants generated based on the reverse genetics systems available for Chikungunya virus (CHIKV) and Sindbis virus (SINV). Particularly, the amino acid mediating ADP-ribose binding of the macro domain was found to be important (SINV N10, CHIKV D10). Furthermore, a direct interaction between hZAP-L and

the CHIKV nsP3 was detected which depended on the presence of the macro domain and was influenced by the integrity of its amino acid D10.

In order to analyze a possible correlation for alphaviruses between their level of inhibition by hZAP-L and their capability to bind ADP-ribose, the ADP-ribose affinity of the macro domains of CHIKV, SINV and O'nyong-nyong virus was measured by isothermal titration calorimetry. Indeed, an increasing potency to bind ADP-ribose correlated with a decreasing susceptibility to hZAP-L-mediated inhibition.

In contrast no ADP-ribose affinity was measured for the PARP-like domain of hZAP-L. The possibility for hZAP-L to become ADP-ribosylated by other members of the PARP family was assessed using PARP12 and PARP15 in enzymatic assays, but could not be confirmed.

Altogether, the present study could enlighten the interplay between hZAP, the PARP-like domain of hZAP-L and the alphaviral macro domain in hZAP-mediated alphavirus inhibition in more detail. These new insights about the specificity of hZAP as well as the alphaviral sensitivity towards it provide a valuable basis for future studies investigating the antiviral activity of hZAP.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aguiar, R. C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K. & Shipp, M. A. (2005).** B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J Biol Chem* **280**, 33756-33765.
- Aguilar, P. V., Weaver, S. C. & Basler, C. F. (2007).** Capsid Protein of Eastern Equine Encephalitis Virus Inhibits Host Cell Gene Expression. *J Virol* **81**, 3866-3876.
- Ahola, T. & Kääriäinen, L. (1995).** Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 507-511.
- Akhrymuk, I., Kulemzin, S. V. & Frolova, E. I. (2012).** Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J Virol* **86**, 7180-7191.
- Alemán, L. M., Doench, J. & Sharp, P. A. (2007).** Comparison of siRNA-induced off-target RNA and protein effects. *RNA* **13**, 385-395.
- Aliperti, G. & Schlesinger, M. J. (1978).** Evidence for an autoprotease activity of sindbis virus capsid protein. *Virology* **90**, 366-369.
- Allen, M. D., Buckle, A. M., Cordell, S. C., Lowe, J. & Bycroft, M. (2003).** The crystal structure of AF1521 a protein from *Archaeoglobus fulgidus* with homology to the non-histone domain of macroH2A. *J Mol Biol* **330**, 503-511.
- Aravind, L. (2001).** The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation. *Trends Biochem Sci* **26**, 273-275.
- Aslanidis, C. & de Jong, P. J. (1990).** Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucleic Acids Res* **18**, 6069-6074.
- Atasheva, S., Akhrymuk, M., Frolova, E. I. & Frolov, I. (2012).** New PARP gene with an anti-alphavirus function. *J Virol* **86**, 8147-8160.
- Atasheva, S., Fish, A., Fornerod, M. & Frolova, E. I. (2010).** Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Forms a Tetrameric Complex with CRM1 and Importin  $\alpha/\beta$  That Obstructs Nuclear Pore Complex Function. *J Virol* **84**, 4158-4171.
- Atasheva, S., Frolova, E. I. & Frolov, I. (2014).** Interferon-Stimulated Poly(ADP-Ribose) Polymerases Are Potent Inhibitors of Cellular Translation and Virus Replication. *J Virol* **88**, 2116-2130.
- Atasheva, S., Garmashova, N., Frolov, I. & Frolova, E. (2008).** Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Inhibits Nuclear Import in Mammalian but Not in Mosquito Cells. *J Virol* **82**, 4028-4041.
- Auweter, S. D., Oberstrass, F. C. & Allain, F. H. (2006).** Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res* **34**, 4943-4959.
- Bachran, C., Sutherland, M., Bachran, D. & Fuchs, H. (2007).** Quantification of diphtheria toxin mediated ADP-ribosylation in a solid-phase assay. *Clin Chem* **53**, 1676-1683.
- Barkauskaite, E., Jankevicius, G., Ladurner, A. G., Ahel, I. & Timinszky, G. (2013).** The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals. *FEBS J* **280**, 3491-3507.
- Barreiro, L. B. & Quintana-Murci, L. (2010).** From evolutionary genetics to human immunology: how selection shapes host defence genes. *Nat Rev Genet* **11**, 17-30.
- Bick, M. J., Carroll, J. W., Gao, G., Goff, S. P., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. (2003).** Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol* **77**, 11555-11562.

- Billecocq, A., Spiegel, M., Vialat, P., Kohl, A., Weber, F., Bouloy, M. & Haller, O. (2004).** NSs protein of Rift Valley fever virus blocks interferon production by inhibiting host gene transcription. *J Virol* **78**, 9798-9806.
- Bredenbeek, P. J., Kooi, E. A., Lindenbach, B., Huijckman, N., Rice, C. M. & Spaan, W. J. (2003).** A stable full-length yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J Gen Virol* **84**, 1261-1268.
- Brown, R. S. (2005).** Zinc finger proteins: getting a grip on RNA. *Curr Opin Struct Biol* **15**, 94-98.
- Burgess-Brown, N. A., Sharma, S., Sobott, F., Loenarz, C., Oppermann, U. & Gileadi, O. (2008).** Codon optimization can improve expression of human genes in *Escherichia coli*: A multi-gene study. *Protein Expr Purif* **59**, 94-102.
- Cagliani, R., Guerini, F. R., Fumagalli, M., Riva, S., Agliardi, C., Galimberti, D., Pozzoli, U., Goris, A., Dubois, B., Fenoglio, C., Forni, D., Sanna, S., Zara, I., Pitzalis, M., Zoledziewska, M., Cucca, F., Marini, F., Comi, G. P., Scarpini, E., Bresolin, N., Clerici, M. & Sironi, M. (2012).** A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis. *Mol Biol Evol* **29**, 1599-1613.
- Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. (2009).** Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655.
- Chakrabarti, A., Jha, B. K. & Silverman, R. H. (2011).** New insights into the role of RNase L in innate immunity. *J Interferon Cytokine Res* **31**, 49-57.
- Charron, G., Li, M. M., MacDonald, M. R. & Hang, H. C. (2013).** Prenylome profiling reveals S-farnesylation is crucial for membrane targeting and antiviral activity of ZAP long-isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 11085-11090.
- Chen, G., Guo, X., Lv, F., Xu, Y. & Gao, G. (2008).** p72 DEAD box RNA helicase is required for optimal function of the zinc-finger antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 4352-4357.
- Chen, S., Xu, Y., Zhang, K., Wang, X., Sun, J., Gao, G. & Liu, Y. (2012).** Structure of N-terminal domain of ZAP indicates how a zinc-finger protein recognizes complex RNA. *Nat Struct Mol Biol* **19**, 430-435.
- Couttet, P., Fromont-Racine, M., Steel, D., Pictet, R. & Grange, T. (1997).** Messenger RNA deadenylylation precedes decapping in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5628-5633.
- Darnell, J., Kerr, I. & Stark, G. (1994).** Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415-1421.
- DeFilippis, V. R., Robinson, B., Keck, T. M., Hansen, S. G., Nelson, J. A. & Fruh, K. J. (2006).** Interferon regulatory factor 3 is necessary for induction of antiviral genes during human cytomegalovirus infection. *J Virol* **80**, 1032-1037.
- Domenighini, M. & Rappuoli, R. (1996).** Three conserved consensus sequences identify the NAD-binding site of ADP-ribosylating enzymes, expressed by eukaryotes, bacteria and T-even bacteriophages. *Mol Microbiol* **21**, 667-674.
- Egloff, M. P., Malet, H., Putics, A., Heinonen, M., Dutartre, H., Frangeul, A., Gruez, A., Campanacci, V., Cambillau, C., Ziebuhr, J., Ahola, T. & Canard, B. (2006).** Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol* **80**, 8493-8502.
- Eriksson, K. K., Cervantes-Barragan, L., Ludewig, B. & Thiel, V. (2008).** Mouse hepatitis virus liver pathology is dependent on ADP-ribose-1''-phosphatase, a viral function conserved in the alpha-like supergroup. *J Virol* **82**, 12325-12334.



- Espert, L., Degols, G., Gongora, C., Blondel, D., Williams, B. R., Silverman, R. H. & Mechti, N. (2003).** ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses. *J Biol Chem* **278**, 16151-16158.
- Frolova, E. I., Gorchakov, R., Pereboeva, L., Atasheva, S. & Frolov, I. (2010).** Functional Sindbis virus replicative complexes are formed at the plasma membrane. *J Virol* **84**, 11679-11695.
- Froshauer, S., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (1988).** Alphavirus RNA replicase is located on the cytoplasmic surface of endosomes and lysosomes. *J Cell Biol* **107**, 2075-2086.
- Gaedigk-Nitschko, K. & Schlesinger, M. J. (1990).** The Sindbis virus 6K protein can be detected in virions and is acylated with fatty acids. *Virology* **175**, 274-281.
- Gao, G., Guo, X. & Goff, S. P. (2002).** Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science* **297**, 1703-1706.
- García, M. A., Meurs, E. F. & Esteban, M. (2007).** The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811.
- Garmashova, N., Atasheva, S., Kang, W., Weaver, S. C., Frolova, E. & Frolov, I. (2007a).** Analysis of Venezuelan Equine Encephalitis Virus Capsid Protein Function in the Inhibition of Cellular Transcription. *J Virol* **81**, 13552-13565.
- Garmashova, N., Gorchakov, R., Frolova, E. & Frolov, I. (2006).** Sindbis Virus Nonstructural Protein nsP2 Is Cytotoxic and Inhibits Cellular Transcription. *J Virol* **80**, 5686-5696.
- Garmashova, N., Gorchakov, R., Volkova, E., Paessler, S., Frolova, E. & Frolov, I. (2007b).** The Old World and New World Alphaviruses Use Different Virus-Specific Proteins for Induction of Transcriptional Shutoff. *J Virol* **81**, 2472-2484.
- Garneau, N. L., Sokoloski, K. J., Opyrchal, M., Neff, C. P., Wilusz, C. J. & Wilusz, J. (2008).** The 3' untranslated region of sindbis virus represses deadenylation of viral transcripts in mosquito and Mammalian cells. *J Virol* **82**, 880-892.
- Garoff, H., Sjöberg, M. & Cheng, R. H. (2004).** Budding of alphaviruses. *Virus Res* **106**, 103-116.
- Gibson, B. A. & Kraus, W. L. (2012).** New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 411-424.
- Gläsker, S., Töller, M. & Kümmerer, B. M. (2014).** The alternate triad motif of the poly(ADP-ribose) polymerase-like domain of the human zinc finger antiviral protein is essential for its antiviral activity. *J Gen Virol* **95**, 816-822.
- Gómez de Cedrón, M., Ehsani, N., Mikkola, M. L., Garcia, J. A. & Kääriäinen, L. (1999).** RNA helicase activity of Semliki Forest virus replicase protein NSP2. *FEBS Lett* **448**, 19-22.
- Gonzalez, M. E. & Carrasco, L. (2003).** Viroporins. *FEBS Lett* **552**, 28-34.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V. & Lai, M. M. (1991).** Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett* **288**, 201-205.
- Gorchakov, R., Frolova, E. & Frolov, I. (2005).** Inhibition of Transcription and Translation in Sindbis Virus-Infected Cells. *J Virol* **79**, 9397-9409.
- Gould, E. A., Coutard, B., Malet, H., Morin, B., Jamal, S., Weaver, S., Gorbalenya, A., Moureau, G., Baronti, C., Delogu, I., Forrester, N., Khasnatinov, M., Gritsun, T., de Lamballerie, X. & Canard, B. (2010).** Understanding the alphaviruses: recent research on important emerging pathogens and progress towards their control. *Antiviral Res* **87**, 111-124.

- Guhaniyogi, J. & Brewer, G. (2001).** Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23.
- Guo, X., Carroll, J. W., Macdonald, M. R., Goff, S. P. & Gao, G. (2004).** The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J Virol* **78**, 12781-12787.
- Guo, X., Ma, J., Sun, J. & Gao, G. (2007).** The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 151-156.
- Hakmé, A., Wong, H. K., Dantzer, F. & Schreiber, V. (2008).** The expanding field of poly(ADP-ribose)ylation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep* **9**, 1094-1100.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2006).** The interferon response circuit: induction and suppression by pathogenic viruses. *Virology* **344**, 119-130.
- Haller, O., Kochs, G. & Weber, F. (2007).** Interferon, Mx, and viral countermeasures. *Cytokine Growth Factor Rev* **18**, 425-433.
- Hardy, W. R. & Strauss, J. H. (1989).** Processing the nonstructural polyproteins of sindbis virus: nonstructural proteinase is in the C-terminal half of nsP2 and functions both in cis and in trans. *J Virol* **63**, 4653-4664.
- Hayakawa, S., Shiratori, S., Yamato, H., Kameyama, T., Kitatsuji, C., Kashigi, F., Goto, S., Kameoka, S., Fujikura, D., Yamada, T., Mizutani, T., Kazumata, M., Sato, M., Tanaka, J., Asaka, M., Ohba, Y., Miyazaki, T., Imamura, M. & Takaoka, A. (2011).** ZAPS is a potent stimulator of signaling mediated by the RNA helicase RIG-I during antiviral responses. *Nat Immunol* **12**, 37-44.
- He, F., Tsuda, K., Takahashi, M., Kuwasako, K., Terada, T., Shirouzu, M., Watanabe, S., Kigawa, T., Kobayashi, N., Guntert, P., Yokoyama, S. & Muto, Y. (2012).** Structural insight into the interaction of ADP-ribose with the PARP WWE domains. *FEBS Lett* **586**, 3858-3864.
- Hottiger, M. O., Hassa, P. O., Lüscher, B., Schüler, H. & Koch-Nolte, F. (2010).** Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases. *Trends Biochem Sci* **35**, 208-219.
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I. & Le Mercier, P. (2011).** ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res* **39**, D576-582.
- Ivanova, L., Le, L. & Schlesinger, M. J. (1995).** Characterization of revertants of a Sindbis virus 6K gene mutant that affects proteolytic processing and virus assembly. *Virus Res* **39**, 165-179.
- Janeway, C. A., Jr. (1989).** Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54 Pt 1**, 1-13.
- Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G. & Ladurner, A. G. (2013).** A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 508-514.
- Jeong, M. S., Kim, E. J. & Jang, S. B. (2010).** Expression and RNA-binding of human zinc-finger antiviral protein. *Biochem Biophys Res Commun* **396**, 696-702.
- Jose, J., Snyder, J. E. & Kuhn, R. J. (2009).** A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. *Future Microbiol* **4**, 837-856.
- Kamer, G. & Argos, P. (1984).** Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* **12**, 7269-7282.

- Karki, S., Li, M. M., Schoggins, J. W., Tian, S., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. (2012). Multiple interferon stimulated genes synergize with the zinc finger antiviral protein to mediate anti-alphavirus activity. *PLoS One* **7**, e37398.
- Karlberg, T., Langelier, M. F., Pascal, J. M. & Schuler, H. (2013). Structural biology of the writers, readers, and erasers in mono- and poly(ADP-ribose) mediated signaling. *Mol Aspects Med* **34**, 1088-1108.
- Karras, G. I., Kustatscher, G., Buhecha, H. R., Allen, M. D., Pugieux, C., Sait, F., Bycroft, M. & Ladurner, A. G. (2005). The macro domain is an ADP-ribose binding module. *Embo J* **24**, 1911-1920.
- Kerns, J. A., Emerman, M. & Malik, H. S. (2008). Positive selection and increased antiviral activity associated with the PARP-containing isoform of human zinc-finger antiviral protein. *PLoS Genet* **4**, e21.
- Kielian, M., Chanel-Vos, C. & Liao, M. (2010). Alphavirus Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2**, 796-825.
- King, A. M. Q., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J. (2012). Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Elsevier Academic Press*.
- Kleine, H., Poreba, E., Lesniewicz, K., Hassa, P. O., Hottiger, M. O., Litchfield, D. W., Shilton, B. H. & Lüscher, B. (2008). Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol Cell* **32**, 57-69.
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R. & Bradley, D. W. (1992). Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8259-8263.
- Kümmerer, B. M., Grywna, K., Gläsker, S., Wieseler, J. & Drosten, C. (2012). Construction of an infectious Chikungunya virus cDNA clone and stable insertion of mCherry reporter genes at two different sites. *J Gen Virol* **93**, 1991-1995.
- Kumaran, D., Eswaramoorthy, S., Studier, F. W. & Swaminathan, S. (2005). Structure and mechanism of ADP-ribose-1''-monophosphatase (Appr-1''-pase), a ubiquitous cellular processing enzyme. *Protein Sci* **14**, 719-726.
- Kuri, T., Eriksson, K. K., Putics, A., Züst, R., Snijder, E. J., Davidson, A. D., Siddell, S. G., Thiel, V., Ziebuhr, J. & Weber, F. (2011). The ADP-ribose-1''-monophosphatase domains of severe acute respiratory syndrome coronavirus and human coronavirus 229E mediate resistance to antiviral interferon responses. *J Gen Virol* **92**, 1899-1905.
- Kustatscher, G., Hothorn, M., Pugieux, C., Scheffzek, K. & Ladurner, A. G. (2005). Splicing regulates NAD metabolite binding to histone macroH2A. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 624-625.
- Law, L. M., Albin, O. R., Carroll, J. W., Jones, C. T., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. (2010). Identification of a dominant negative inhibitor of human zinc finger antiviral protein reveals a functional endogenous pool and critical homotypic interactions. *J Virol* **84**, 4504-4512.
- Leavitt, S. & Freire, E. (2001). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 560-566.
- Lee, H., Komano, J., Saitoh, Y., Yamaoka, S., Kozaki, T., Misawa, T., Takahama, M., Satoh, T., Takeuchi, O., Yamamoto, N., Matsuura, Y., Saitoh, T. & Akira, S. (2013). Zinc-finger antiviral protein mediates retinoic acid inducible gene I-like receptor-independent antiviral response to murine leukemia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 12379-12384.

- Lemm, J. A., Rumenapf, T., Strauss, E. G., Strauss, J. H. & Rice, C. M. (1994). Polypeptide requirements for assembly of functional Sindbis virus replication complexes: a model for the temporal regulation of minus- and plus-strand RNA synthesis. *Embo J* **13**, 2925-2934.
- Leung, A. K., Vyas, S., Rood, J. E., Bhutkar, A., Sharp, P. A. & Chang, P. (2011a). Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm. *Mol Cell* **42**, 489-499.
- Leung, J. Y., Ng, M. M. & Chu, J. J. (2011b). Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. *Adv Virol* **2011**, 249640.
- Liu, L., Chen, G., Ji, X. & Gao, G. (2004). ZAP is a CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling protein. *Biochem Biophys Res Commun* **321**, 517-523.
- Liu, Q., Greimann, J. C. & Lima, C. D. (2006). Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell* **127**, 1223-1237.
- Loseva, O., Jemth, A. S., Bryant, H. E., Schuler, H., Lehtio, L., Karlberg, T. & Helleday, T. (2010). PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA. *J Biol Chem* **285**, 8054-8060.
- MacDonald, M. R., Machlin, E. S., Albin, O. R. & Levy, D. E. (2007). The zinc finger antiviral protein acts synergistically with an interferon-induced factor for maximal activity against alphaviruses. *J Virol* **81**, 13509-13518.
- Malet, H., Coutard, B., Jamal, S., Dutartre, H., Papageorgiou, N., Neuvonen, M., Ahola, T., Forrester, N., Gould, E. A., Lafitte, D., Ferron, F., Lescar, J., Gorbalenya, A. E., de Lamballerie, X. & Canard, B. (2009). The crystal structures of Chikungunya and Venezuelan equine encephalitis virus nsP3 macro domains define a conserved adenosine binding pocket. *J Virol* **83**, 6534-6545.
- Mao, R., Nie, H., Cai, D., Zhang, J., Liu, H., Yan, R., Cuconati, A., Block, T. M., Guo, J. T. & Guo, H. (2013). Inhibition of hepatitis B virus replication by the host zinc finger antiviral protein. *PLoS Pathog* **9**, e1003494.
- Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., Seluanov, A. & Gorbunova, V. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science* **332**, 1443-1446.
- Marcello, T., Grakoui, A., Barba-Spaeth, G., Machlin, E. S., Kotenko, S. V., MacDonald, M. R. & Rice, C. M. (2006). Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics. *Gastroenterology* **131**, 1887-1898.
- McColl, D. J., Honchell, C. D. & Frankel, A. D. (1999). Structure-based design of an RNA-binding zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9521-9526.
- Melancon, P. & Garoff, H. (1987). Processing of the Semliki Forest virus structural polyprotein: role of the capsid protease. *J Virol* **61**, 1301-1309.
- Melton, J. V., Ewart, G. D., Weir, R. C., Board, P. G., Lee, E. & Gage, P. W. (2002). Alphavirus 6K proteins form ion channels. *J Biol Chem* **277**, 46923-46931.
- Mi, S., Durbin, R., Huang, H. V., Rice, C. M. & Stollar, V. (1989). Association of the Sindbis virus RNA methyltransferase activity with the nonstructural protein nsP1. *Virology* **170**, 385-391.
- Michel, S. L., Guerrero, A. L. & Berg, J. M. (2003). Selective RNA binding by a single CCCH zinc-binding domain from Nup475 (Tristetraprolin). *Biochemistry* **42**, 4626-4630.
- Mitchell, P. S., Emerman, M. & Malik, H. S. (2013). An evolutionary perspective on the broad antiviral specificity of MxA. *Curr Opin Microbiol* **16**, 493-499.

- Mogensen, K. E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. & Uze, G. (1999).** The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res* **19**, 1069-1098.
- Mosmann, T. (1983).** Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**, 55-63.
- Müller, S., Möller, P., Bick, M. J., Wurr, S., Becker, S., Günther, S. & Kümmerer, B. M. (2007).** Inhibition of filovirus replication by the zinc finger antiviral protein. *J Virol* **81**, 2391-2400.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J. P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C. S. & Wilusz, J. (2002).** The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *Embo J* **21**, 165-174.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986).** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-273.
- Muthumani, K., Choo, A. Y., Zong, W.-X., Madesh, M., Hwang, D. S., Premkumar, A., Thieu, K. P., Emmanuel, J., Kumar, S., Thompson, C. B. & Weiner, D. B. (2006).** The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1. *Nat Cell Biol* **8**, 170-179.
- Neuvonen, M. & Ahola, T. (2009).** Differential activities of cellular and viral macro domain proteins in binding of ADP-ribose metabolites. *J Mol Biol* **385**, 212-225.
- O'Gorman, S., Fox, D. & Wahl, G. (1991).** Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**, 1351-1355.
- Ohsaki, E., Ueda, K., Sakakibara, S., Do, E., Yada, K. & Yamanishi, K. (2004).** Poly(ADP-ribose) polymerase 1 binds to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) terminal repeat sequence and modulates KSHV replication in latency. *J Virol* **78**, 9936-9946.
- Olson, K. E., Higgs, S., Hahn, C. S., Rice, C. M., Carlson, J. O. & Beaty, B. J. (1994).** The expression of chloramphenicol acetyltransferase in *Aedes albopictus* (C6/36) cells and *Aedes triseriatus* mosquitoes using a double subgenomic recombinant sindbis virus. *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 39-48.
- Omar, A. & Koblet, H. (1988).** Semliki Forest virus particles containing only the E1 envelope glycoprotein are infectious and can induce cell-cell fusion. *Virology* **166**, 17-23.
- Orban, T. I. & Izaurralde, E. (2005).** Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA* **11**, 459-469.
- Otto, H., Reche, P. A., Bazan, F., Dittmar, K., Haag, F. & Koch-Nolte, F. (2005).** In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs). *BMC Genomics* **6**, 139.
- Ou, J. H., Rice, C. M., Dalgarno, L., Strauss, E. G. & Strauss, J. H. (1982).** Sequence studies of several alphavirus genomic RNAs in the region containing the start of the subgenomic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 5235-5239.
- Ouararhni, K., Hadj-Slimane, R., Ait-Si-Ali, S., Robin, P., Mietton, F., Harel-Bellan, A., Dimitrov, S. & Hamiche, A. (2006).** The histone variant mH2A1.1 interferes with transcription by down-regulating PARP-1 enzymatic activity. *Genes Dev* **20**, 3324-3336.
- Owen, K. E. & Kuhn, R. J. (1996).** Identification of a region in the Sindbis virus nucleocapsid protein that is involved in specificity of RNA encapsidation. *J Virol* **70**, 2757-2763.
- Owen, K. E. & Kuhn, R. J. (1997).** Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology* **230**, 187-196.

- Park, E. & Griffin, D. E. (2009a).** Interaction of Sindbis virus non-structural protein 3 with poly(ADP-ribose) polymerase 1 in neuronal cells. *J Gen Virol* **90**, 2073-2080.
- Park, E. & Griffin, D. E. (2009b).** The nsP3 macro domain is important for Sindbis virus replication in neurons and neurovirulence in mice. *Virology* **388**, 305-314.
- Parker, R. & Song, H. (2004).** The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 121-127.
- Patel, R. K., Burnham, A. J., Gebhart, N. N., Sokoloski, K. J. & Hardy, R. W. (2013).** Role for subgenomic mRNA in host translation inhibition during Sindbis virus infection of mammalian cells. *Virology* **441**, 171-181.
- Pehrson, J. R. & Fuji, R. N. (1998).** Evolutionary conservation of histone macroH2A subtypes and domains. *Nucleic Acids Res* **26**, 2837-2842.
- Peltier, D. C., Lazear, H. M., Farmer, J. R., Diamond, M. S. & Miller, D. J. (2013).** Neurotropic arboviruses induce interferon regulatory factor 3-mediated neuronal responses that are cytoprotective, interferon independent, and inhibited by Western equine encephalitis virus capsid. *J Virol* **87**, 1821-1833.
- Peränen, J., Laakkonen, P., Hyvönen, M. & Kääriäinen, L. (1995).** The alphavirus replicase protein nsP1 is membrane-associated and has affinity to endocytic organelles. *Virology* **208**, 610-620.
- Pfeffer, M., Kinney, R. M. & Kaaden, O.-R. (1998).** The Alphavirus 3' -Nontranslated Region: Size Heterogeneity and Arrangement of Repeated Sequence Elements. *Virology* **240**, 100-108.
- Pfefferle, S., Kräling, V., Ditt, V., Grywna, K., Mühlberger, E. & Drosten, C. (2009).** Reverse genetic characterization of the natural genomic deletion in SARS-Coronavirus strain Frankfurt-1 open reading frame 7b reveals an attenuating function of the 7b protein in-vitro and in-vivo. *Virol J* **6**, 131.
- Pichlmair, A. & Reis e Sousa, C. (2007).** Innate recognition of viruses. *Immunity* **27**, 370-383.
- Putics, A., Filipowicz, W., Hall, J., Gorbalenya, A. E. & Ziebuhr, J. (2005).** ADP-ribose-1"-monophosphatase: a conserved coronavirus enzyme that is dispensable for viral replication in tissue culture. *J Virol* **79**, 12721-12731.
- Ramsby, M. & Makowski, G. (2011).** Differential detergent fractionation of eukaryotic cells. *Cold Spring Harb Protoc* **2011**, prot5592.
- Rice, C. M., Levis, R., Strauss, J. H. & Huang, H. V. (1987).** Production of infectious RNA transcripts from Sindbis virus cDNA clones: mapping of lethal mutations, rescue of a temperature-sensitive marker, and in vitro mutagenesis to generate defined mutants. *J Virol* **61**, 3809-3819.
- Rikkonen, M., Peränen, J. & Kääriäinen, L. (1994).** ATPase and GTPase activities associated with Semliki Forest virus nonstructural protein nsP2. *J Virol* **68**, 5804-5810.
- Rosenthal, F., Feijs, K. L., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A. H., Imhof, R., Winkler, H. C., Fischer, D., Caflisch, A., Hassa, P. O., Lüscher, B. & Hottiger, M. O. (2013).** Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases. *Nat Struct Mol Biol* **20**, 502-507.
- Rubach, J. K., Wasik, B. R., Rupp, J. C., Kuhn, R. J., Hardy, R. W. & Smith, J. L. (2009).** Characterization of purified Sindbis virus nsP4 RNA-dependent RNA polymerase activity in vitro. *Virology* **384**, 201-208.
- Rungrotmongkol, T., Nunthaboot, N., Malaisree, M., Kaiyawet, N., Yotmanee, P., Meeprasert, A. & Hannongbua, S. (2010).** Molecular insight into the specific binding of ADP-ribose to the nsP3 macro domains of chikungunya and Venezuelan equine

- encephalitis viruses: molecular dynamics simulations and free energy calculations. *J Mol Graph Model* **29**, 347-353.
- Ryman, K. D., Meier, K. C., Nangle, E. M., Ragsdale, S. L., Korneeva, N. L., Rhoads, R. E., MacDonald, M. R. & Klimstra, W. B. (2005).** Sindbis Virus Translation Is Inhibited by a PKR/RNase L-Independent Effector Induced by Alpha/Beta Interferon Priming of Dendritic Cells. *J Virol* **79**, 1487-1499.
- Ryman, K. D., White, L. J., Johnston, R. E. & Klimstra, W. B. (2002).** Effects of PKR/RNase L-dependent and alternative antiviral pathways on alphavirus replication and pathogenesis. *Viral Immunol* **15**, 53-76.
- Saikatendu, K. S., Joseph, J. S., Subramanian, V., Clayton, T., Griffith, M., Moy, K., Velasquez, J., Neuman, B. W., Buchmeier, M. J., Stevens, R. C. & Kuhn, P. (2005).** Structural basis of severe acute respiratory syndrome coronavirus ADP-ribose-1''-phosphate dephosphorylation by a conserved domain of nsP3. *Structure* **13**, 1665-1675.
- Samuel, C. E. (2001).** Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* **14**, 778-809, table of contents.
- Sanz, M. A. & Carrasco, L. (2001).** Sindbis virus variant with a deletion in the 6K gene shows defects in glycoprotein processing and trafficking: lack of complementation by a wild-type 6K gene in trans. *J Virol* **75**, 7778-7784.
- Sanz, M. A., Perez, L. & Carrasco, L. (1994).** Semliki Forest virus 6K protein modifies membrane permeability after inducible expression in Escherichia coli cells. *J Biol Chem* **269**, 12106-12110.
- Savitsky, P., Bray, J., Cooper, C. D., Marsden, B. D., Mahajan, P., Burgess-Brown, N. A. & Gileadi, O. (2010).** High-throughput production of human proteins for crystallization: the SGC experience. *J Struct Biol* **172**, 3-13.
- Sbodio, J. I., Lodish, H. F. & Chi, N. W. (2002).** Tankyrase-2 oligomerizes with tankyrase-1 and binds to both TRF1 (telomere-repeat-binding factor 1) and IRAP (insulin-responsive aminopeptidase). *Biochem J* **361**, 451-459.
- Schoggins, J. W. & Rice, C. M. (2011).** Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* **1**, 519-525.
- Schreiber, V., Amé, J. C., Dollé, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Ménissier-de Murcia, J. & de Murcia, G. (2002).** Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* **277**, 23028-23036.
- Schreiber, V., Dantzer, F., Ame, J. C. & de Murcia, G. (2006).** Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517-528.
- Schwartz, O. & Albert, M. L. (2010).** Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nat Rev Microbiol* **8**, 491-500.
- Seo, J.-Y., Yaneva, R. & Cresswell, P. (2011).** Viperin: A Multifunctional, Interferon-Inducible Protein that Regulates Virus Replication. *Cell Host Microbe* **10**, 534-539.
- Seth, R. B., Sun, L. & Chen, Z. J. (2006).** Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res* **16**, 141-147.
- Sharifi, R., Morra, R., Appel, C. D., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., Simpson, M. A., Matic, I., Ozkan, E., Golia, B., Schellenberg, M. J., Weston, R., Williams, J. G., Rossi, M. N., Galehdari, H., Krahn, J., Wan, A., Trembath, R. C., Crosby, A. H., Ahel, D., Hay, R., Ladurner, A. G., Timinszky, G., Williams, R. S. & Ahel, I. (2013).** Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease. *Embo J* **32**, 1225-1237.

- Shirako, Y. & Strauss, J. H. (1994).** Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *J Virol* **68**, 1874-1885.
- Smith, T. J., Cheng, R. H., Olson, N. H., Peterson, P., Chase, E., Kuhn, R. J. & Baker, T. S. (1995).** Putative receptor binding sites on alphaviruses as visualized by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10648-10652.
- Spuul, P., Balistreri, G., Kääriäinen, L. & Ahola, T. (2010).** Phosphatidylinositol 3-kinase-, actin-, and microtubule-dependent transport of Semliki Forest Virus replication complexes from the plasma membrane to modified lysosomes. *J Virol* **84**, 7543-7557.
- Sreejith, R., Rana, J., Dudha, N., Kumar, K., Gabrani, R., Sharma, S. K., Gupta, A., Vрати, S., Chaudhary, V. K. & Gupta, S. (2012).** Mapping interactions of Chikungunya virus nonstructural proteins. *Virus Res* **169**, 231-236.
- Steffen, J. D. & Pascal, J. M. (2013).** New players to the field of ADP-ribosylation make the final cut. *Embo J* **32**, 1205-1207.
- Strauss, E. G., Rice, C. M. & Strauss, J. H. (1984).** Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. *Virology* **133**, 92-110.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. (1994).** The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol Rev* **58**, 491-562.
- Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M. C. & Gasque, P. (2012).** Arthritogenic alphaviruses--an overview. *Nat Rev Rheumatol* **8**, 420-429.
- Sun, L., Lv, F., Guo, X. & Gao, G. (2012).** Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) modulates antiviral activity of zinc-finger antiviral protein (ZAP). *J Biol Chem* **287**, 22882-22888.
- Suthar, M. S., Shabman, R., Madric, K., Lambeth, C. & Heise, M. T. (2005).** Identification of adult mouse neurovirulence determinants of the Sindbis virus strain AR86. *J Virol* **79**, 4219-4228.
- Sutter, G., Ohlmann, M. & Erfle, V. (1995).** Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Letters* **371**, 9-12.
- Tan, J., Vonrhein, C., Smart, O. S., Bricogne, G., Bollati, M., Kusov, Y., Hansen, G., Mesters, J. R., Schmidt, C. L. & Hilgenfeld, R. (2009).** The SARS-unique domain (SUD) of SARS coronavirus contains two macrodomains that bind G-quadruplexes. *PLoS Pathog* **5**, e1000428.
- Tempera, I., Deng, Z., Atanasiu, C., Chen, C. J., D'Erme, M. & Lieberman, P. M. (2010).** Regulation of Epstein-Barr virus OriP replication by poly(ADP-ribose) polymerase 1. *J Virol* **84**, 4988-4997.
- Teo, T. H., Lum, F. M., Claser, C., Lulla, V., Lulla, A., Merits, A., Renia, L. & Ng, L. F. (2013).** A pathogenic role for CD4+ T cells during Chikungunya virus infection in mice. *J Immunol* **190**, 259-269.
- TheUniProtConsortium (2013).** Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res* **41**, D43-47.
- Thomas, D., Blakqori, G., Wagner, V., Banholzer, M., Kessler, N., Elliott, R. M., Haller, O. & Weber, F. (2004).** Inhibition of RNA polymerase II phosphorylation by a viral interferon antagonist. *J Biol Chem* **279**, 31471-31477.
- Töller, M. (2012).** Studies on the Inhibition of Alphaviruses by the Human Zinc-Finger Antiviral Protein. *Masterarbeit, Hochschule Bonn-Rhein-Sieg*.
- Tomar, S., Hardy, R. W., Smith, J. L. & Kuhn, R. J. (2006).** Catalytic Core of Alphavirus Nonstructural Protein nsP4 Possesses Terminal Adenylyltransferase Activity. *J Virol* **80**, 9962-9969.



- Tomari, Y. & Zamore, P. D. (2005).** Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* **19**, 517-529.
- Toribio, R. & Ventoso, I. (2010).** Inhibition of host translation by virus infection in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9837-9842.
- Tuittila, M. & Hinkkanen, A. E. (2003).** Amino acid mutations in the replicase protein nsP3 of Semliki Forest virus cumulatively affect neurovirulence. *J Gen Virol* **84**, 1525-1533.
- Tuittila, M. T., Santagati, M. G., Røyttä, M., Määttä, J. A. & Hinkkanen, A. E. (2000).** Replicase complex genes of Semliki Forest virus confer lethal neurovirulence. *J Virol* **74**, 4579-4589.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. (2012).** Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res* **40**, e115.
- Vanlandingham, D. L., Tsetsarkin, K., Hong, C., Klingler, K., McElroy, K. L., Lehane, M. J. & Higgs, S. (2005).** Development and characterization of a double subgenomic chikungunya virus infectious clone to express heterologous genes in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 1162-1170.
- Varjak, M., Zusinaite, E. & Merits, A. (2010).** Novel functions of the alphavirus nonstructural protein nsP3 C-terminal region. *J Virol* **84**, 2352-2364.
- Vasiljeva, L., Merits, A., Auvinen, P. & Kääriäinen, L. (2000).** Identification of a novel function of the alphavirus capping apparatus. RNA 5'-triphosphatase activity of Nsp2. *J Biol Chem* **275**, 17281-17287.
- Vihinen, H., Ahola, T., Tuittila, M., Merits, A. & Kääriäinen, L. (2001).** Elimination of phosphorylation sites of Semliki Forest virus replicase protein nsP3. *J Biol Chem* **276**, 5745-5752.
- Vihinen, H. & Saarinen, J. (2000).** Phosphorylation site analysis of Semliki forest virus nonstructural protein 3. *J Biol Chem* **275**, 27775-27783.
- Vogel, C. & Marcotte, E. M. (2012).** Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* **13**, 227-232.
- Wang, N., Dong, Q., Li, J., Jangra, R. K., Fan, M., Brasier, A. R., Lemon, S. M., Pfeffer, L. M. & Li, K. (2010a).** Viral induction of the zinc finger antiviral protein is IRF3-dependent but NF-kappaB-independent. *J Biol Chem* **285**, 6080-6090.
- Wang, X., Lv, F. & Gao, G. (2010b).** Mutagenesis analysis of the zinc-finger antiviral protein. *Retrovirology* **7**, 19.
- Wang, X., Tu, F., Zhu, Y. & Gao, G. (2012).** Zinc-finger antiviral protein inhibits XMRV infection. *PLoS One* **7**, e39159.
- Weaver, J. C. & Chizmadzhev, Y. A. (1996).** Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochem Bioenerg* **41**, 135-160.
- Weiss, B., Nitschko, H., Ghattas, I., Wright, R. & Schlesinger, S. (1989).** Evidence for specificity in the encapsidation of Sindbis virus RNAs. *J Virol* **63**, 5310-5318.
- Welsby, I., Hutin, D. & Leo, O. (2012).** Complex roles of members of the ADP-ribosyl transferase super family in immune defences: looking beyond PARP1. *Biochem Pharmacol* **84**, 11-20.
- Winter-Vann, A. M. & Casey, P. J. (2005).** Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat Rev Cancer* **5**, 405-412.
- Wojdyla, J. A., Manolaridis, I., Snijder, E. J., Gorbalenya, A. E., Coutard, B., Piotrowski, Y., Hilgenfeld, R. & Tucker, P. A. (2009).** Structure of the X (ADRP) domain of nsP3 from feline coronavirus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **65**, 1292-1300.
- Xuan, Y., Liu, L., Shen, S., Deng, H. & Gao, G. (2012).** Zinc finger antiviral protein inhibits murine gammaherpesvirus 68 M2 expression and regulates viral latency in cultured cells. *J Virol* **86**, 12431-12434.

- Yan, N. & Chen, Z. J. (2012).** Intrinsic antiviral immunity. *Nat Immunol* **13**, 214-222.
- Yao, F., Svensjö, T., Winkler, T., Lu, M., Eriksson, C. & Eriksson, E. (1998).** Tetracycline repressor, tetR, rather than the tetR-mammalian cell transcription factor fusion derivatives, regulates inducible gene expression in mammalian cells. *Hum Gene Ther* **9**, 1939-1950.
- Ye, P., Liu, S., Zhu, Y., Chen, G. & Gao, G. (2010).** DEXH-Box protein DHX30 is required for optimal function of the zinc-finger antiviral protein. *Protein Cell* **1**, 956-964.
- Yi, M., Ma, Y., Yates, J. & Lemon, S. M. (2009).** Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *PLoS Pathog* **5**, e1000403.
- Yi, Z., Sperzel, L., Nürnberger, C., Bredenbeek, P. J., Lubick, K. J., Best, S. M., Stoyanov, C. T., Law, L. M., Yuan, Z., Rice, C. M. & MacDonald, M. R. (2011).** Identification and characterization of the host protein DNAJC14 as a broadly active flavivirus replication modulator. *PLoS Pathog* **7**, e1001255.
- Yin, J., Gardner, C. L., Burke, C. W., Ryman, K. D. & Klimstra, W. B. (2009).** Similarities and differences in antagonism of neuron alpha/beta interferon responses by Venezuelan equine encephalitis and Sindbis alphaviruses. *J Virol* **83**, 10036-10047.
- Yoneyama, M. & Fujita, T. (2007).** Function of RIG-I-like receptors in antiviral innate immunity. *J Biol Chem* **282**, 15315-15318.
- Zhang, F. L. & Casey, P. J. (1996).** Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu Rev Biochem* **65**, 241-269.
- Zhang, Y., Burke, C. W., Ryman, K. D. & Klimstra, W. B. (2007).** Identification and characterization of interferon-induced proteins that inhibit alphavirus replication. *J Virol* **81**, 11246-11255.
- Zhou, Z., Wang, N., Woodson, S. E., Dong, Q., Wang, J., Liang, Y., Rijnbrand, R., Wei, L., Nichols, J. E., Guo, J. T., Holbrook, M. R., Lemon, S. M. & Li, K. (2011).** Antiviral activities of ISG20 in positive-strand RNA virus infections. *Virology* **409**, 175-188.
- Zhu, Y., Chen, G., Lv, F., Wang, X., Ji, X., Xu, Y., Sun, J., Wu, L., Zheng, Y. T. & Gao, G. (2011).** Zinc-finger antiviral protein inhibits HIV-1 infection by selectively targeting multiply spliced viral mRNAs for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15834-15839.
- Zhu, Y. & Gao, G. (2008).** ZAP-mediated mRNA degradation. *RNA Biol* **5**, 65-67.
- Zhu, Y., Wang, X., Goff, S. P. & Gao, G. (2012).** Translational repression precedes and is required for ZAP-mediated mRNA decay. *Embo J* **31**, 4236-4246.
- Ziegler, S. A., Nuckols, J., McGee, C. E., Huang, Y. J., Vanlandingham, D. L., Tesh, R. B. & Higgs, S. (2011).** In vivo imaging of chikungunya virus in mice and Aedes mosquitoes using a Renilla luciferase clone. *Vector Borne Zoonotic Dis* **11**, 1471-1477.

## 8. Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

2xM. / 3xM.	Doppel- / Tripelmutante
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
Appr-1''-pase	ADP-Ribose-1''-Phosphatase
BFV	Barmah-Forest-Virus
BHK	Babyhamster Nierenzellen ( <i>baby hamster kidney</i> )
cDNA	Komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CHIKV	Chikungunya-Virus
CoIP	Coimmunopräzipitation
CoV	Coronavirus
CPE	Zytopathischer Effekt ( <i>cytopathic effect</i> )
C-Protein	Capsid-Protein
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
Dox	Doxycyclin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EEEV	Eastern-Equine-Encephalitis-Virus
EP	Elektroporation
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FLuc	<i>Firefly</i> Luciferase
FPLC	<i>Fast Liquid Protein Chromatography</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GOI	Interessierendes Zielgen ( <i>gene of interest</i> )
GST-Tag	Glutathion-S-Transferase-Tag
h p.i.	Stunden nach Infektion ( <i>hours post infection</i> )
HA-Tag	Hämagglutinin-Tag
HEK (Zellen)	Humane embryonale Nierenzellen ( <i>human embryonic kidney</i> )

---

His-Tag	Hexahistidin-Tag
HIV-1	Humanes Immundefizienz-Virus 1
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IRF	IFN-regulatorischer Faktor ( <i>interferon regulatory factor</i> )
ISG	IFN-stimuliertes Gen ( <i>interferon stimulated gene</i> )
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie ( <i>isothermal titration calorimetry</i> )
kb	Kilobase
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
LIC	<i>Ligation Independent Cloning</i>
Log	Dekadischer Logarithmus (Zehnerpotenz)
MDA-5	<i>melanoma differentiation-associated gene-5</i>
MDO1	<i>MACRO domain-containing protein 1</i>
MEF (Zellen)	Embryonale Maus-Fibroblasten ( <i>mouse embryonic fibroblasts</i> )
MLV	Murines Leukämievirus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTT	Thiazolylblau / 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MVA-T7	Modifiziertes Vacciniavirus Ankara
Mx-Protein	<i>Myxovirus resistance</i> -Protein
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor-<math>\kappa</math>B</i>
nsP	Nichtstrukturprotein
nt	Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
OAS	2'-5'-Oligoadeylat-Synthetase
OD <sub>xx</sub>	Optische Dichte bei Wellenlänge xx nm
ONNV	O'nyong-nyong-Virus
ORF	Offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )

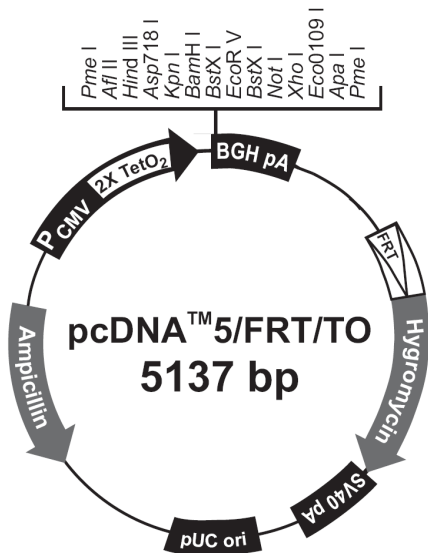
---

PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PARN	Poly(A)-spezifische-Ribonuklease
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PFU	Plaue-bildende Einheit ( <i>plaque forming unit</i> )
PKR	Proteinkinase R
Poly(A)	Polyadenin
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RdRP	<i>RNA-dependent RNA-polymerase</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene-1</i>
RLU	<i>Relative Light Unit</i>
RLuc	<i>Renilla</i> Luciferase
RNA (dsRNA)	Ribonukleinsäure (doppelsträngige RNA)
RNAP II	RNA-Polymerase II
RRV	Ross-River-Virus
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )- Polyacrylamidgelelektrophorese
SFV	Semliki-Forest-Virus
SINV	Sindbis-Virus
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
sP	Strukturprotein
TPH-Domäne	TiPARP-Homologie-Domäne
v.a.	vor allem
VEEV	Venezuelan-Equine-Encephalitis-Virus
WEEV	Western-Equine-Encephalitis-Virus
wt	Wildtyp
YFV	Gelbfieber-Virus ( <i>Yellow Fever Virus</i> )
ZAP (h / m / r; -L / -S)	Zinkfinger antivirales Protein (human / murin / Ratte; lang / kurz)
ZRE	<i>ZAP responsive element</i>

## 8.2 Vektorkarten

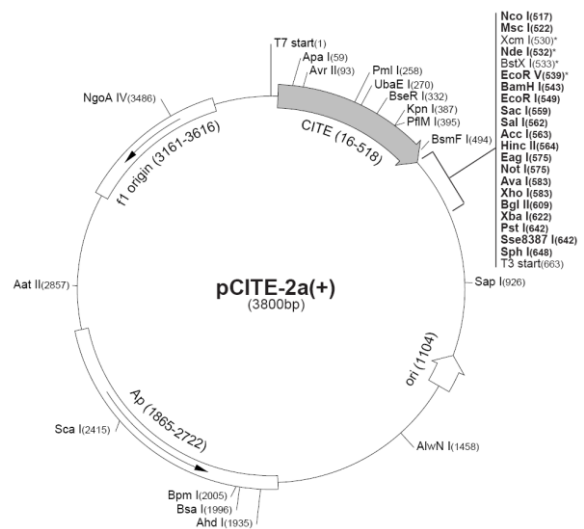
### pcDNA™5/FRT/TO

Invitrogen / Life Technologies (Darmstadt)



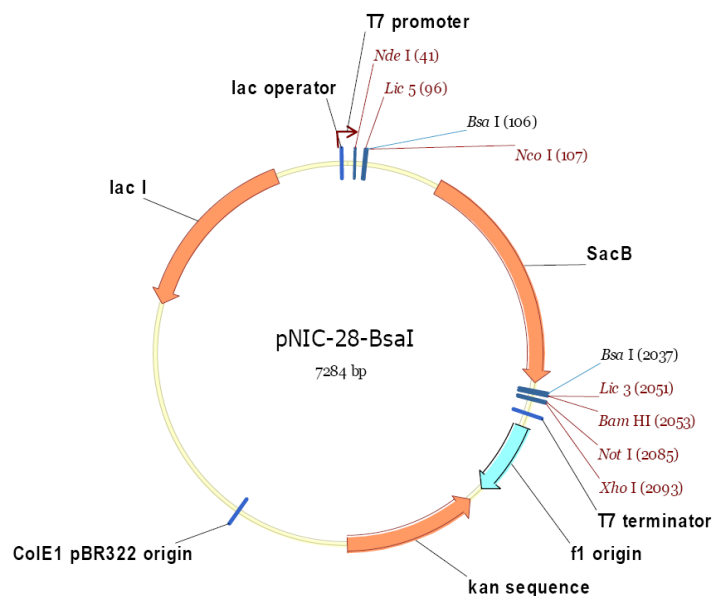
### pCITE-2a(+)

Novagen / Merck Millipore (Darmstadt)



### pNIC-28-BsaI

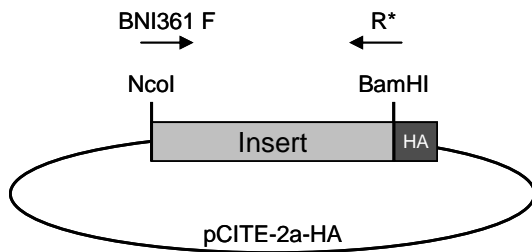
Opher Gileadi, University of Oxford (Oxford, UK)



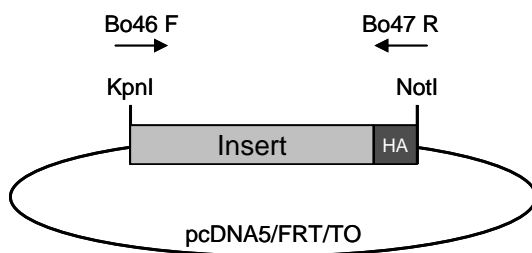
### 8.3 Klonierungsübersicht

#### 8.3.1 Expressionsplasmide für hZAP-L und hZAP-S

→ Abschnitt 3.1.1



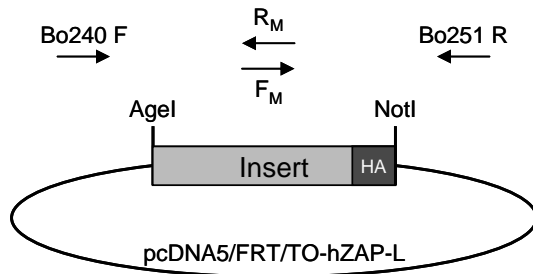
Konstrukt	Insert	* Primer revers (R)	PCR-Template
phZAP-L-HA	hZAP-L	Bo80 R	DKFZp686H1869Q2
phZAP-S-HA	hZAP-S	BNI369 R	DKFZp686H1869Q2



Konstrukt	Insert	PCR-Template
pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L	hZAP-L-HA	phZAP-L-HA (s.o.)
pcDNA5/FRT/TO-hZAP-S	hZAP-S-HA	phZAP-S-HA (s.o.)

### 8.3.2 Triadenmotiv-Mutanten des hZAP-L

→ Abschnitt 3.3.1

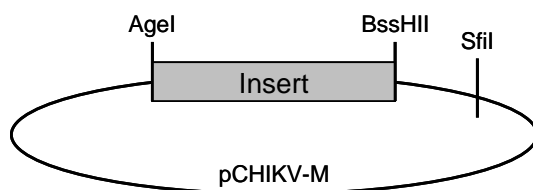


Konstrukt	Mutagenese-Primer		Template Mutagenese-PCR
	forward (F <sub>M</sub> )	revers (R <sub>M</sub> )	
pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L			
hZAP-L-AYV	Bo259 F	Bo260 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L
hZAP-L-YAV	Bo245 F	Bo246 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L
hZAP-L-YYA	Bo247 F	Bo248 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L
hZAP-L-AAV (Zwischenkonstrukt)	Bo245 F	Bo246 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L-AYV
hZAP-L-AAA	Bo247 F	Bo248 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L-AAV
hZAP-L-HYV	Bo423 F	Bo424 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L
hZAP-L-YYE	Bo249 F	Bo250 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L
hZAP-L-HYE	Bo249 F	Bo250 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L-HYV

Als Template für die Fusions-PCR dienten jeweils die Produkte der Mutagenese-PCR (siehe 2.2.4.2).

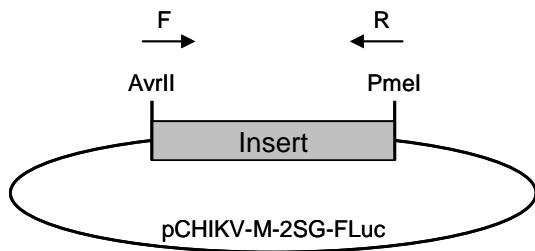
### 8.3.3 ZRE-Chimären

→ Abschnitt 3.4.1



Konstrukt	Insert	Spenderkonstrukt Insert
pCHIKV-M-2SG-FLuc	Duplizierter sgPromotor und FLuc (+ flankierende CHIKV-Sequenzen)	LR2006-OPY1-FLuc, (Teo <i>et al.</i> , 2013)

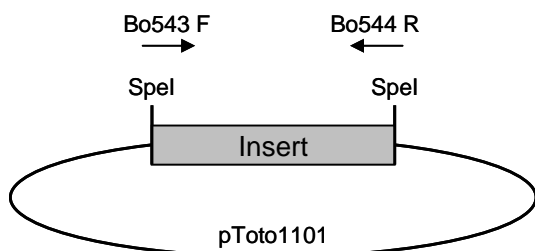




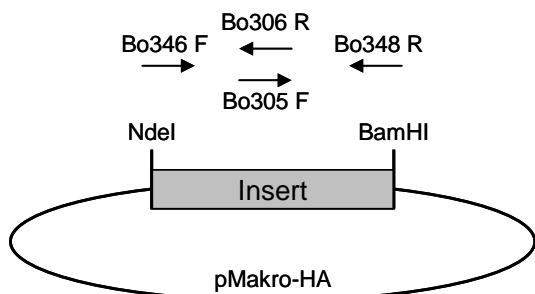
Konstrukt	Insert	Primer		PCR-Template
		forward (F)	revers (R)	
pCHIKV+SINV-M	SINV M	Bo557 F	Bo558 R	pToto1101
pCHIKV+SINV-N	SINV N	Bo559 F	Bo560 R	pToto1101
pCHIKV+Kontrolle	YFV NS5-Fragment	Bo621 F	Bo622 R	pACNR/FLYF-17Dx

### 8.3.4 Makrodomänen-Chimären

→ Abschnitt 3.5.1.1



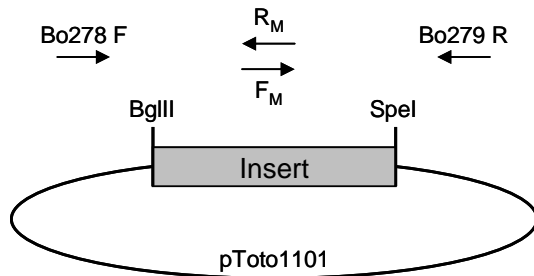
Konstrukt	Insert	PCR-Template
pSINV+CHIKV-Makro	CHIKV Makrodomäne	pMakro-HA
pSINV+CHIKV-Makro-D10A	CHIKV Makrodom. mit D10A-Mutation	pMakro-D10A-HA (s.u.)



Konstrukt	Insert	Template Mutagenese-PCR
pMakro-D10A-HA	Produkt Fusions-PCR	pMakro-HA

### 8.3.5 SINV Makrodomänen-Mutanten

→ Abschnitt 3.5.2.1

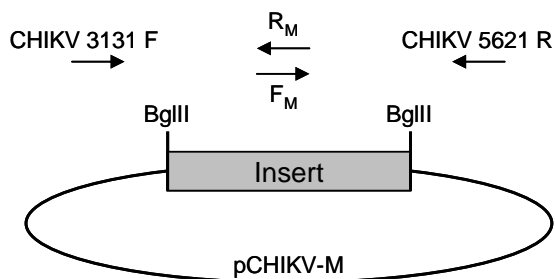


Konstrukt	Mutagenese-Primer		Template Mutagenese-PCR
	forward (F <sub>M</sub> )	revers (R <sub>M</sub> )	
pSINV-N10A	Bo307 F	Bo308 R	pToto1101
pSINV-N24A	Bo272 F	Bo273 R	pToto1101
pSINV-Y114A	Bo276 F	Bo277 R	pToto1101
pSINV-N10D	Bo334 F	Bo335 R	pToto1101
pSINV-2xM.-24/114	Bo276 F	Bo277 R	pSINV-N24A
pSINV-3xM.-10/24/114	Bo307 F	Bo308 R	pSINV-2xM.-24/114

Als Template für die Fusions-PCR dienten jeweils die Produkte der Mutagenese-PCR (siehe 2.2.4.2).

### 8.3.6 CHIKV Makrodomänen-Mutanten

→ Abschnitt 3.5.2.2

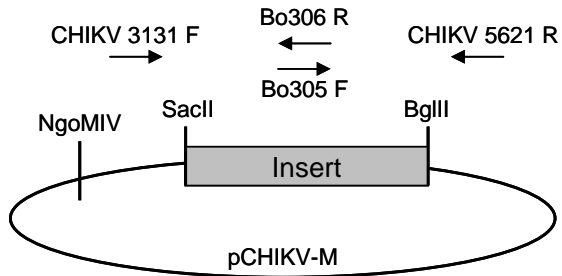


Konstrukt	Mutagenese-Primer		Template Mutagenese-PCR
	forward (F <sub>M</sub> )	revers (R <sub>M</sub> )	
pCHIKV-D10A	Bo305 F	Bo306 R	pCHIKV-M
pCHIKV-N24A	Chik Asn41Ala F / R		pCHIKV-M
pCHIKV-Y114A	Chik Tyr133Ala F / R		pCHIKV-M
pCHIKV-D10N	Bo338 F	Bo339 R	pCHIKV-M
pCHIKV-2xM.-24/114	Chik Tyr133Ala F / R		pCHIKV-N24A
pCHIKV-3xM.-10/24/114	Bo305 F	Bo306 R	pCHIKV-2xM.-24/114

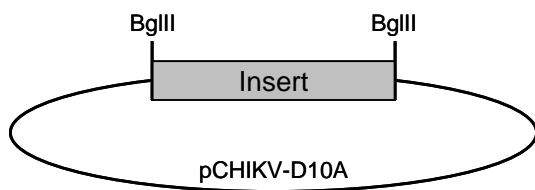
Als Template für die Fusions-PCR dienten jeweils die Produkte der Mutagenese-PCR (siehe 2.2.4.2).

### 8.3.7 Untersuchung der CHIKV D10A-Mutante

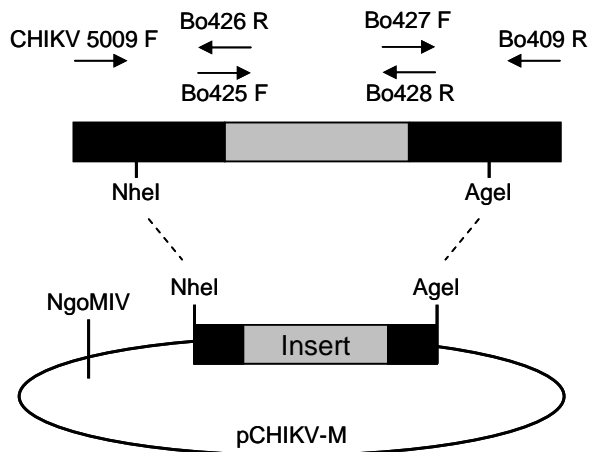
→ Abschnitt 3.5.2.3



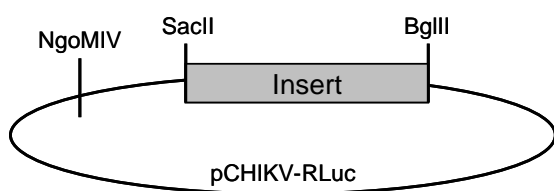
Konstrukt	Insert	Template Mutagenese-PCR
pCHIKV-D10A II (alternative Strategie)	Produkt Fusions-PCR	pCHIKV-M



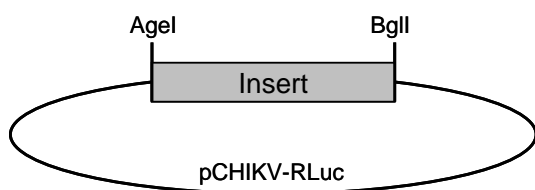
Konstrukt	Insert	Spenderkonstrukt Insert
pCHIKV-D10A-Rückklon. (Rückklonierung)	wt Sequenz ohne D10A-Mutation	pCHIKV-M



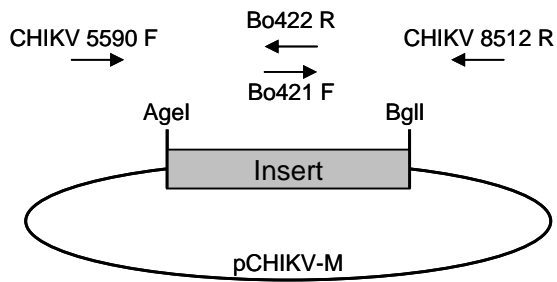
Konstrukt	Insert	PCR-Templates
pCHIKV-RLuc	Fusionsprodukt aus RLuc (grau) mit flankierenden CHIKV nsP3-Sequenzen (schwarz)	phRL-CMV (grauer Bereich) pCHIKV-M (schwarze Bereiche)



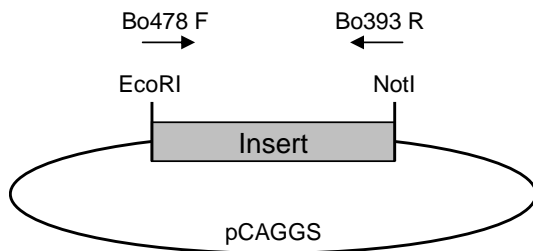
Konstrukt	Insert	Spenderkonstrukt Insert
pCHIKV-RLuc-Makro-D10A	CHIKV Makrodom. mit D10A-Mutation	pCHIKV-D10A (s.o., 8.3.6)



Konstrukt	Insert	Spenderkonstrukt Insert
pCHIKV-RLuc-nsP4-GAA	CHIKV nsP4 mit GDD zu GAA-Austausch	pCHIKV-GAA (s.u.)



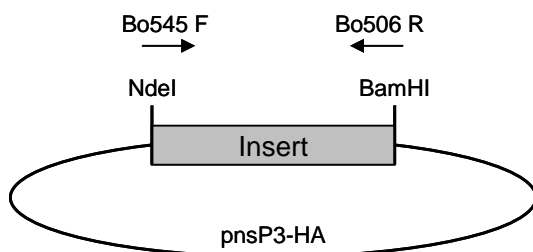
Konstrukt	Insert	PCR-Template
pCHIKV-GAA	Produkt Fusions-PCR	pCHIKV-M



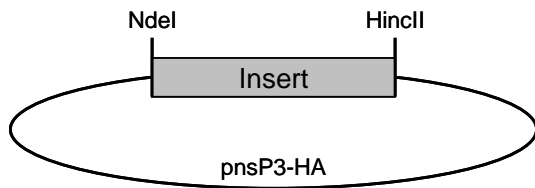
Konstrukt	Insert	PCR-Template
pCAGGS-nsP3-HA	CHIKV nsP3-HA	pnsP3-HA

### 8.3.8 CHIKV CoIP-Konstrukte

→ Abschnitt 3.6



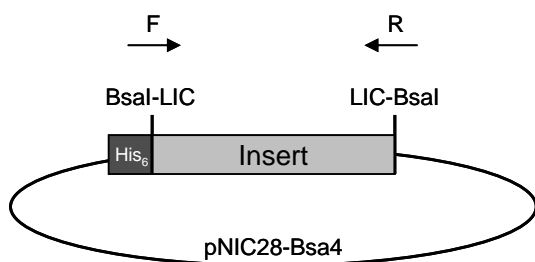
Konstrukt	Insert	PCR-Template
pnsP3-ΔMakro-HA	CHIKV nsP3 ohne Makrodomäne	pnsP3-HA



Konstrukt	Insert	Spenderkonstrukt Insert
pnsP3-D10A-HA	CHIKV nsP3-Fragment mit D10A-Mutation	pMakro-D10A-HA (s.o., 8.3.4)

### 8.3.9 Expressionsplasmide für die bakterielle Proteinexpression

→ Abschnitt 3.7.1



Konstrukt	Primer		PCR-Template
	forward (F)	revers (R)	
pNIC28-Bsa4-			
CHIKV Makrodomäne	Bo374 F	Bo375 R	pCHIKV-M
ONNV Makrodomäne	Bo394 F	Bo395 R	ONNV RNA-Extrakt*
SINV Makrodomäne	Bo376 F	Bo377 R	pToto1101
hZAP-L PARP-Domäne	Bo662 F	Bo663 R	pcDNA5/FRT/TO-hZAP-L

\* *one-step* RT-PCR (siehe 2.2.5.3) nach viraler RNA-Extraktion (siehe 2.2.5.2.2).

## 8.4 Erklärung zur Dissertation

Ich erkläre hiermit, dass ich

- die Dissertation persönlich, selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe angefertigt habe,
- keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe,
- diese oder eine ähnliche Arbeit an keiner anderen Universität zur Erlangung eines Titels eingereicht habe,
- noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Bonn, den 28.04.2014

---

Sabine Gläsker

## 8.5 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Christian Drost bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Institut an diesem interessanten Thema zu arbeiten und mich dabei mit wertvollen Ratschlägen und hilfreichen Diskussionen unterstützt hat.

Herrn Prof. Albert Haas bin ich sehr dankbar für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens. Ebenso danke ich Frau Prof. Christiane Dahl als fachnaher Gutachterin und Herrn Prof. Hans-Georg Sahl als fachfremdem Gutachter meiner Promotionskommission.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Beate Mareike Kümmerer für ihre hervorragende Betreuung und die zuverlässige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft wie auch ihre unerschöpfliche Geduld, Fragen zu beantworten und Probleme zu lösen. Ihre Motivation und ihr Ideenreichtum und nicht zuletzt die Freitag-Abend-Besprechungen haben den Fortschritt dieser Arbeit sehr bereichert.

Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Herrn Dr. Tero Ahola für die Möglichkeit, die ITC-Experimente mithilfe seines Fachwissens in Helsinki durchgeführt haben zu können und für die Gastfreundschaft seiner Arbeitsgruppe während des Aufenthaltes dort. Vor allem Ilkka Harry sei dabei für seine geduldige Hilfe bei der praktischen Durchführung gedankt.

Maria Khaminets (geb. Kampes) möchte ich ganz herzlich für ihre großartige Hilfe bei den FPLC-Proteinaufreinigungen danken.

Den aktuellen und ehemaligen Kollegen der beiden Augenklinik-Exil-Arbeitsgruppen: Anna, Anne, Bene, Dinah, Eva, Flo, Hanna, Janett, Katha, Klaus, Kyra, Laura, Manju, Marco, Maren, Mario, Melvin, Pascal, Ramona, Sandra, Thierry und Valli danke ich für die sehr schöne gemeinsame Zeit und den vielen Spaß bei und außerhalb der Arbeit wie auch die Hilfe bei allen kleinen und großen Problemen des Laboralltages. Auch den Mitarbeitern im Westflügel sei für all ihre Hilfe und Unterstützung ganz herzlich gedankt.

Meinen Freunden danke ich für das Leben neben der Doktorarbeit, die wunderbare Zeit und all die gemeinsamen Erlebnisse.

Meiner lieben Familie danke ich von ganzem Herzen, dass sie unentwegt an mich geglaubt, mich jederzeit ermutigt und in allen Lebenslagen unterstützt hat.

Stefan, Dir danke ich, dass Du immer für mich da bist und ich mich bedingungslos und uneingeschränkt auf Dich verlassen kann.