

Biochemische und strukturelle Charakterisierung der Genexpressionsmaschinerie des Vaccinia Virus

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von **Kristina Bedenk**
aus Obervolkach

Würzburg, 2016

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Aladár A. Szalay

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Prüfer: Prof. Dr. Aladár A. Szalay
3. Prüfer: Prof. Dr. Alexander Buchberger

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Pockenviren – Auslöser der Pockeninfektion bis zur Entdeckung eines Vakzins	6
3.1.1	Morphologie des Vaccinia-Virus.....	7
3.1.2	Replikationszyklus des Vaccinia-Virus	8
3.2	Die Genexpression des VACV – ein zeitlich reguliertes Expressionssystem	11
3.2.1	Die frühe Genexpression beruht auf dem Holoenzym der vvrPO zusammen mit RAP94	13
3.2.2	Das Holoenzym der vvrPO synthetisiert postreplikative mRNAs.....	16
3.3	Problemstellung und Konzeption	17
4	Ergebnisse	18
4.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung des rekombinanten Virus GLV-1h439	18
4.2	Aufreinigung der vvrPO über rekombinante Vaccinia-Viren	21
4.3	Identifizierung von zwei distinkten vvrPO Komplexen <i>in vivo</i>	23
4.4	Komplex II kristallisiert sich als transkriptionell aktiver Komplex heraus	25
4.5	Virale RNA Polymerase interagiert mit spezifischen tRNAs	26
4.6	E11 erweist sich als essentieller Faktor in der viralen Transkription	33
4.7	Strukturelle Analyse von vvrPO	36
4.7.1	Strukturbiologische Untersuchung von Komplex I der vvrPO	36
4.7.2	Strukturbiologische Untersuchung von Komplex II der vvrPO	40
4.7.3	Quervernetzungsstudien geben Hinweise auf die Position von RPO35 im vvrPO Komplex.....	43
4.7.4	Atomare Struktur von E11 weist eine Dimerisierung des Proteins auf	44
5	Diskussion	47
1.1	Replikationsverhalten der rVACV GLV-1h439 und GLV-1h440	48
1.2	Aufreinigung von RPO133 offenbart eine große Anzahl von viralen Interaktionspartnern	48
1.3	vvrPO ist in mindestens zwei distinkten Komplexen organisiert	49
1.4	Nativer RNA Polymerase Komplex II interagiert mit zwei neuen Komponenten ...	54

1.4.1	tRNA ^{Gln} und tRNA ^{Arg} als RNA Komponenten von Komplex II	54
1.4.2	E11 ist ein bislang nicht bekannter Interaktionspartner der vvRPO	56
1.5	vvRPO weist massive strukturelle Ähnlichkeit zur zellulären Pol II auf	57
6	Material & Methoden	61
6.1	Materialien.....	61
6.1.1	Längenstandards	61
6.1.2	Enzyme	61
6.1.3	Kits.....	62
6.1.4	Puffer und Lösungen	62
6.1.5	Gradientenpuffer.....	70
6.1.6	<i>in vitro</i> Transkriptionspuffer.....	70
6.1.7	Antikörper	71
6.1.8	Plasmide	72
6.1.9	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien	72
6.1.10	DNA und RNA Oligonukleotide.....	73
6.1.11	Rekombinante Viruskonstrukte.....	75
6.2	Methoden	77
6.2.1	Molekularbiologische Methoden	77
6.2.2	Biochemische Methoden.....	80
6.2.3	Strukturbiologische Untersuchungen.....	91
6.2.4	Immunbiochemische Methoden	91
6.2.5	Zellbiologische Methoden	94
6.2.6	Virologische Methoden	96
7	Literaturverzeichnis	99
8	Anhang.....	105
8.1	Tabelle der RNA Sequenziererergebnisse	105
8.2	Crosslink-Daten: Komplex I der vvRPO (Prof. Dr. Henning Urlaub)	106
8.3	Crosslink-Daten: Komplex II der vvRPO (Prof. Dr. Henning Urlaub)	112
9	Abbildungsverzeichnis.....	121
10	Abkürzungsverzeichnis	123

10.1 Nukleotidbasen	128
10.2 Aminosäuren	128
11 Puplicationen.....	130
12 Danksagung	131
13 Erklärung.....	133

1 Zusammenfassung

Die Familie der Pockenviren zeichnet sich durch ein komplexes DNA Genom aus und hat großes medizinisches Potential. Am eindrucksvollsten ist dies für das Vaccinia-Virus (VACV) belegt, welches nicht nur als Pocken-Impfstoff eingesetzt wird, sondern auch als onkolytisches Virus in der Tumorbiologie. VACV hat einen außergewöhnlichen Replikationszyklus, welcher ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle stattfindet. Somit ist die gesamte virale Genexpressionsmaschinerie völlig unabhängig von kernvermittelten Reaktionen des Wirts und somit auch aus Sicht der Grundlagenforschung von größtem Interesse. Die Schlüsselkomponente der viralen Genexpression ist die makromolekulare DNA-abhängige RNA Polymerase (vvrPO), deren Untereinheiten allesamt Virus-kodiert sind. Zwar wurden in den letzten Jahren Protokolle zur biochemischen und funktionellen Charakterisierung der vvrPO etabliert, ein detailliertes Wissen über deren Zusammenlagerung *in vivo* und die räumlichen und zeitlichen Interaktionen mit den Transkriptions- bzw. Prozessierungsfaktoren sind aber weitgehend unbekannt.

Diese Arbeit umfasst Untersuchungen zur strukturellen und funktionellen Charakterisierung der vvrPO und seiner assoziierten Faktoren. Grundlage hierfür war die Etablierung eines Reinigungsprotokolls mithilfe eines neu konstruierten rekombinanten VACV (GLV-1h439). Diese Strategie erlaubte es hoch-molekulare native vvrPO Komplexe zu isolieren. Ein transkriptions-inaktiver Komplex (Komplex I) mit einer kalkulierten Masse von 575 kDa bestand aus den acht Untereinheiten des vvrPO Holoenzym und den Polymerase-assoziierten Faktoren RAP94 und D6. Ein zweiter, transkriptionell aktiver Komplex (Komplex II) mit einer Masse von 803 kDa enthielt, neben dem Holoenzym der vvrPO, noch weitere Faktoren, die primär die Erkennung der DNA-Matrize und die Prozessierung der naszierenden RNA vermitteln. Hierbei handelt es sich um RAP94, das virale Capping Enzym bestehend aus den zwei Untereinheiten D1 und D12, A7 und dem Terminationsfaktor NPH I. Interessanterweise enthielt dieser Komplex zusätzlich mit E11 eine bislang unbekanntere weitere Protein-Komponente, sowie tRNA^{Gln} und tRNA^{Arg}. Der isolierte Komplex II ist daher ein Ribonukleoprotein (RNP).

Die Verfügbarkeit von hoch-reinen vvrPO Komplexen erlaubte es erstmals deren strukturelle Architektur zu untersuchen. Hierfür wurden drei experimentelle Ansätze, die klassische Röntgenstrukturanalyse, die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) und Quervernetzungsstudien miteinander kombiniert. Die Strukturen der Komplexe I und II

haben eine Auflösung von 11-12 Å, wobei auffällig war, dass beide eine markante strukturelle Ähnlichkeit zur eukaryotischen RNA Polymerase II aufwiesen. Darüber hinaus gelang es zusätzliche Bereiche im Komplex II zu definieren, welche die Polymerase-assoziierten Prozessierungsfaktoren beherbergen. Zudem konnte die atomare Struktur von E11, mittels Röntgenstrukturanalyse bei einer Auflösung von 1,9 Å, gelöst werden. Das E11 Protein besitzt ein neuartiges Faltungsmuster und weist einen intensiven Dimerisierungskontakt auf, welcher sich über vier β -Faltblätter ausbildet.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten legen die Grundlage für ein detailliertes Verständnis der räumlichen Organisation der viralen Transkriptionsmaschinerie. Darüber hinaus werden sie funktionelle Studien ermöglichen, welche die Rolle der einzelnen Proteine, sowie der tRNAs bei der mRNA Synthese klären helfen.

2 Summary

Poxviruses comprise a diverse family of complex DNA-genome viruses with great medical potential. This is exemplified by vaccinia virus, which not only served as a vaccine against smallpox but is also used as a promising tool in viral anti-cancer therapies.

A key feature that distinguishes the poxvirus family from other DNA viruses is their replication cycle, which is confined to the cytoplasm. This results in a high level of independence from the host cell, which supports transcription and replication events only in the nucleus. Accordingly, virus specific, rather than host cell enzymes mediate most processes including DNA replication and mRNA synthesis. The key component of viral gene expression is the DNA-dependent RNA polymerase (vvrPO), which constitutes the virus-encoded macromolecular machine ensuring viral mRNA synthesis. Although this enzyme has been studied in some details in the past years, neither its mode of assembly *in vivo* nor its spatio-temporal association with transcription and processing factors has been understood in detail.

In this thesis I present work that focuses on the structural and functional characterization of vvrPO and its associated factors. To gain insights into the structure and the assembly of the VACV transcription system we established an efficient purification protocol by generating recombinant virus strains expressing tagged subunits of vvrPO (GLV-1h439). These recombinant virus strains enabled the isolation of high molecular weight vvrPO complexes. Complex I, which was transcriptionally inactive *in vitro* displayed a calculated mass of about 575 kDa, consisted of eight subunits of the vvrPO holoenzym and two additional polymerase-associated factors termed RAP94 and D6. A second, transcriptionally active complex (complex II) with a mass of 803 kDa, was related to the first one. It consisted apart from the factors of the holoenzym already found in complex I additional factors that mediate primarily binding of the polymerase to its DNA template and the processing of nascent RNA. These factors comprise the viral capping enzyme (D1, D12), A7 and the termination factor NPH I. Interestingly, complex II contained in addition the viral protein E11, thus far not connected to viral transcription as well as tRNA^{Gln}, tRNA^{Arg}). Complex II is hence a ribonucleoprotein (RNP).

The availability of highly pure vvrPO complexes allowed for the first time to investigate their structure. To this end, three experimental approaches, the classic X-ray crystallography, cryo-electron microscopy (cryo-EM) and chemical crosslinking were combined. Structures of

both polymerase complexes were obtained at a resolution of 11-12 Å and revealed a striking structural similarity to eukaryotic RNA polymerase II. Moreover, it was possible to allocate positions in the structure of complex II that are likely to harbour the polymerase-associated processing factors. In addition we were able to solve atomic structure of E11 by X-ray crystallography at a resolution of 1.9 Å. Interestingly, the structure of E11 showed a novel folding pattern that forms a dimer, which is mostly composed of four β-sheets.

These studies provide the basis for a detailed investigation of the architecture of the viral transcriptional machinery. Furthermore, they pave the way for functional studies aimed at elucidating the function of individual proteins and tRNA in the generation of viral mRNA.

3 Einleitung

Unter einer Virusinfektion versteht man, das aktive oder passive Eindringen von Viren in einen Organismus und deren Vermehrung dort. Aufgrund ihrer geringen Größe sind Viren dem Menschen jedoch lange verborgen geblieben. Hinweise auf Viruserkrankungen, wie zum Beispiel den Pocken im alten China oder Ägypten, finden sich aber bereits in den frühesten Zeugnissen der Menschheitsgeschichte. Ebenso wurden Methoden zur Bekämpfung dieser Erkrankungen, wie die Impfung, lange vor der Entdeckung des ersten Virus praktiziert. Ursprünglich vermutete man „Gifte“ als Ursache von dem, was wir heute als Viruserkrankung kennen. Erst gegen Ende des 19. Jahrhunderts legten Tierversuche von Louis Pasteur ein krankheitsauslösendes, sich im Organismus vermehrendes Agens nahe, weshalb man von einem zellulären „Virus“ (lat. virus „Gift“ oder „Schleim“) sprach. Im Allgemeinen sind Viren infektiöse Einheiten mit einem Durchmesser von etwa 16 nm (Circoviren) bis über 300 nm (Pockenviren). Sie stellen keine eigenständige Zelle dar und besitzen auch keinen eigenen Stoffwechsel. Vielmehr sind Viren intrazelluläre Parasiten und prinzipiell darauf angewiesen, ihre RNA oder DNA Genome in einen geeigneten Wirt einzuschleusen und zu vermehren. Für einen optimalen Ablauf ihrer Vermehrung können sie zelluläre Prozesse nutzen, umsteuern und modifizieren. Durch die Erforschung der Viren und deren Replikation in Wirtszellen, konnten daher viele grundlegende Prozesse eukaryotischer Zellen auf molekularer Ebene aufgeklärt werden. So wurden zum Beispiel die „*split genes*“ und der Prozess des prä-mRNA-Spleißens bei den Adenoviren erstmalig beobachtet beziehungsweise beschrieben [1, 2]. Auch sind wichtige zellbiologische Erkenntnisse zum intrazellulären Transport durch die Analyse von Viren erhalten worden. Beispiele sind hier das erste Kernimportsignal (NLS) im großen T-Antigen von Simian-Virus 40 (SV40) und das erste Kernexportsignal (NES) im HIV1 Rev Protein [3, 4].

Auch aus medizinischer Sicht gewinnen die Viren zunehmend an Bedeutung. So basieren viele gentherapeutischer Verfahren u.a. auf der Verwendung von Adeno-assoziierten Viren (AAV's). Einige Viren infizieren und lysieren effizient solide Tumore und gelten daher als hoffnungsvolle Agentien für eine sogenannte onkolytische Virustherapie. Diese Technologie erlebte erst in den letzten Jahren eine Renaissance durch die Generation von „maßgeschneiderten“ Viren mit hoher Spezifität und geringer Pathogenität.

Besonders geeignet für die onkolytische Virotherapie erscheinen hier das attenuierte Herpes-simplex-Virus (HSV), das Adenovirus und das der Familie der Poxviridae (Pockenviren) zugehörige Vaccinia-Virus (VACV) [5-8]. Letzteres hat den Vorteil gegenüber anderen Viren, dass es sich ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Wirtszelle repliziert und sich daher nicht in das Wirtsgenom integriert [9]. Aus diesem Grund gewinnt das VACV in der Krebstherapie zunehmend an Bedeutung und wurde durch intensive, medizinische und molekularbiologische Studien, zum dem am besten charakterisierten Mitglied der Pockenvirus-Familie.

3.1 Pockenviren – Auslöser der Pockeninfektion bis zur Entdeckung eines Vakzins

Rückblickenden lassen sich bereits vor 3000 Jahren die ersten akuten und hochansteckenden Infektionskrankheiten nachweisen. So müssen im alten China, in Indien und auch in Ägypten immer wieder verheerende Epidemien der Pocken aufgetreten sein. Die Viruserkrankung wird durch Vertreter der Pockenviren (Poxviridae) ausgelöst. Diese Virus-Familie umfasst eine große Anzahl unterschiedlicher human- und tierpathogener Viren, die Infektionskrankheiten, sowohl bei Säugetieren und Vögeln, als auch bei Insekten verursachen. Die *Poxviridae* lassen sich aufgrund ihres Tropismus in zwei Unterfamilien einteilen. Die *Chordopoxvirinae* infizieren ausschließlich Wirbeltiere, während die *Entomopoxvirinae* Insekten befallen.

Ein prominenter Vertreter der *Chordopoxvirinae* ist das humanpathogene Variola-Virus, welches vor allem im 18. Jahrhundert Pocken-Epidemien verursachte und weltweit jährlich mehrere hunderttausende Todesopfer forderte. Eine Pockeninfektion kann zum einen durch Echte Pocken (*Variola major*), oder zum anderen durch Weiße Pocken (*Variola minor*) hervorgerufen werden. Die Letalitätsrate bei *Variola major* liegt bei 30-40 % und ist damit deutlich höher als bei *Variola minor*, die typischerweise bei unter 1 % liegt [10].

Edward Jenner gelang 1798 der Durchbruch in der Pocken-Prophylaxe, indem er die Immunisierung von Menschen mit einem der Kuh entstammenden Pockenvirus einführte. Menschen, die mit Kuhpocken infiziert wurden zeigten daraufhin einen milden Infektionsverlauf, welcher sich hauptsächlich auf Pocken an den Händen, sogenannte Melkerknoten, beschränkte [11]. Diese Menschen waren jedoch gegenüber späteren Infektionen mit dem hoch-pathogenen Variola-Virus immun. Konsequenterweise nannte er dieses Virus „Vaccinia-Virus“ (von lat. *vacca* „Kuh“), woraus im Laufe der Zeit der Begriff

„Vakzination“ entstand. Interessanterweise wurde erst 1939 aufgeklärt, dass es sich bei dem verwendeten Virus nicht um das Kuhpocken-Virus handelt, sondern um eine bis dato unbekannte Pockenvirus Form, die daraufhin als Vaccinia-Virus (VACV) bezeichnet wurde. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) initiierte 1958 ein weltweites Impfprogramm mit dem Ziel das Variola-Virus vollständig zu eliminieren, ein Ziel welches in der Tat 1980 erreicht wurde. Das humanpathogene Variola-Virus wird heute nur noch unter strengster Kontrolle am CDC (Center of Disease Control and Prevention) in Atlanta (USA) und dem staatlichen Forschungszentrum für Virologie und Biotechnologie „Vektor“ in Kolzowo (Novosibirsk, Russland) aufbewahrt.

Durch die Verwendung des VACVs bei der Vakzinierung von Menschen, etablierte sich das VACV als Modell für die Erforschung der *Poxviridae* und gehört bis heute zu den am besten untersuchten Viren überhaupt. Zusätzlich zu seiner Verwendung als Impfstoff, findet das Virus Anwendung in der Molekularbiologie als Vektor zur Genexpression rekombinanter Proteine, sowie zur Erforschung der angeborenen und adaptiven Immunantwort gegen Infektionskrankheiten.

3.1.1 Morphologie des Vaccinia-Virus

VACV gehört mit einem Durchmesser von 200-400 nm und einem doppelsträngigen 190 Kilobasen (kb) DNA Genom zu den größten bekannten Viren. Das reife intrazelluläre Virion (*intracellular mature vaccinia virion, IMV*) hat typischerweise eine ovale bis ziegelsteinähnliche Gestalt (Abbildung 1) [10, 12]. Das virale Genom codiert für ca. 200 strukturelle und regulatorische Proteine, die durch beide DNA Stränge codiert werden. Die gesamte DNA befindet sich in einem hantelförmigen Kernbereich (*Core*) des Virus, welcher von zwei bikonkaven Lateralkörpern umgeben ist (Abbildung 1A). Die Enden der doppelsträngigen viralen DNA sind über eine 5'-3' Phosphodiesterbindung geschlossen und so von Exonukleasen geschützt. Die Genomtermini sind darüber hinaus durch flankierende tandemartig angeordnete Sequenzwiederholungen (*inverted terminal repeat, ITR*) charakterisiert, welche identisch und zueinander in gegenläufiger Ausrichtung angeordnet sind (Abbildung 1B) [10]. Im Infektionsverlauf bilden sich zwei Arten von infektiösen Partikeln, welche sich sowohl in ihrer Struktur als auch in ihrer Funktion unterscheiden.

Das in Abbildung 1 gezeigte *IMV* verfügt über eine Hüllmembran, welche aus einer Lipiddoppelschicht besteht und durch die Lyse einer infizierten Zelle freigesetzt wird. Durch seine außergewöhnliche Stabilität garantiert es die Wirt-zu-Wirt Transmission.

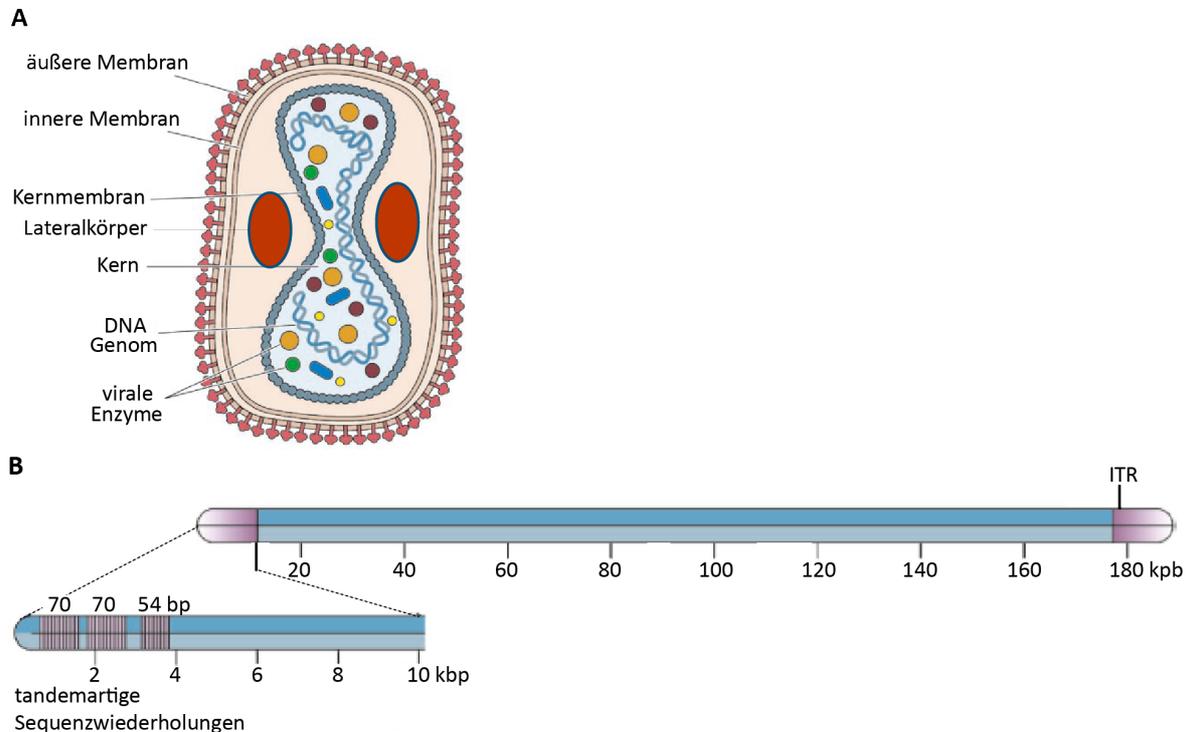


Abbildung 1: Aufbau eines *intracellular mature vaccinia virion (IMV)* Partikels

Intrazelluläre Darstellung eines Pockenviruspartikels im Querschnitt. Im *Core* befindet sich das virale Genom mit assoziierten Virusproteinen. Das *Core* und die Lateralkörper sind mit einer Lipiddoppelschicht umgeben (A). Das Virusgenom besteht aus ungefähr 190 kb mit tandemartig angeordneten Sequenzwiederholungen (*ITR*) an den Enden (B). Abbildung wurde adaptiert und modifiziert von [10].

Im Gegensatz zum *IMV* enthält das *extracellular enveloped vaccinia virion (EEV)* eine zusätzliche Membran, die durch eine Fusion des *IMV* mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle entsteht und im Vergleich zur inneren Hüllmembran äußerst fragil ist [10, 12]. Das *EEV* wird nicht durch die Lyse der Wirtszelle freigesetzt, sondern von der Zellmembran abgeschnürt und übernimmt die Infektion benachbarter Zellen.

3.1.2 Replikationszyklus des Vaccinia-Virus

Der Vermehrungszyklus des VACV beginnt mit dessen Eintritt in die Zelle, welcher über einen virus-spezifischen makropinozytotischen Mechanismus abläuft (Abbildung 2, Schritt 1) [13-

15]. Bei den *IMV* Partikeln wird dieser Prozess durch Phosphatidylserinreste (PS) in der viralen Membran ausgelöst [16]. Hierbei ermöglicht das Brückenmolekül Annexin A5 die Bindung zwischen PS und dem PS-Rezeptor, der Tyrosinkinase AXL, auf der Wirtsmembran [17, 18]. Die für das Einschleusen des *EEV* Partikels benötigten zellulären Bindungspartner (vermutlich endozytotische Rezeptoren und virale Hüll-Proteine), welche diesen Prozess vermitteln, sind bislang noch nicht bekannt. Nach der Adhäsion mit der Wirtszelle fusionieren sowohl *EEV* als auch *IMV* über ihre jeweilige äußere Virusmembran mit der Membran der Makropinosomen, so dass das Viruscore ins Zytoplasma der Wirtszelle gelangt. Diese Fusion ist von einem niedrigen pH-Wert abhängig, was auf einen Maturationsprozess der Makropinosomen während dem Eintritt des Virus in die Zelle hindeutet [19-22]. Es folgt eine „Aktivierung“ des Viruscores, welche durch eine drastische morphologische Veränderung der äußeren *Core*-Struktur von bikonkav zu oval sichtbar wird, und die ersten Schritte der viralen Genexpression einleitet [23, 24].

Wie bei vielen Viren zu beobachten, reguliert auch VACV die Expression seiner Gene in einer zeitlich genau definierten Reihenfolge. Je nach Zeitpunkt der Transkription lassen sich daher frühe, mittlere und späte Genklassen unterscheiden. Die Expression jeder Genklasse wird durch einen definierten Transkriptionsprozess gewährleistet, der sowohl spezifische Transkriptionsfaktoren, als auch Genklassen-definierende Promotoren einschließt. Bereits unmittelbar nach Eintritt des Virus in die Zelle, beginnt noch im intakten Viruscore die Transkription der frühen Gene (Schritt 2) [25, 26]. Dies ist möglich, da sämtliche Faktoren für die Expression der frühen Gene mit dem Viruscore in die infizierte Wirtszelle eingebracht werden. Nach der Synthese der frühen mRNAs werden diese durch Poren in der *Core*-Membran ins Zytoplasma der Zelle transferiert und von der wirtseigenen Translationsmaschinerie in Proteine umgewandelt (Schritt 3) [10]. Ungefähr die Hälfte dieser in der frühen Phase gebildeten Proteine werden aus der Zelle sezerniert um eine Immunantwort des Wirtes zu unterdrücken und weitere immunmodulatorische Funktionen zu übernehmen (Schritt 4). Andere virale Faktoren aktivieren hingegen den Entmantelungsprozess des viralen Genoms und leiten nach nur wenigen Stunden die Replikation ein (Schritt 5) [27-32]. Diese, wie auch die spätere Zusammenlagerung neuer Viruspartikel, findet an membranösen Strukturen, den sogenannten Virosomen statt (Schritt 6-7) [33]. Anschließend an die DNA Replikation findet die Expression der mittleren (Schritt 8) und späten Gene statt [9]. Die mittleren Gene codieren größtenteils für

regulatorische Proteine, welche u.a. für die Transkription der späten Genklassen von essentieller Bedeutung sind (Schritt 9-10). Die späten Gene wiederum codieren überwiegend für virale Strukturproteine [9]. Diese werden in den Virosomen für den Zusammenbau neuer infektiöser Viruspartikel und deren Morphogenese benötigt [10].

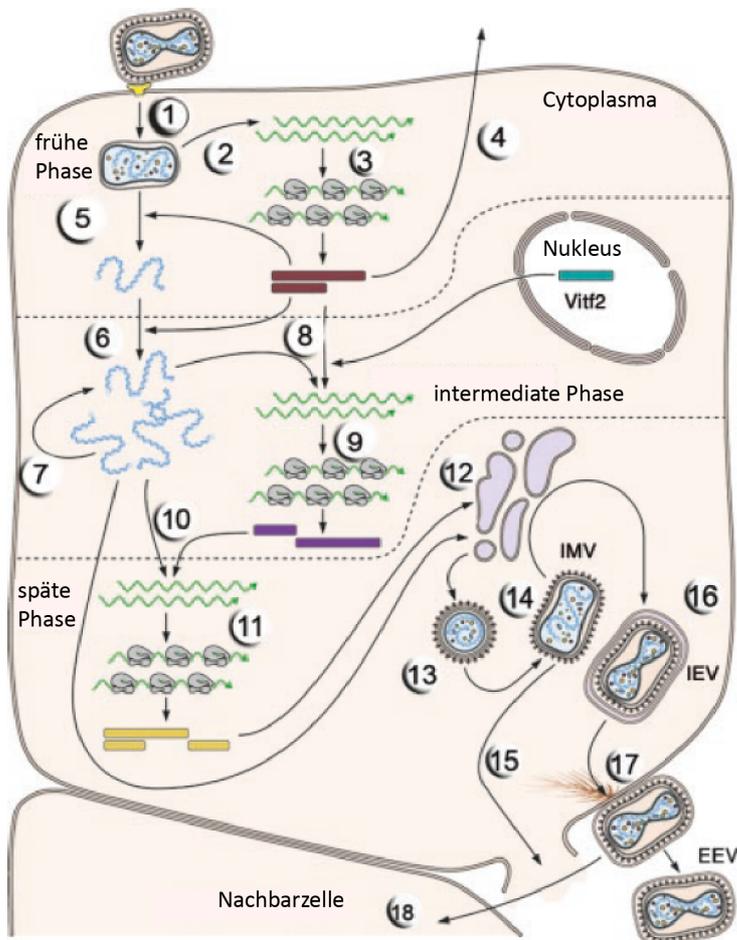


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des VACV

Die virale Infektion kann entweder durch das IMV (*intracellular mature vaccinia virion*) oder das EEV (*extracellular enveloped vaccinia virion*) erfolgen. Die Replikation des VACV erfolgt in drei Phasen (frühe, mittlere, späte Phase), gefolgt von der Morphogenese der neuen Viruspartikel. Das IMV wird zum Golgi-Apparat transportiert und erhält eine weitere Hüllmembran. Die entstandenen IEV (*intracellular enveloped vaccinia virion*) Partikel können mit der Zytoplasmamembran fusionieren und bilden das CEV (*cell-associated vaccinia virion*), welches entweder durch Aktinschwänze zur Nachbarzelle transportiert werden kann oder von der Zelle als EEV abschnürt.

Zusätzlich entstehen in der späten Phase Proteine, welche zusammen mit der viralen DNA in neue Viruspartikel verpackt werden, um einen neuen Infektionszyklus zu initiieren (Schritt 11). Im Verlauf der Virus-Bildung entsteht aus zytosolischen Membranelementen um das Genom herum ein sphärisches Vesikel (Schritt 12), welches im Folgenden zu einem ziegelsteinförmigen, infektiösen *IMV* Partikel reift (Schritt 13-14) [34, 35]. Neu gebildete *IMV* Partikel können durch die Lyse der Wirtszelle, ca. 72 Stunden nach Infektion freigesetzt werden (Schritt 15). Nur ein kleiner Teil der fertig assemblierten *IMV* Partikel werden hingegen durch Fusion mit der Zellmembran zum *EEV* [36]. Bei diesem Vorgang werden die *IMV* über Mikrotubuli zum Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) bzw. den frühen Endosomen transportiert, um sich dort eine weitere Membranhülle anzueignen (Schritt 16) [37-41]. Das entstandene *intracellular enveloped vaccinia virion (IEV)* transloziert daraufhin über Mikrotubuli zur Zytoplasmamembran, um mit dieser zu fusionieren und das *cell-associated vaccinia virion (CEV)* zu bilden (Schritt 17) [42]. Für die Virusverbreitung kann das *CEV* zum einen die Polymerisation von Aktinschwänzen induzieren, welche den direkten Transfer zur Nachbarzelle unterstützen (Schritt 18) [43, 44]. Alternativ kann sich das *CEV* weiter zu einem *EEV* entwickeln, indem es sich von der Plasmamembran löst um auch weiter entfernte Zellen zu infizieren (Schritt 19). Ob jedoch ein Virion als *EEV* Partikel freigesetzt oder eben als *CEV* zurückgehalten wird von der jeweiligen Wirtszelle beeinflusst [45]. In dieser zweiten und wesentlich schnelleren Infektionsvariante, welche auch als Superinfektion-Repulsion bezeichnet wird, verlässt ein reifer *EEV* Viruspartikel binnen 6 Stunden die infizierte Zelle [46].

3.2 Die Genexpression des VACV – ein zeitlich reguliertes Expressionssystem

Die ausschließlich zytoplasmatische Replikation von Pockenviren machen diese für Genexpressionsstudien äußerst interessant, da sie ohne die nukleären Transkriptions- bzw. Prozessierungsfaktoren der Wirtszelle auskommen müssen. Die Pockenviren haben daher ihre eigene Genexpressionsmaschinerie entwickelt, welche die viralen Gene im Rahmen der Replikation in einem zeitlich koordinierten Prozess abliest. Die Expression der viralen Gene wird durch definierte Promotoren in *cis* ermöglicht, die mit spezifischen viralen Transkriptionsfaktoren und der Virus-kodierten DNA-abhängigen RNA Polymerase (vVRPO) in der Genexpression kooperieren. Die Produkte der vVRPO sind mRNAs, die am 5'-Ende eine m⁷G-Capstruktur und am 3'-Ende einen Poly(A)-Schwanz aufweisen [9]. Sie sind daher

strukturell nicht von der Wirtszell-mRNA zu unterscheiden und lassen sich problemlos von der zellulären Translationsmaschinerie ablesen.

Die vvrPO ist eine bemerkenswert komplexe, molekulare Maschine mit einer Gesamtmasse von über 500 kDa, welche generell für die virale Genexpression verantwortlich ist. Das Holoenzym besteht aus acht Untereinheiten (RPOs), die entsprechend ihrer molekularen Masse als RPO147, RPO133, RPO35, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18 und RPO7 bezeichnet werden (Abbildung 3) [47-58].

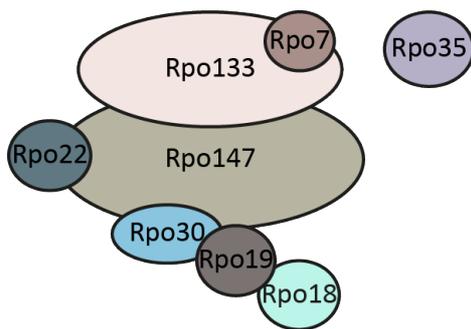


Abbildung 3: Hypothetischer Aufbau der vvrPO

Das Holoenzym der RNA Polymerase besteht aus acht Untereinheiten: RPO147, RPO133, RPO35, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18 und RPO7. Abbildung wurde adaptiert und modifiziert von [58].

Das Holoenzym transkribiert, sowohl die mittleren, als auch späten Genklassen. Für die Synthese der frühen mRNAs ist hingegen eine weitere Untereinheit, das Polymerase-assoziierte Protein RAP94 (*RNA polymerase-associated protein 94 kilodalton*) notwendig [50, 59]. Im Gegensatz zu allen anderen Untereinheiten wird RAP94 ausschließlich in der späten Phase gebildet. Hierdurch wird sichergestellt, dass RAP94 zusammen mit dem Holoenzym der vvrPO in neu gebildete Viruspartikel verpackt werden kann und somit für die Synthese der frühen mRNAs bei einer erneuten Infektionsrunde zur Verfügung steht. Interessanterweise zeigen alle Untereinheiten, mit Ausnahme von RAP94 und RPO35, limitierte Homologie zu Untereinheiten der zellulären RNA Polymerase II (Pol II) (Tabelle 1). Besonders die beiden großen viralen Untereinheiten RPO147 und RPO133 weisen bis zu 20 % Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz zu den beiden großen Pol II Untereinheiten, RPB1 und RPB2, auf und legen somit eine evolutionäre Verwandtschaft nahe [47, 48, 58]. Es ist wahrscheinlich, dass RPO147 und RPO133 das katalytische Zentrum der vvrPO bilden. Im Gegensatz zur zellulären Pol II, welche eine C-terminale Domäne (CTD) in der RPB1 Untereinheit verwendet, um die Regulation der ko-transkriptionellen mRNA Reifung und Prozessierung zu steuern, fehlt diese Domäne in der korrespondierenden Untereinheit der viralen Polymerase.

Tabelle 1: HHpred Homologie Suchergebnisse zwischen vvRPO und RNA Polymerase II.

Alle Untereinheiten der vvRPO (RPO147, RPO133, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18, RPO7), mit Ausnahme von RPO35 und RAP94 zeigen eine limitierte Sequenzhomologie zu Untereinheiten der zellulären Pol II. Tabelle wurde adaptiert und modifiziert von [58]

vvRPO	RNA Polymerase II	Identität (%)
Rpo147	RPB1	20
Rpo133	RPB2	22
Rpo30	TFIIS	16
Rpo22	RPB5	21
Rpo19	RPB6	20
Rpo18	RPB7	12
Rpo7	RPB10	27

3.2.1 Die frühe Genexpression beruht auf dem Holoenzym der vvRPO zusammen mit RAP94

Frühe, mittlere und späte Gene des VACV sind durch eine charakteristische Promotorstruktur gekennzeichnet, welche durch die Transkriptionsmaschinerie erkannt wird und dies zum Ablesen der jeweiligen Genklasse führt. Grundsätzlich besitzen alle drei Genklassen kurze Konsensussequenzen, welche sich sowohl stromaufwärts, als auch stromabwärts vom Transkriptionsstart befinden und die Transkription in cis regulieren [9]. Für die Initiierung der frühen Transkription wird ein minimaler Satz an Proteinen benötigt, der neben dem Holoenzym lediglich die viralen Faktoren RAP94 und *VETF* (*vaccina virus early transcription factor*) einschließt [60]. *VETF* ist ein Heterodimer, bestehend aus den viralen Genprodukten A7L (82 kDa) und D6R (77 kDa) und ist primär für die Rekrutierung des Holoenzym an die DNA von essentieller Bedeutung [61, 62]. Der Rekrutierungsprozess an die DNA wird durch die initiale Interaktion der A7 und D6 Untereinheiten von *VETF* mit spezifischen Promotorsequenzen flankierend zum Transkriptionsstart eingeleitet (Abbildung 4) [63-65]. Dieser Promotor-Polymerase-Komplex ähnelt funktionell dem Prä-Initiationskomplex der zellulären Pol II, da er die Transkription noch nicht erlaubt.

Die Rekrutierung der vvRPO an den frühen Promotor wird über die Interaktion von *VETF* mit RAP94 sichergestellt [66]. Die darauffolgende Anlagerung der vvRPO an die DNA findet durch die ATP-getriebene Dissoziation von *VETF* statt, welche durch dessen katalytische Untereinheit D6 gewährleistet wird [67]. Für die folgenden Elongations- und Terminations-

Schritte werden, ebenso wie für die Prozessierung der naszierenden viralen mRNA, zusätzliche Enzyme benötigt. Hierzu gehört das Capping-Enzym *VTF* (*vaccinia virus termination factor*), *NPH I* (*nucleoside phosphohydrolyse I*) und die Poly(A)-Polymerase, wobei ein jeder dieser Faktoren Virus-kodiert ist (Abbildung 4) [68-72].

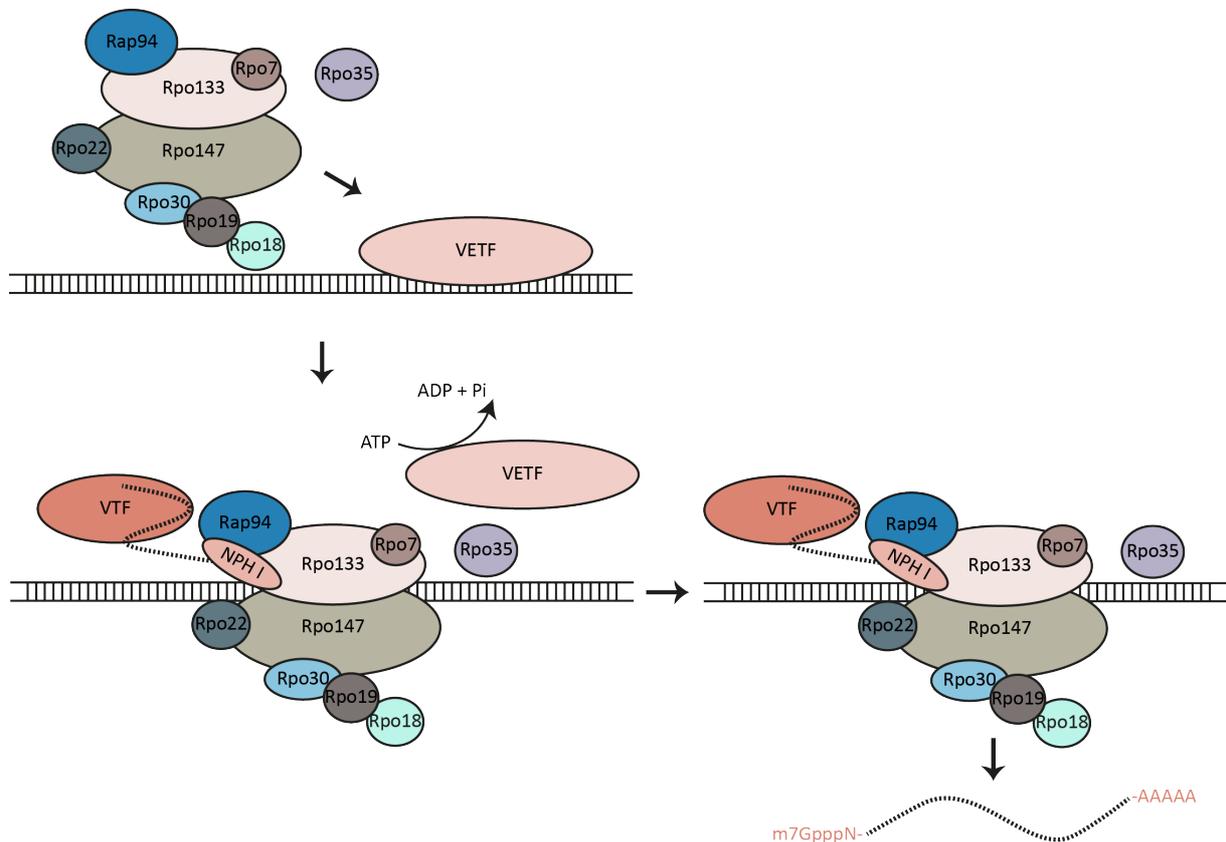


Abbildung 4: Modell der frühen Transkription mit mRNA Prozessierung

Der Transkriptionsfaktor VETF (*vaccinia virus early transcription factor*) bindet spezifisch an die Promotorsequenz eines frühen viralen Promotors und rekrutiert über die Interaktion mit RAP94 die vvrPO an die Startstelle der Transkription. Nach ATP Hydrolyse durch die kleine Untereinheit D6 von VETF dissoziiert VETF von der DNA und die Synthese früher mRNA startet. Für die Termination der frühen Transkription werden zusätzlich VTF (*vaccinia virus termination factor*) und NPH I (*nucleoside triphosphatase I*) benötigt. VTF fungiert außerdem als Capping-Enzym und fügt ein m⁷G-Cap ans 5'-Ende an. Für die Modifikation des 3'-Ende ist die Virus-kodierte Poly(A)-Polymerase verantwortlich.

Zusammen mit NPH I stellt VTF den primären Terminationsfaktor der frühen viralen Transkription dar und bildet zusammen mit der vvrPO einen sogenannten ternären Komplex [73]. Innerhalb dieses Komplexes interagiert NPH I reversibel mit RAP94, wobei die Interaktion eine essentielle Rolle im Terminationsprozess darstellt [74]. Das Ende der Transkription ist durch die Konsensussequenz U₅NU in *cis* festgelegt, die sich ca. 25-50

Nukleotide vor dem eigentlichen Terminationspunkt befindet [75, 76]. Das Terminationssignal wird durch VTF gebunden, woraufhin es zu einem Elongationsstopp und zu einer vorwärts-gerichteten Translokation der ATPase NPH I in 5' Richtung kommt [77, 78]. Die Translokation bewirkt eine Verkürzung des DNA/RNA-Hybrids, was zur Freisetzung der naszierenden RNA und der Dissoziation der Polymerase vom DNA Template führt [77]. Wie die Transkription mit der Termination, dem Capping und der Polyadenylierung der mRNA koordiniert wird, ist noch weitgehend unverstanden.

Sämtliche Prozessierungsschritte erfolgen bei zellulären mRNAs ko-transkriptionell, wobei die C-terminale Domäne der Pol II-Untereinheit RPB1 als Bindungsplattform für modifizierende Enzyme während der Transkription dient. So kommt es durch eine Phosphorylierung von Serin 5 in der CTD zur Rekrutierung des Capping-Enzyms und durch eine Phosphorylierung von Serin 2 zur Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase. Durch die Bindung des Capping-Enzyms wird anschließend im Rahmen der Prozessierung ein m⁷G-Cap an das 5'-Ende der mRNA angefügt. Die CTD bzw. eine CTD-äquivalente Domäne ist jedoch bei der vVRPO nicht zu erkennen, sodass bislang unklar ist, ob die Prozessierung ko- oder post-transkriptional erfolgt. Bisher konnte ausschließlich durch *in vitro* Transkriptionsstudien gezeigt werden, dass ab einer mRNA Länge von ca. 31 Nukleotiden sich das Capping-Enzym VTF an das 5'-Ende der RNA anlagert und die Bildung des m⁷G-Caps katalysiert. VTF besitzt eine heterodimere Struktur aus den Genprodukten D1R (97 kDa) und D12L (33 kDa) [68, 69, 79]. Die ersten beiden Schritte der Capping-Reaktion beinhalten die Hydrolyse des Triphosphats am 5'-Ende der naszierenden RNA zu einem Diphosphat durch die 5'-Triphosphatase (TPase)-Aktivität des Enzyms und die anschließende Übertragung eines Guanosinmonophosphates (GMP) mittels RNA-Guanylyltransferaseaktivität (GTase) [80]. Die Domänen, welche für beide Prozesse verantwortlich sind, befinden sich in der D1 Untereinheit [81]. Die Konvertierung des Caps in ein m⁷G-Cap durch eine RNA(guanin-N7)-methyltransferase (MTase) hingegen wird durch die heterodimere Interaktion von D1 mit D12 katalysiert. Bis heute ist jedoch unklar wie es zur Rekrutierung des Capping-Enzyms zur vVRPO kommt.

Das virale Transkript enthält, analog zum zur zellulären mRNA, einen Poly(A)-Schwanz. Dieser wird durch die Virus-kodierte Poly(A)-Polymerase, bestehend aus den Untereinheiten E1 (VP55, 55 kDa) und J3 (VP39, 39 kDa) generiert [82, 83]. Die katalytische Aktivität der Poly(A)-Polymerase liegt bei E1, wobei sich die kleinere Untereinheit stabilisierend auf die

größere Untereinheit auswirkt und über einen unbekanntes Mechanismus die Länge des Poly(A)-Schwanzes bestimmt [84]. Äquivalent wie beim viralen Capping-Enzym ist nicht bekannt, wie es zur Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase kommt. Im Virion liegt J3R in einem fünffach molaren Überschuss über E1L vor, so dass J3R sowohl als Monomer aber auch als Heterodimer vorliegt [82]. Das Monomer von J3R ist eine Methyltransferase und erfüllt eine weitere modifizierende Funktion, nämlich den letzten Schritt der Capping-Reaktion. Hierbei wird durch Methylierung der +1 Ribose des Transkripts die $m^7G(5')pppN$ Cap-Struktur (Cap 0) zu einer $m^7G(5')pppN_m$ Cap-Struktur (Cap 1) konvertiert [83]. Dieser Prozess gewährleistet, dass virale mRNAs durch die wirtseigene cap-abhängige Translationsinitiation erkannt und abgelesen werden. Die gereiften frühen viralen Transkripte werden aus dem Viruscore durch Poren in das Zytoplasma ausgeschleust und dort durch die wirtseigene Translationsmaschinerie abgelesen.

3.2.2 Das Holoenzym der vRPO synthetisiert postreplikative mRNAs

Die DNA Replikation des VACV stellt eine Grenze zwischen der frühen und den beiden postreplikativen (mittleren und späten) Transkriptionsstadien dar. Dementsprechend wird die vRPO, welche für die Transkription von mittleren und späten Genen verantwortlich ist, *de novo* synthetisiert.

Sowohl für die mittlere, als auch für die späte Transkription existieren unterschiedliche Sets aus viralen Promotoren und Transkriptionsfaktoren, welche für die Initiation der Transkription verantwortlich sind. Die Transkriptionsfaktoren, sowohl der mittleren Transkription, die *vaccinia intermediate transcription factors (VITF)*, als auch der späten Transkription, die *vaccinia late transcription factors (VLTF)*, werden ebenso wie die vRPO *de novo* synthetisiert. Bis heute sind nur einige wenige Transkriptions- und Prozessierungsfaktoren der beiden Genklassen identifiziert, beziehungsweise einer genauen Funktion im Transkriptionsprozess zugeordnet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass mittlere und späte mRNAs, ebenso wie die frühen Transkripte ein 5'-terminales m^7G -Cap und einen 3'-Poly(A)-Schwanz besitzen. Der Unterschied besteht allerdings in einer erheblichen Heterogenität der 3'-Enden der mittleren und späten Genklassen. Im Gegensatz zu frühen Genen existiert kein spezifisches Terminationssignal, wodurch die 3'-Enden durch eine Virus-kodierte Endoribonuklease an sogenannten AX-Elementen generiert werden (die Terminologie AX steht für eine Erkennungsstelle der Restriktionsenzyme Alal/XbaI). Die 3'-

Enden lassen sich dann durch die Poly(A)-Polymerase äquivalent zu den frühen Transkripten prozessieren.

3.3 Problemstellung und Konzeption

Unter den DNA-abhängigen RNA Polymerasen stellt die VACV RNA Polymerase (vVRPO) eine Besonderheit dar, da sie ausschließlich im Zytosol der infizierten Zelle aktiv ist und im Gegensatz zu anderen viralen Polymerasen einen sehr komplexen Aufbau hat. Darüber hinaus muss die virale Transkriptionsmaschinerie ohne Beteiligung von wirtseigenen Transkriptionsfaktoren sicher stellen, dass die Transkripte adäquat prozessiert und damit von der zellulären Translationsmaschinerie in Proteine umgewandelt werden können.

Wie diese Herausforderungen vom Virus gelöst werden, ist bislang nur wenig untersucht und kann im Detail nur durch eine struktur-basierte Funktionsanalyse verstanden werden. Das Ziel dieser Arbeit war es daher, die vVRPO nativ aufzureinigen und sowohl biochemisch als auch strukturell zu untersuchen. Dieses Vorhaben lässt sich durch die Konstruktion von rekombinanten Vaccinia-Viren (rVACV) realisieren, bei denen einzelne vVRPO Einheiten mit Affinitäts-Tags versehen werden, die eine native Aufreinigung erlauben.

Die durch Infektion mit rVACV's erhaltenen affinitätsgereinigten Polymerase-Komplexes sollen durch klassische biochemischen Strategien und Massenspektrometrie detailliert charakterisiert werden. Hierbei steht sowohl die Zusammensetzung der Komplexe als auch ihre enzymatische Aktivität (Transkription, Capping, Polyadenylierung etc.) im Vordergrund. Die Verfügbarkeit von hoch-reinen Polymerase-Komplexen sollte es dann auch möglich machen, erste strukturelle Untersuchungen durchzuführen. Einzelne Polymerase-assoziierte Faktoren können hierbei durch die Röntgenstrukturanalyse, größere Einheiten hingegen durch die Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) untersucht werden.

Es besteht die Hoffnung, durch diese interdisziplinäre Herangehensweise einen detaillierten Einblick in die zytosolische Genexpressionsmaschinerie des VACV zu erhalten und dessen evolutionäre Verwandtschaft zur zellulären Pol II zu verstehen.

4 Ergebnisse

Eine einzigartige Eigenschaft aller Poxviridae ist deren ungewöhnlicher Replikationszyklus, der ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle stattfindet. Da die Transkription und Replikation der Wirtszelle rein nukleäre Vorgänge darstellen, ist das Virus auf eigene Enzyme angewiesen, die sowohl die virale Transkription übernehmen, als auch die Replikation steuern. Konsequenterweise kodiert das VACV und alle anderen Mitglieder der Poxviridae diese Enzyme im eigenen Genom und ermöglicht somit eine zytosolische Genexpression.

Im Rahmen dieser Arbeit möchte ich die Struktur und Funktion der vVRPO und seiner assoziierten Prozessierungsfaktoren untersuchen. Hierbei handelt es sich um eine makromolekulare Maschinerie aus nicht weniger als acht „Core“-Einheiten, die für die gesamte Genexpression des Virus verantwortlich ist. Im ersten Teil der Arbeit wurde der Fokus auf die Etablierung eines adäquaten Aufreinigungssystems für die vVRPO und seiner interagierenden Faktoren gerichtet. Hierbei wurde besonderer Wert auf die Identifikation und damit die biochemische und strukturelle Charakterisierung etwaiger Interaktionspartner gelegt. Im zweiten Teil meiner Arbeit stand die strukturelle Analyse von isolierten vVRPO-Komplexen und die Untersuchung von Interaktionen zwischen der vVRPO und den mRNA Prozessierungsfaktoren im Vordergrund.

4.1 *In vitro* Charakterisierung des rekombinanten Virus GLV-1h439

Für die detaillierte strukturelle und funktionelle Untersuchung der VACV Genexpressionsmaschinerie ist ein geeignetes natives Aufreinigungsprotokoll für die vVRPO unerlässlich. Die rekombinante Herstellung der vVRPO in bakteriellen Expressionssystemen erwies sich als nicht praktikabel, da sowohl die Expression von Einzelkomponenten, als auch die Ko-Expression von mehreren interagierenden Einheiten zu unlöslichen Aggregaten führte (Daten nicht gezeigt). Als Alternative wurde daher in enger Kooperation mit der Genelux Cooperation (San Diego, USA) die Aufreinigung der vVRPO aus rekombinanten VACV (rVACV) entwickelt. Diese Strategie basiert auf der Herstellung eines rVACV Stamms (GLV-1h439), welcher eine Hemagglutinin/FLAG-getaggte (HA/FLAG-getaggte) vVRPO Untereinheit RPO133 exprimiert. Dieses Virus wurde durch Insertion eines DNA-Fragments, welches für einen HA/FLAG-Tag kodiert, in den A24R Genlokus des Parentalviruses GLV-1h68 erhalten

(siehe 6.1.11). Die Tags sollten die Aufreinigung einer endogenen vvrPO über infizierten Zellextrakt und die anschließende native Elution dieser mittels FLAG Peptid erlauben.

Zunächst stellte sich jedoch die Frage, ob die eingefügten Tags die Replikationsfähigkeit des Virus beeinflussen. Die Replikationskompetenz des rVACV GLV-1h439 wurde mit zwei unterschiedlichen, immunbiologische und zellbiologische Methoden untersucht. Zum einen kann die Infektion der Zelle über das Markergens *RUC-GFP*, welches bereits im Parentalvirus vorhanden war, durch Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Zum anderen erlaubt ein Plaque-basiertes Replikationsassay (siehe 6.2.6.2) die Aussagen über die Effizienz der Replikationsfähigkeit von GLV-1h439 im direkten Vergleich zum Parentalvirus GLV-1h68. Für die Analyse der Infektion über Fluoreszenzmikroskopie wurden A549 Zellen bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % mit dem rVACV GLV-1h439 infiziert und nach einer Inkubation von 24 h mit Formaldehyd fixiert. Die Virusinfektion wurde dann über die Detektion des Virus-kodierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in der Mikroskopie untersucht (Abbildung 5A).

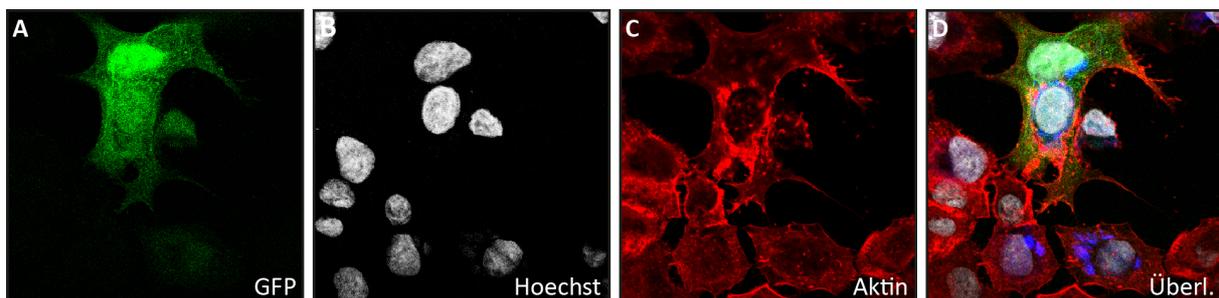


Abbildung 5: Infektion von A549 Zellen mit dem rVACV GLV-1h439

Fluoreszenzmikroskopieaufnahmen nach Infektion von A549 Zellen mit dem rVACV GLV-1h439 (MOI 0,1, 24 h). (A) Visualisierung des Markergens *RUC-GFP* (B-C) Detektion der Zellkerne mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Hoechst und Visualisierung der Aktinfilamente durch Phalloidin-Tetramethylrhodamin B (D) Überlagerung von A-C.

Wie aus der Expression von GFP in den Zellen geschlossen werden konnte, war GLV-1h439 prinzipiell in der Lage Zellen zu infizieren. Das Virus-kodierte GFP zeigte zwar an, dass die entsprechenden Zellen infiziert waren, nicht jedoch die intrazelluläre Lokalisation des Virus. Die Anfärbung des Zytoskeletts mit Phalloidin-Tetramethylrhodamin B und des Zellkerns mit Hoechst illustrierte die Integrität der Zelle zum Untersuchungszeitpunkt (Abbildung 5B-C).

Als nächstes wurde getestet, ob das Fusions-Tag an RPO133 die Replikationseffizienz des rVACV beeinflusst. Hierfür wurde die Replikation von GLV-1h439, im Vergleich zu seinem Parentalvirus GLV-1h68, mittels Plaque-basierten Replikationsassay untersucht. Um für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche gleichbleibende Replikations- und Infektionsbedingungen zu schaffen, wurden HeLa S3 Zellen verwendet. Diese Zellen wachsen, sowohl adhären, als auch in Suspension und können daher auch für Aufreinigungen im präparativen Maßstab verwendet werden.

Für den Replikationsassay wurde isolierter GLV-1h439 und GLV-1h68 mit einer MOI von 1 auf HeLa S3 Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 2, 24, 48 und 72 Stunden inkubiert und der Virustiter, sowohl in den Zellen, als auch im Kulturüberstand mittels Plaque Assay (siehe 6.2.6.3) bestimmt (Abbildung 6).

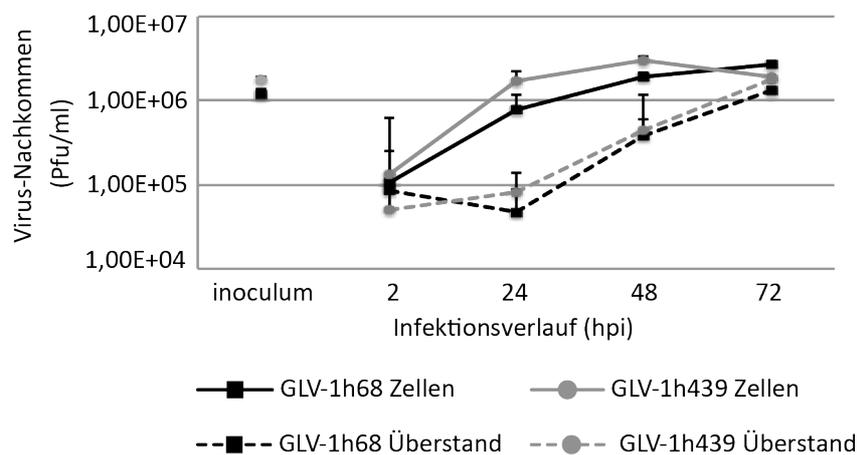


Abbildung 6: Quantifizierung der viralen Partikel in GLV-439 und GLV-1h68 in HeLa S3 Zellen

Die Infektion von adhären HeLa S3 Zellen erfolgte durch GLV-1h439 und GLV-1h68 mit einer MOI von 1 bei Erreichen einer 100%igen Konfluenz. Die viralen Titer Zell-assoziiierter Partikel (durchgezogene Linie) sowie durch Lyse in den Überstand freigesetzter Partikel (gestrichelte Linie), wurden mittels Standard Plaque Assay nach 2, 24, 48, 72 hpi ermittelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, wodurch die Konzentrationen den Mittelwerten in Pfu/ml mit einer Standardabweichung entsprechen (n=3).

Die Auswertung der Wachstumskurve anhand eines Plaque-Assay erfolgte durch die Infektion der für diese Methode standardisierten CV-1 Zelllinie bei einer Konfluenz von 90% mittels entnommener Proben. Die Ausbreitung der Viruspartikel wurde nach einer Stunde, durch die Zugabe von Carboxymethylcellulose-Medium (CMC-Medium), gestoppt und es entsteht so die Möglichkeit aufgrund der Anzahl an gebildeten Plaques den Virustiter zu errechnen. Sowohl in den Zellen, als auch im Überstand lässt sich ein Anstieg des Virustiters

und damit der infektiösen Viruspartikel über das Virustiter-Niveau des Inoculums erkennen. Wie die Infektionsverläufe in Abbildung 6 zeigen, konnten keine signifikanten Differenzen zwischen der Replikationsfähigkeit von GLV-1h439 und dem Parentalvirus GLV-1h68 festgestellt werden. Eine nahezu identische Wachstumskurve konnte für einen rVACV (GLV-1h440) erhalten werden, der einen identischen Tag am N-Terminus von A24R aufweist (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass sich beide rVACV bezüglich ihrer Replikationseffizienz nicht vom Parentalvirus unterscheiden und daher für die folgenden biochemischen Experimente geeignet sind.

4.2 Aufreinigung der vvRPO über rekombinante Vaccinia-Viren

Die Verfügbarkeit von Replikations-kompetenten rVACV ermöglichte nun erstmals, die vvRPO und potentielle Interaktoren nativ zu isolieren. In einem ersten Experiment wurde zunächst getestet, ob die Affinität-Tags an den RPO Untereinheiten zugänglich sind und daher eine Aufreinigung über einen α -FLAG Antikörper erlauben. Hierzu wurden HeLa S3 Zellen bei einer Konfluenz von 100 % mit den rVACV GLV-1h439, GLV-1h440, GLV-1h68 mit einer MOI von 1 infiziert. Extrakte von diesen Virus-infizierten Zellen konnten dann für eine Immunpräzipitation (IP) mit α -FLAG-gekoppelter Agarose verwendet werden. Parallel hierzu wurde eine Kontrollimmunpräzipitation mittels uninfizierter und GLV-1h68 infizierter HeLa S3 Zellen durchgeführt. Sowohl Proben des infizierten Zellextraktes, als auch der an FLAG Agarose immobilisierten Proteine wurden über eine diskontinuierliche Bis-Tris Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und über einen spezifischen Western-Blot analysiert (Abbildung 7A). Die Analyse hat ergeben, dass HA/FLAG-RPO133 effizient aus infizierten Zellen aufgereinigt werden kann. Als nächstes sollte nun untersucht werden, welche Proteine mit RPO133 interagieren und sich daher durch die IP der getaggen vvRPO Untereinheit ko-reinigen lassen. Hierzu wurde der gleiche Ansatz wie unter Abbildung 7A beschrieben durchgeführt, wobei die Immunpräzipitate durch einen Überschuss an FLAG Peptid von der FLAG Agarose gelöst wurden. Um geeignete Elutionsbedingungen zu definieren wurde die FLAG-Peptid Elution, sowohl unter 30 °C, als auch unter 4 °C bei einer Inkubationszeit von 1 h durchgeführt. Die eluierten Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 7B).

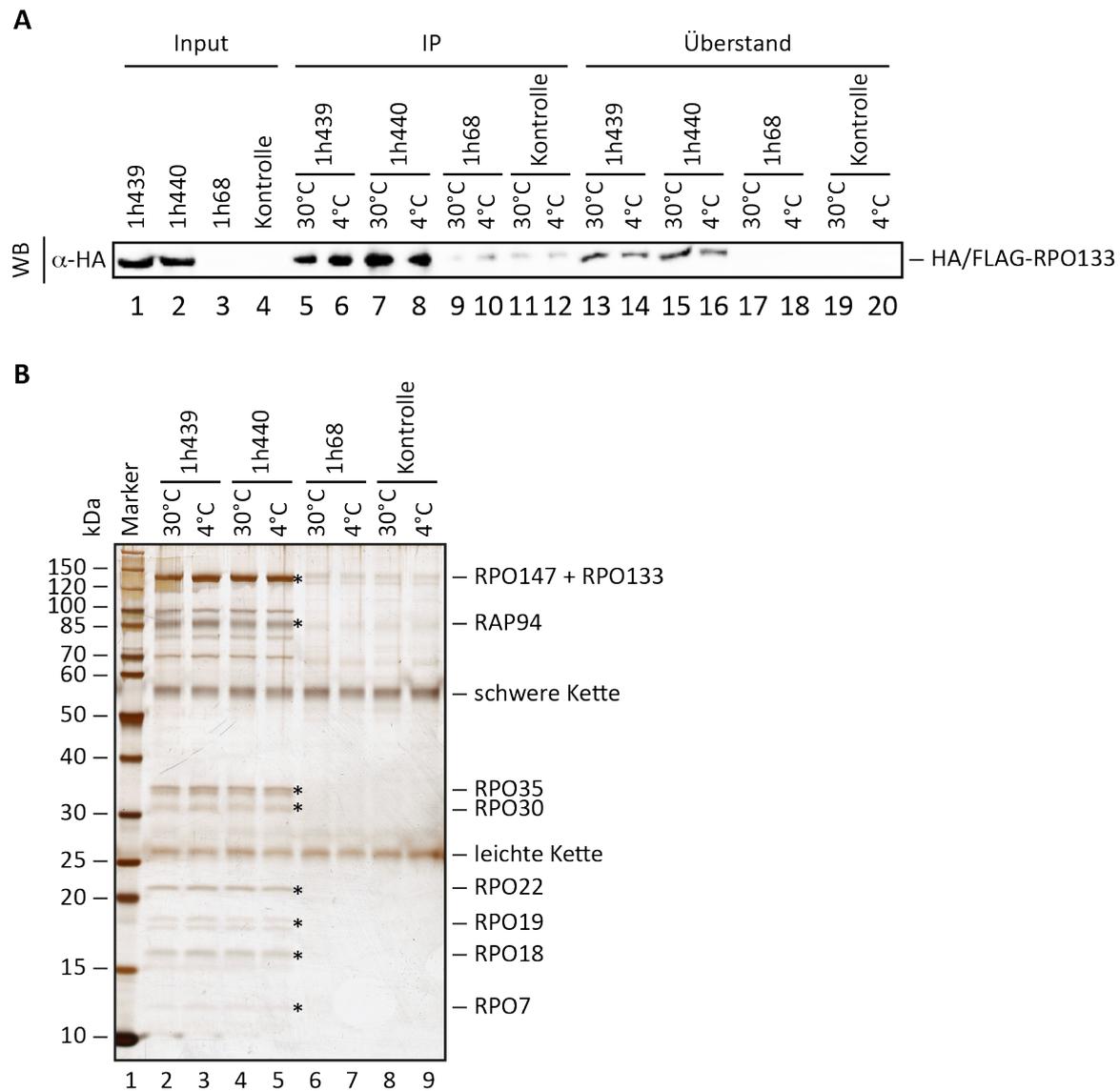


Abbildung 7: Aufreinigung einer nativen vvrRPO mittels α -FLAG IP

(A) Western-Blot Analyse der HA/FLAG-RPO133 IP durch α -HA. (B) A549 Zellen wurden mit GLV-1h439 (Spur 2,3) und GLV-1h440 (Spur 4,5) infiziert (MOI 1, 24 h). Zur Kontrolle wurde GLV-1h68 (Spur 6,7) (MOI 1, 24 h) oder uninfiltrierter Zelleextrakt (Spur 8,9) immunpräzipitiert. Nach der HA/FLAG-RPO133 IP wurde mit 3x FLAG-Peptid jeweils bei 30 °C (Spur 2,4,6,8) oder 4 °C (Spur 3,5,7,9) eluiert. Die ko-präzipitierten Proteine (*) wurde durch MS-Analysen identifiziert.

Wie aus Abbildung 7B ersichtlich wird, ko-präzipitieren mit RPO133 eine große Anzahl an unterschiedlichen Proteinen, die nicht in der Kontrolle zu detektieren sind und damit vermutlich spezifische Interaktoren darstellen. Zur Identifikation dieser Interaktoren wurde die FLAG Peptid Elution durch Massenspektrometrie (MS) analysiert, wobei die identifizierten Proteine dieser Analyse in Abbildung 7B mit einem Stern gekennzeichnet und benannt sind. Bei den identifizierten Proteinen handelte es sich um sämtliche

Untereinheiten des vvrPO Holoenzym (RPO147, RPO133, RPO35, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18, RPO7) und das RNA Polymerase-assoziierte Protein 94 (RAP94) als stöchiometrische Komponente (Abbildung 3A, Spur 2-5). Die Aufreinigungen der mit GLV-1h439 und GLV-1h440 infizierten Zellextrakte war nahezu identisch, weshalb im Folgenden die biochemischen Experimente nur noch mit der rVACV Variante GLV-1h439 durchgeführt wurden. Die oben beschriebenen Resultate zeigten, dass die konstruierten rVACV für die Aufreinigung der vvrPO-Untereinheiten sehr gut geeignet sind. Darüber hinaus wurde offenbar, dass noch weitere sub-stöchiometrische Faktoren in der Elution zu detektieren waren, deren genauere Charakterisierung in den folgenden Abschnitten der Arbeit beschrieben wird.

4.3 Identifizierung von zwei distinkten vvrPO Komplexen in vivo

Es stellte sich als nächstes die Frage, ob die in Abbildung 7B beschriebenen Proteine Teil eines oder mehrerer Komplexe sind. Um diese Frage zu klären, wurde eine lineare Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt, welche die Auftrennung des FLAG-Eluates aufgrund seines Sedimentationsverhalten erlaubte.

Da für die Durchführung eines zusätzlichen Reinigungsschrittes mittels Dichtegradientenzentrifugation eine wesentlich größere Anzahl an Zellen als Ausgangsmaterial im Gegensatz zur IP erforderlich war, wurden für die nachfolgenden Versuche in Suspensionskultur wachsende HeLa S3 Zellen für die Infektion bzw. Extrakterstellung verwendet. Die Zellen wurden in Spinnerflaschen mit einem Kulturvolumen von 1 Liter bis zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen/ml angezogen und anschließend mit rVAVC infiziert. Um optimale Infektionsbedingungen für die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle in Suspension zu erhalten, wurde das Kulturvolumen durch Zentrifugation auf 5 % des eigentlichen Suspensionsvolumens reduziert und gleichzeitig die MOI von 1 auf 1,2 für 24 h erhöht. Beide Maßnahmen garantierten so eine effiziente Infektion der HeLa S3 Zellen in Suspension. Die Reinigung wurde wie in Abbildung 3B beschrieben durchgeführt, wobei die vvrPO nativ über eine α -FLAG IP aufgereinigt und mittels Überschuss an FLAG Peptid von der Matrix eluiert wurde. Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde die FLAG-Elution auf ein Volumen von 200 μ l reduziert, wobei sich die Proteinkonzentration von 0,3 μ g/ μ l auf 4 μ g/ μ l erhöhte. Das Eluat wurde anschließend, über einen linearen 10-30 % Saccharose-Gradienten durch

Zentrifugation bei 126000 g für 16 h aufgetrennt und die individuellen Fraktionen durch Elektrophorese analysiert (Abbildung 8A).

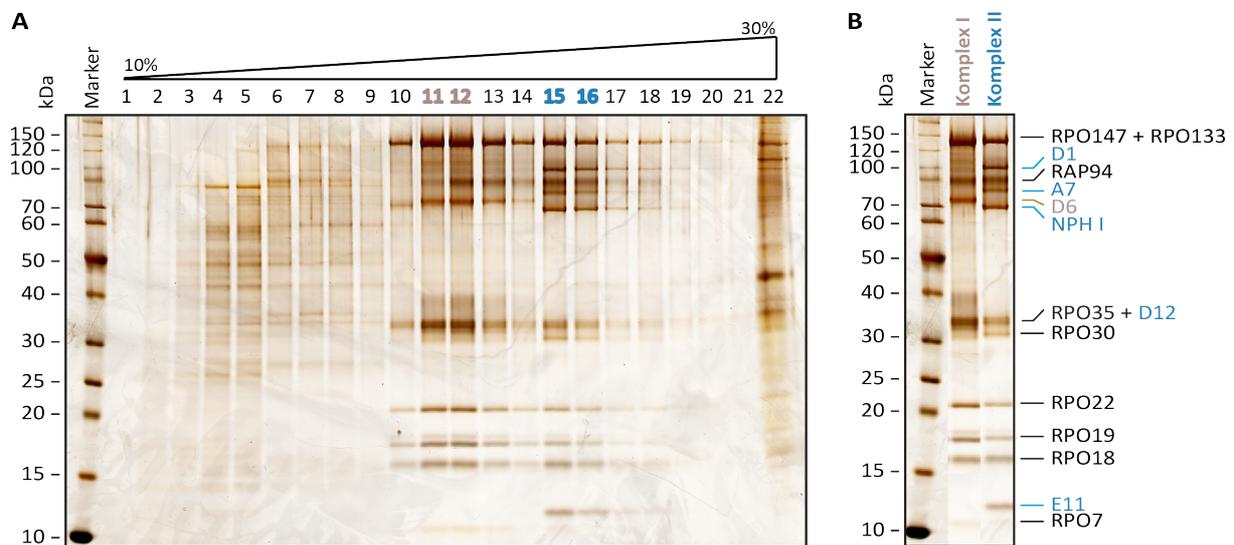


Abbildung 8: Aufreinigung nativer vvrPO Komplexe mittels Saccharose Dichtegradientenzentrifugation

(A) Die Auftrennung des Eluates erfolgte über einen linearen 10–30 % Saccharose Gradienten. Der Gradient wurde für 16 h bei 126000 g und 4 °C zentrifugiert. Die Fraktionierung (Fraktionen 1-22 mit je 200 µl Fraktionsvolumen) wurde mittels Bis-Tris SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Komplex I befindet sich den Fraktionen 11-12 (taupelblich markiert) und Komplex II in den Fraktionen 15-16 (blau markiert). (B) MS-Analyse der Proteinzusammensetzung von Komplex I und Komplex II.

Wie aus Abbildung 8A ersichtlich, spaltet sich das FLAG-Eluat in mindestens zwei definierte Komplexe auf: Ein Komplex erstreckt sich über die Gradientenfraktionen 11-12 (Komplex I), ein weiterer befindet sich in den Gradientenfraktionen 15-16 (Komplex II). Komplex I enthält alle Komponenten der vvrPO einschließlich RAP94. Zusätzlich wurde durch massenspektrometrische Analyse (MS-Analyse) die kleine Untereinheit D6 des frühen viralen Transkriptionsfaktors VETF als weitere stöchiometrische Komponente von Komplex I identifiziert. Die biochemische Zusammensetzung von Komplex I lässt vermuten, dass es sich um das Holoenzym der vvrPO in der frühen Transkription handelt, da RAP94 mit Komplex I ko-sedimentiert.

Komplex II hat signifikant mehr Komponenten als Komplex I, was das unterschiedliche Sedimentationsverhalten im Gradienten erklärt. Wie auch Komplex I beinhaltet Komplex II alle acht Untereinheiten des vvrPO Holoenzym und RAP94. Durch eine MS-Analyse ließen sich fünf weitere Komponenten identifizieren, die eine spezifische Ko-Migration mit

Komplex II aufwiesen. Hierzu zählen die Untereinheiten D1 und D12 des viralen Capping-Enzyms (*VTF*), die große Untereinheit A7 von *VETF* und der virale Terminationsfaktor *NPH I*. Interessanterweise konnte zusätzlich ein weiteres Protein identifiziert werden, welches bislang nicht mit der viralen Transkription in Verbindung gebracht werden konnte. Hierbei handelt es sich um das virale 14 kDa große E11 Protein. Die biochemische Komposition von Komplex II lässt vermuten, dass es sich um die frühe virale RNA Polymerase handelt, welche zusammen mit den Prozessierungsfaktoren für die frühe Transkription verantwortlich ist.

4.4 Komplex II kristallisiert sich als transkriptionell aktiver Komplex heraus

Um zu kontrollieren, ob es sich bei den beiden endogenen Komplexen um aktive Enzyme handelt, wurde eine *in vitro* Transkriptionsstudie durchgeführt. Hierfür fungierte das Plasmid pSB24, welches einen synthetisierten frühen viralen Promotor gefolgt von einer 400 Nukleotide langen DNA Sequenz ohne Guaninbasen enthält, als DNA Matrize.

Für den *in vitro* Transkriptionsansatz wurden je 750 ng von Komplex I als auch von Komplex II als zu testende RNA Polymerase eingesetzt. Die Reaktion wurde bei 30 °C für 30 min inkubiert und anschließend für 10 min mit der Endonuklease T1 behandelt. Die Behandlung der neu synthetisierten RNA mittels RNase T1, diente zur Generierung von 400 nt langen RNA Sequenzen, da die Polymerase selbst nicht in der Lage ist die Transkription zu terminieren. Die RNA wurde durch eine PCI Extraktion isoliert, über ein 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiografie sichtbar gemacht (Abbildung 9). Wie durch die Autoradiografie ersichtlich, handelt es sich bei Komplex II um eine transkriptionell aktive RNA Polymerase, wobei für Komplex I keine Aktivität beobachtet werden konnte. Das Ausbleiben der Transkriptionsaktivität von Komplex I könnte durch das Fehlen der großen Untereinheit A7 von *VETF* verursacht werden. Im Vergleich hierzu zeigt Komplex II mit der biochemischen Zusammensetzung des Holoenzym zusammen mit den Transkriptionsfaktoren der frühen Transkription sowie RAP94 Aktivität auf. Dies ist der Fall obwohl die kleine Untereinheit von *VETF* D6 nicht stöchiometrisch im Komplex vorhanden ist. Durch MS-Analysen konnte jedoch eine geringe Menge an D6 nachgewiesen werden, was eine Aktivität unter der Kontrolle eines frühen Promoters erklären würde. Experimentell war es nicht praktikabel die Aktivität des gesamten kruden Extrakts vor der Aufreinigung nachzuweisen. Aus diesem Grund war der Vergleich der Aktivitäten im unbearbeiteten Extrakt, hin zur aufgereinigten RNA Polymerase (Komplex II), nicht möglich.

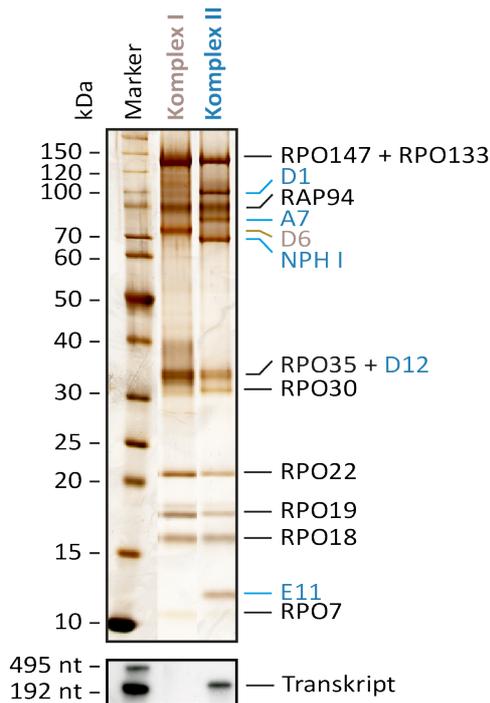


Abbildung 9: *in vitro* Transkription von Komplex I und Komplex II

MS-Analyse der Proteinzusammensetzung von Komplex I und Komplex II (siehe Abbildung 8B) mit anschließender *in vitro* Transkription der beiden Komplexe. Die neusynthetisierte RNA wurde über ein 10 % denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetrennt und über Autoradiografie detektiert.

Abschließend lässt sich zusammenfassen, dass unter Verwendung des rVACV GLV-1h439 ein geeignetes natives Aufreinigungsprotokoll entwickelt wurde, bei dem zwei endogene vRPO-Komplexe gereinigt wurden. Dadurch resultierte die Möglichkeit einer detaillierten und strukturellen Untersuchung der frühen viralen Genexpressionsmaschinerie und allen beteiligten Komponenten.

4.5 Virale RNA Polymerase interagiert mit spezifischen tRNAs

Es hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass viele makromolekulare Komplexe neben Proteinen auch Nucleinsäuren (meistens RNA) enthalten können. Diese können sowohl strukturelle, katalytische als auch regulatorische Funktionen erfüllen. Es stellte sich daher die Frage, ob die isolierten Immunpräzipitate ebenfalls eine Nucleinsäurekomponente enthielten. Um dieses zu testen wurde das Eluat der α -FLAG-IP (Abbildung 7, Spur 3) Phenol-extrahiert und die wässrige Phase mit Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde anschließend durch Polyacrylamidgel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung untersucht (Abbildung 10).

Parallel wurde die Kontroll-IP (Abbildung 7, Spur 7) mittels GLV-1h68 Infektion ebenfalls auf eine RNA Komponente untersucht. Interessanterweise deutet die RNA Isolierung aus beiden Ansätzen an, dass in der Tat eine kleine RNA mit einer Länge von ungefähr 75 Nukleotiden spezifisch im Immunpräzipitat der GLV-1h439-IP mit aufgereinigt wurde.

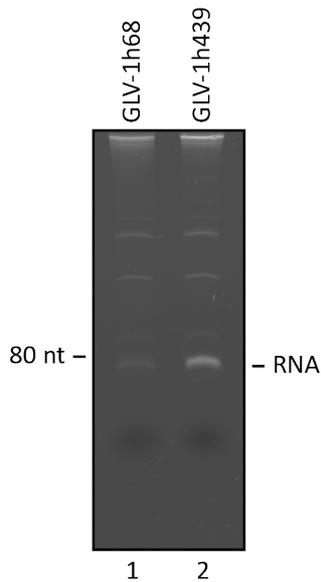


Abbildung 10: Ethidiumbromid-Färbung ko-mirgrierender RNA mit der aufgereinigten vvrPO

Isolierung der RNA erfolgte aus dem Eluat der α -FLAG-IP (Abbildung 7, Spur 5+7) über eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) Präzipitation mit anschließender Ethanol Fällung. Die zu analysierenden Proben wurden über ein 12 % Polyacrylamidgel aufgetrennt und das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt

Um zweifelsfrei nachzuweisen, dass die ko-eluierende RNA mit der vvrPO assoziiert ist, wurde aus den Gradientenfraktionen der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 8) RNA über eine Phenol-Extraktion isoliert und über eine 3'-Endmarkierung mit radioaktiven $[5\text{'}^{32}\text{P}]\text{pCp}$ visualisiert. Wie aus Abbildung 11B ersichtlich wird, konnte die zuvor im Gesamt-Eluat detektierte RNA in den Fraktionen von Komplex II gefunden werden. RNA in diesen Fraktionen war nicht in der Kontrolle zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Stattdessen konnte man in den leichteren Gradientenfraktionen kleinere RNA Kontaminationen erkennen. Aufgrund dieser Befunde war eine Assoziation einer kleinen RNA mit vvrPO des zweiten Komplexes sehr wahrscheinlich.

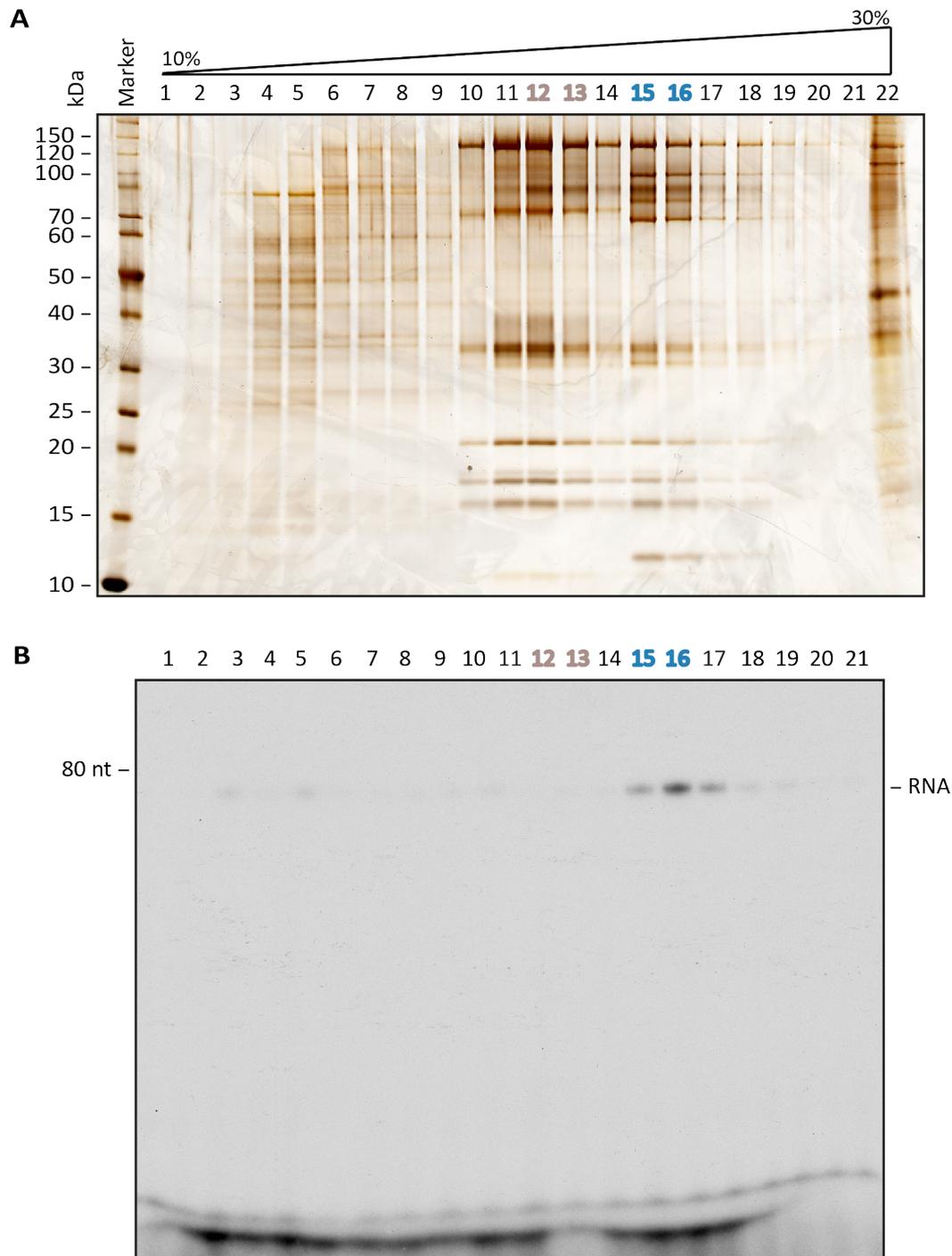


Abbildung 11: 3'-Endmarkierung einer mit der vvrPO ko-migrierenden RNA

(A) Aufreinigung der vvrPO (siehe Abbildung 8) (B) Autoradiografie einer 12% denaturierenden RNA-Gelelektrophorese mit 3'-[5-³²P]pCp markierter RNA nach Isolierung über PCI Extraktion aus den Gradientenfractionen 1-21.

Für eine zweifelsfreie Identifizierung der assoziierten RNA erfolgte eine Isolierung und Aufreinigung eben dieser aus dem Ethidiumbromid-gefärbten Gel (Abbildung 10).

Die Charakterisierung der RNA wurde in enger Kooperation mit den Labors von Prof. Alexander Hüttenhofer (Universität Innsbruck, AT) und Prof. Jörg Vogel (Universität Würzburg, DE) durchgeführt. Anfänglich wurde sowohl das 5`-Endes als auch das 3`-Ende der RNA *in vitro* charakterisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass im Gegensatz zur 3`-End-Markierung mit radioaktiven [5`32P]pCp, es nicht möglich ist das 5`-Ende mit Hilfe von γ -[32P]-ATP zu phosphorylieren. Zudem ist auch eine Polyadenylierungsreaktion des 3`-Endes anhand einer Poly(A)-Polymerase nicht möglich. Beide Beobachtungen deuten daraufhin, dass die Enden der RNA strukturell schwer zugänglich und/oder chemisch blockiert sind.

Die Identifikation der RNA sollte anschließend durch eine Klonierung mit darauffolgender Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren erfolgen. Für die Klonierungsreaktion wurde die RNA wie in Abbildung 10 aufgereinigt und die RNA aus dem Ethidiumbromid gefärbten Polyacrylamidgel isoliert. Die RNP-assoziierte RNA wurde daraufhin im Labor von Prof. Dr. Jörg Vogel (Universität Würzburg, DE) kloniert, wobei im ersten Schritt eine Adapter Ligation mit folgender cDNA Generierung durchgeführt wurde (siehe 6.2.2.17). Im zweiten Schritt erfolgte eine Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren (siehe 6.2.2.18). Als Negativkontrolle für die Klonierung diente eine parallel durchgeführte Reinigung und Isolierung von RNA mittels GLV-1h68 Infektion (Abbildung 10, Spur 2). Der erhaltene Datensatz wurde durch die Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Vogel bioinformatisch ausgewertet (Tabelle 2).

Tabelle 2: Besten Hits der bioinformatischen Auswertung der RNA Sequenzierung

Angegeben sind die acht besten Hits der RNA Sequenzierung mit ihrer Verteilung zwischen den rVACV GLV-1h68 und GLV-1h439, wobei die angegebenen Verteilungswerte nur als Näherung angesehen werden können. Sie können nicht direkt miteinander verglichen werden, da die Reads-pro-Gen nicht auf die jeweilige totale Anzahl der erhaltenen Reads normalisiert wurden.

Chromosom (Chr)	Merkmalstype	Verteilung	
		GLV-1h68	GLV-1h439
Chr 17	tRNA GlnTTG	1,00	936,73
Chr 6	tRNA GlnTTG	1,00	744,32
Chr 3	tRNA ArgACG	0,35	167,57
Chr 3	Exon	0,35	153,32
Chr 1	tRNA GlnCTG	0,50	212,46
Chr 1	tRNA GlnCTG	0,50	211,46
Chr 6	tRNA ArgACG	0,70	294,88
Chr 6	tRNA ArgCCG	12,00	3199,08

Bei sieben der acht Hits handelt es sich entweder um Glutamin tRNAs ($tRNA^{Gln}$) oder Arginin tRNAs ($tRNA^{Arg}$). Obwohl die einzelnen Werte der Hits von GLV-1h439 nicht direkt mit den Werten des Kontrolllexperiments verglichen werden kann, lässt sich eine massive Anreicherung der tRNAs aus den Daten herauslesen (Tabelle 2).

Für die Validierung der Resultate über einen unabhängigen experimentellen Ansatz sollte die Interaktion der vvrPO mit den fraglichen tRNAs durch eine Northern-Blot Analyse untersucht werden. Dazu wurde Gesamt-RNA aus HeLa Zellen isoliert, gemeinsam mit der zu vvrPO-assoziierten RNA auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Zur Detektion der RNAs dienten, sowohl die radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonden der $tRNA^{Gln}$ mit den Anticodons TTG und CTG, als auch die $tRNA^{Arg}$ mit den Anticodons ACG und CCG (Abbildung 12). Zudem wurde zur Spezifikation der Northern-Blot Analyse eine Glutamat tRNA ($tRNA^{Glu}$) als Negativkontrolle eingesetzt.

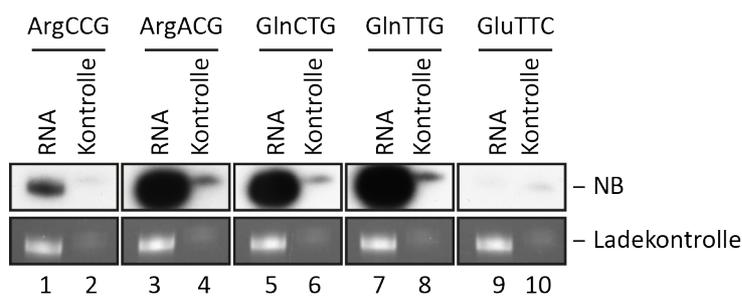


Abbildung 12: Identifikationsbestätigung der ko-migrierenden RNA durch eine Northern-Blot Analyse

Gesamt-RNA aus HeLa Zellen (30 ng/Spur) (Spur 2, 4, 6, 8, 10) sowie die zu charakterisierende RNA (Spur 1, 3, 5, 7, 9) wurden durch ein denaturierendes Polyacrylamidgel (10 %) aufgetrennt und zur Kontrolle wurde das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Übertragung der RNA auf eine positiv geladene Hybond™-N + Nylon Transfermembran erfolgte elektrophoretisch, zudem erfolgte anschließend eine Fixierung der RNA durch einen UV-Crosslinker bei 240 mJ/cm^2 . Als radioaktiv markierte Oligonukleotid-Sonde diente die $tRNA^{Gln}$ und $tRNA^{Arg}$, sowie die $tRNA^{Glu}$ als Negativkontrolle.

Wie in Abbildung 12 ersichtlich konnte durch den Einsatz der spezifischen Oligonukleotid-Sonden bestätigt werden, dass es sich bei der assoziierten kleinen RNA um die tRNAs Arg und Gln handelt (Abbildung 12, Spur 1-8). Zusätzlich konnte anhand eines unabhängigen *tRNA arrays*, welcher in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Tao Pan (Universität von Chicago, US) durchgeführt wurde, die Ergebnisse der Sequenzierung und der Northern-Blot Analyse verifiziert werden [85]. Die identifizierten RNAs könnten im Kontext der viralen Transkription unterschiedliche Funktionen übernehmen. Zum Beispiel könnten die RNAs als ein

strukturelles Grundgerüst von assoziierten Faktoren dienen oder sie könnten katalytische Funktionen übernehmen. Um erste Einblicke in eine etwaige potentielle Funktion dieser RNAs zu bekommen, wurde Komplex II einem RNase-Verdau unterzogen und sowohl seine biochemische Komposition, als auch Aktivität untersucht. Hierfür wurde die vvrPO, wie in Abbildung 8 beschrieben, über eine α -FLAG IP aufgereinigt, jedoch vor der Elution von der Matrix mit RNase T1 behandelt. Hiernach wurde die Polymerase mit Peptid eluiert und einer Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 14A-B) unterzogen. Für den Nachweis der RNase T1 Behandlung wurden die interagierenden tRNAs jeweils aus den Gradientenfraktionen 16 (Abbildung 14A-B, Spur 16) durch eine PCI-Extraktion isoliert, einem $3'$ pCp-Markierung unterzogen und durch eine Autoradiografie detektiert (Abbildung 13).

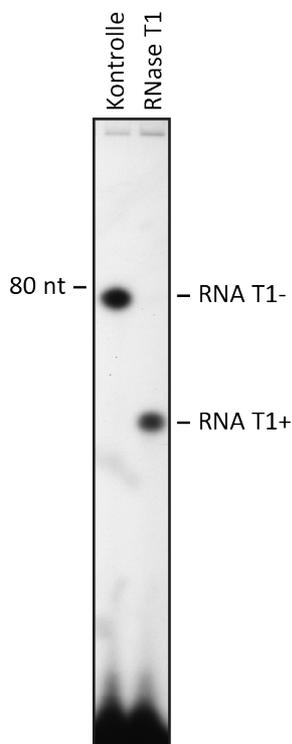


Abbildung 13: RNase T1 Behandlung der spezifisch mit Komplex II komigrierenden RNA

Die Kontrolle der RNase T1 Behandlung der RNP-assoziierten RNA erfolgte über eine $3'$ -Endmarkierung mittels radioaktiven $[5\text{-}^{32}\text{P}]\text{pCp}$, anschließend an eine RNA Isolierung aus Gradientenfraktion 16 (Abbildung 14A-B, Fraktion 16) mittels PCI-Extraktion und Ethanol-Fällung. Die Auftrennung der markierten RNA erfolgte mittels 12,5 % Polyacrylamidgel und anschließender Autoradiografie.

Es zeigte sich, dass die Endonuklease nur einen Teil der RNA abgespalten hat und die RNA massiv geschützt wird. Anhand der Silber-gefärbten Proteingele wurde ersichtlich, dass sich durch den RNase-Verdau weder die Ratio zwischen Komplex I und II, noch die Zusammensetzung von Komplex II signifikant ändert (Abbildung 14A und B). Zusätzlich stellte sich die Frage, ob die RNase T1 Behandlung von Komplex II die Aktivität der vvrPO beeinflusst. Hierfür wurde die aufgereinigte vvrPO aus Komplex II (Abbildung 14A-B, Fraktion 16) einer *in vitro* Transkription unterzogen (Abbildung 14C). Die Reaktion wurde, wie in Abbildung 9 beschrieben, durchgeführt. Wie in der Autoradiografie deutlich sichtbar

wird, konnte für beide aufgereinigten vvrPOs eine Aktivität nachgewiesen werden. So lässt sich zusammenfassend sagen, dass der partielle Verdau der RNA die Aktivität der vvrPO nicht beeinflusst.

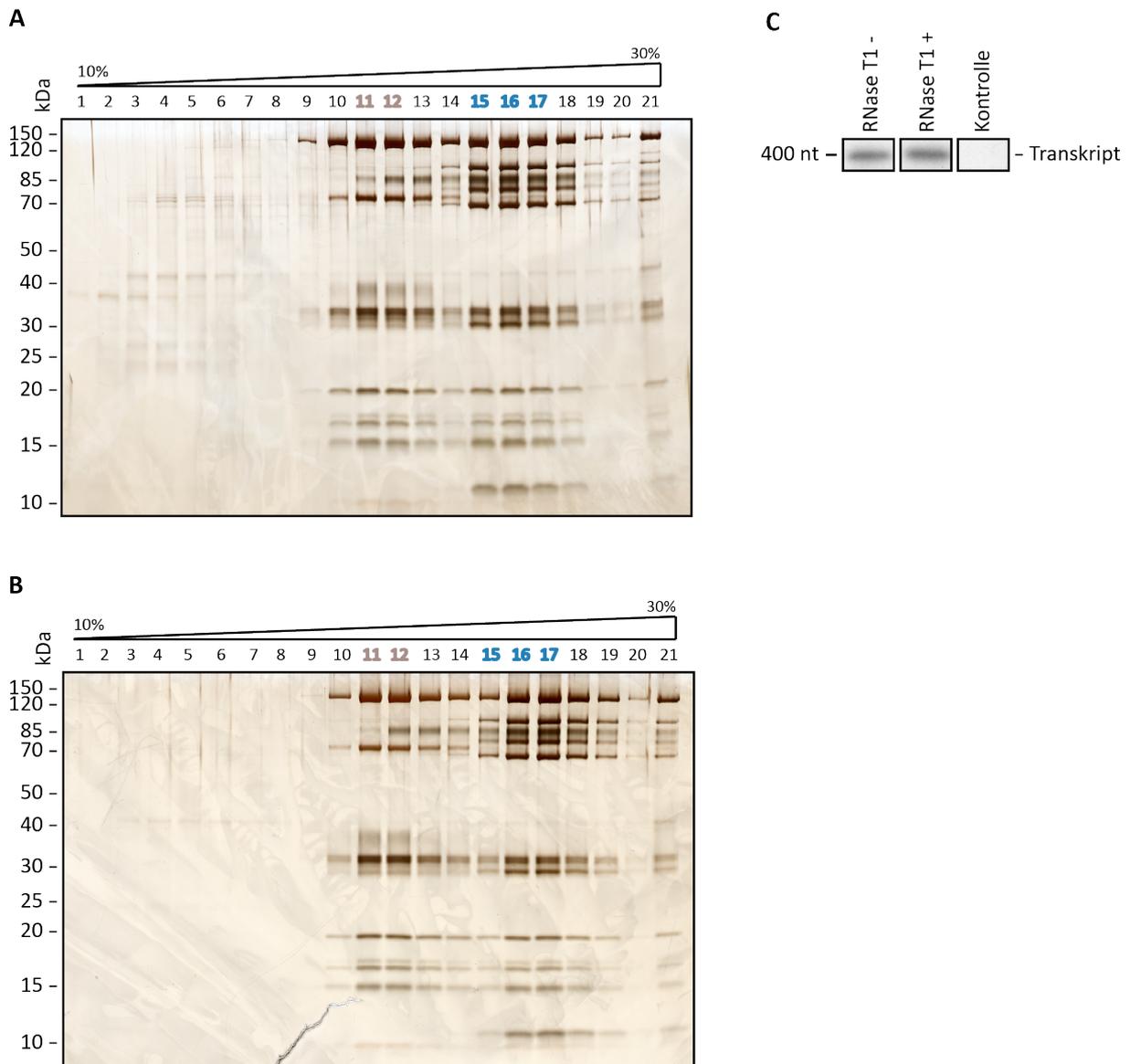


Abbildung 14: RNase T1 Verdau verursacht keine Veränderung in der Aktivität der vvrPO

Immobilisierte vvrPO wurde nach α -FLAG IP mit 50 U/ μ l RNase T1 behandelt, anschließend von der Matrix eluiert und über eine Dichtegradientenzentrifugation (10-30 % Saccharose) aufgetrennt (B). Parallel hierzu wurde ein Kontroll-Gradient ohne RNase T1 Behandlung durchgeführt (A). Kontrolliert wurde der RNase Verdau mittels 3'pCp Markierung (C). Aus beiden Gradienten wurde je Fraktion 17 auf Aktivität mittels *in vitro* Transkription getestet (D).

4.6 E11 erweist sich als essentieller Faktor in der viralen Transkription

E11 eine neue Komponente der vVRPO von der bislang lediglich bekannt ist, dass eine temperatur-sensitive Mutante von E11L, sowohl ein Replikationsdefizit, als auch eine verringerte Expressionsrate des E11 Proteins aufweist. Es wurden daher zum einen strukturelle und zum zweiten funktionelle Studien durchgeführt, um eine potentielle Rolle des Proteins bei der viralen Transkription zu untersuchen.

Um erste Einblicke in die Funktion von E11 in viralen Prozessen zu erhalten, wurde E11L im viralen System durch ein *Knockdown* (KD) Experiment depletiert und im Folgenden die Auswirkung auf die virale Replikation untersucht. Für den KD wurden HeLa S3 Zellen mit E11L-siRNA und einer Kontroll-siRNA transfiziert und nach 24 h mit dem rVACV GLV-1h439 (MOI 0,5) infiziert. Um die Effizienz des KD von E11L zu kontrollieren, wurde die Änderung des mRNA Levels untersucht. Hierzu wurde nach einer siRNA-vermittelten Reduktion RNA aus KD- und Kontroll-Zellen isoliert, revers transkribiert und mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) das Level der E11L mRNA bestimmt. Wie in Abbildung 15A ersichtlich, war das mRNA Level von E11L nach siRNA KD um 90 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Um das Replikationsverhalten von GLV-1h439 im Zuge des Infektionsverlaufes mit und ohne KD von E11L zu quantifizieren, wurde der virale Titer mittels Plaque-Assay zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24, 48, 72 und 96 hpi) aus Proben von Zellkultur-Überständen, sowie den lysierten Zellen bestimmt (Abbildung 15B). In beiden Infektionsverläufen, sowohl E11L-depletiert, als auch in den Kontroll-Zellen, ist ein Anstieg infektiöser Viruspartikel innerhalb der Zellen über das Niveau des Inokulums zu verzeichnen. Es ist jedoch ein signifikanter Abfall in der Anzahl der infektiösen Partikeln von den Kontroll-Zellen hin zu den KD-Zellen zu verzeichnen (Abbildung 15B-C).

Der Plaque Assay zeigt zwar ein aktives Replikationsverhalten in beiden Ansätzen, jedoch mit einer starken Verminderung der Infektiösität auf Seiten der mit siE11L-behandelten Zellen. Diese Resultate legen nahe, dass E11L für die GLV-1h439 Replikation in HeLa S3 Zellen eine wichtige Rolle spielt. Weiterführend stellte sich die Frage, ob das resultierende Replikationsdefizit von GLV-1h439 nach einem KD von E11L durch Veränderungen des viralen Transkriptionsapparats oder durch Änderungen in der Zusammenlagerung der nativen vVRPO-Komplexe hervorgerufen wurde. Um diese Hypothese näher zu untersuchen sollte die vVRPO unter E11L KD-Bedingungen gereinigt und deren Zusammensetzung analysiert werden.

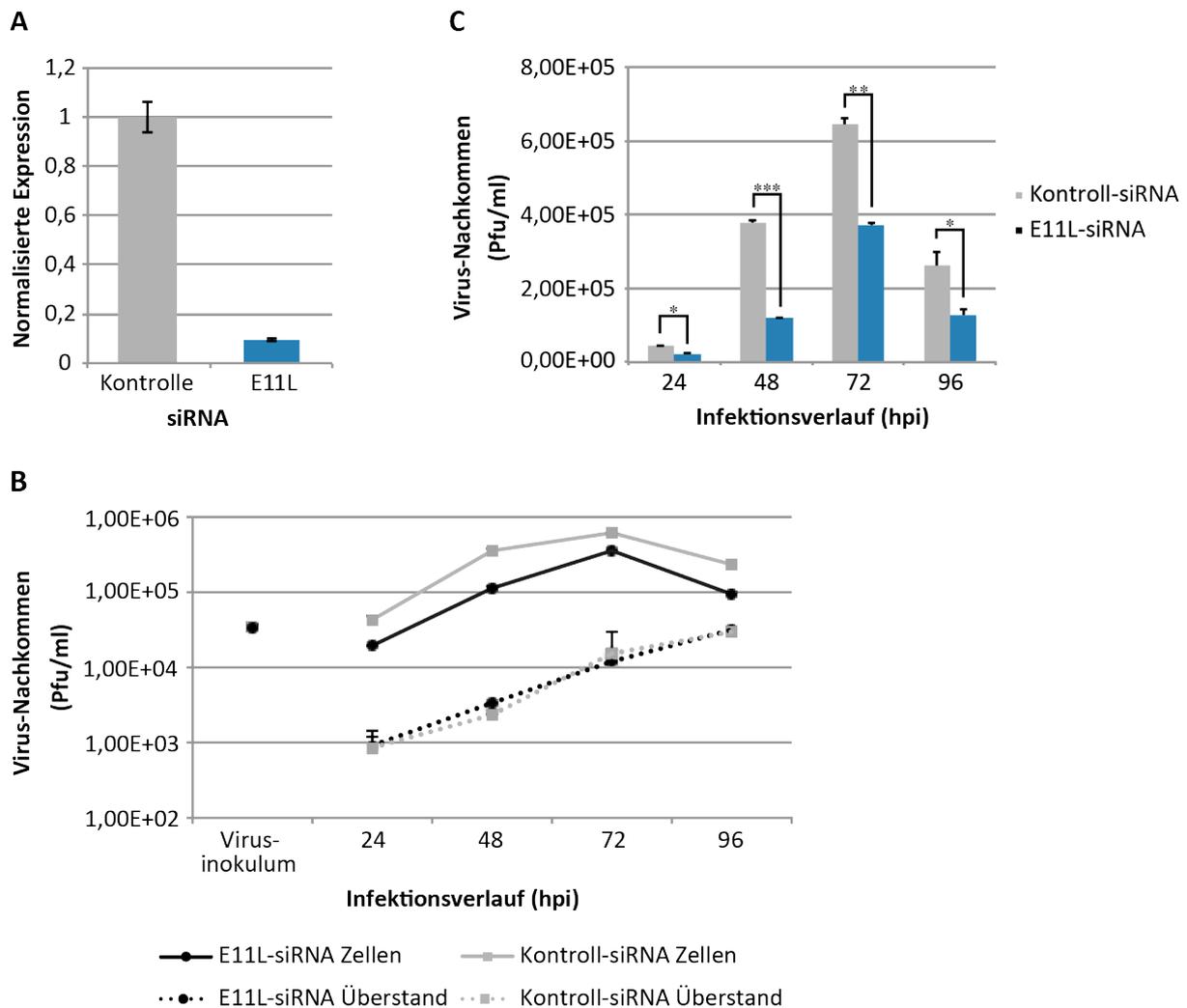


Abbildung 15: Replikationsdefizit nach E11L Knockdown (KD)

HeLa S3 Zellen wurden bei einer Konfluenz von 60 % parallel mit 15pmol E11L-siRNA und Kontroll-siRNA auf einer 24-well Platte transfiziert und nach 24 h mit einer MOI von 0,5 mit GLV-1h439 infiziert. (A) Der *Knockdown* von E11L wurde nach 48 hpi durch quantitative Echtzeit-PCR überprüft. (B-C) Für den Replikationsassay wurden zu den Zeitpunkten 24, 48, 72 und 96 hpi, sowohl Proben von den Zellen, als auch von den Zellkulturüberständen entnommen und mittels Standard Plaque Assay der Virustiter ermittelt. Das Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt, wodurch die Konzentrationen den Mittelwerten in Pfu/ml mit Standardabweichung entsprechen (n=3).

Für die Untersuchung wurden HeLa Zellen bei einer Konfluenz von 60 % mit der E11L-siRNA transfiziert. Zur Kontrolle wurde eine Transfektion mit einer Kontroll-siRNA durchgeführt. Die Infektion erfolgte nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit dem rekombinanten VACV GLV-1h439. Die Aufreinigung der vvPRO aus E11L-depletierten, sowie Kontrollzellen,

erfolgte analog zu der in Abbildung 7 beschriebenen Aufreinigungsstrategie. Aufgrund dessen wurde die MOI von 0,5 auf 1,2 erhöht um eine gleichbleibende Ausgangssituation zu gewährleisten. Demzufolge musste jedoch die Infektionszeit von 48 h auf 24 h reduziert werden, da ansonsten der Lyseprozess der Zellen schon zu weit fortgeschritten wäre. Der erfolgreiche *KD* von E11L wurde vor der Aufreinigung mittels Immunoblot bestätigt, siehe Abbildung 16A.

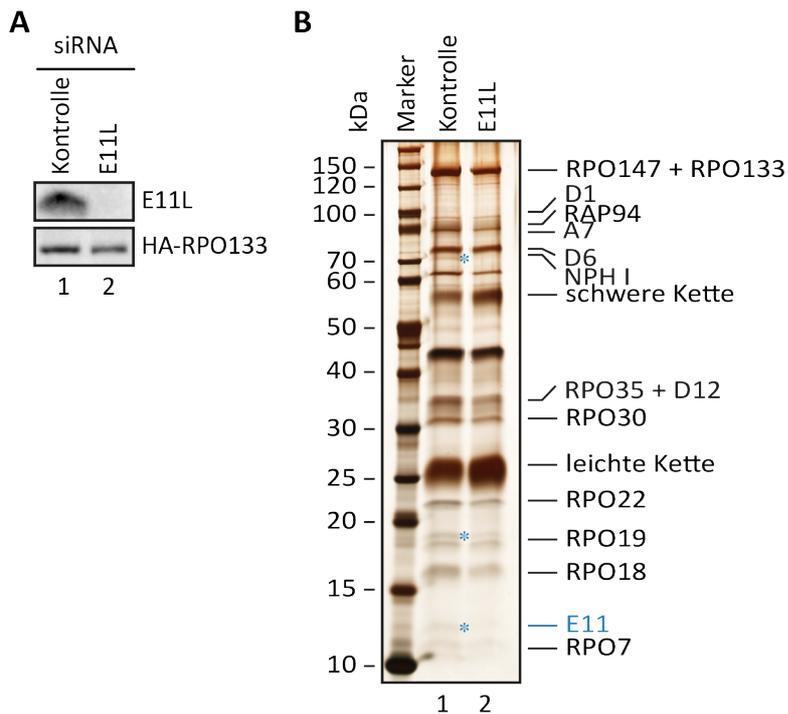


Abbildung 16: *KD* von E11L verursacht Veränderung in der IP von HA/FLAG-RPO133

HeLa Zellen wurden in 6-well Kulturplatten mit je 75pmol E11L-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und mit einer MOI von 1,2 mit GLV-1h439 für 24 h infiziert. Das FLAG Peptid Eluat der HA/FLAG-RPO133 IP wurde über Bis-Tris SDS-PAGE aufgetrennt und Silber gefärbt. (B) Die *KD*-Effizienz wurde mittels Western-Blot Analyse überprüft.

Die durch die IP isolierte vvPRO, sowie assoziierte Proteine wurden mittels Bis-Tris SDS-PAGE und Silberfärbung im Hinblick auf deren Proteinzusammensetzung untersucht (Abbildung 16B). Die Reduktion von E11L führt zu marginalen Veränderungen in der biochemischen Zusammensetzung der Elutionsfraktionen. Hierzu zählen hauptsächlich eine Reduktion des Proteinlevels von RPO19 und NPH I. Die Analyse beider Eluate mittels Dichtegradientenzentrifugation erwies sich jedoch als nicht praktikabel, da nicht genügend Zellmaterial aus den siE11L-transfizierten Zellen gewonnen werden konnte um ausreichend

native vvRPO für solch eine Analyse zu erhalten. Aufgrund dessen konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, welchen Einfluss die Reduktion von E11L auf die endogene Bildung beider vvRPO Komplexe nimmt.

4.7 Strukturelle Analyse von vvRPO

Diese Promotion wurde mit dem Ziel gestartet, die atomare Struktur der vvRPO und ihren interagierenden Prozessierungsfaktoren zu lösen. Ein erster Schritt in diese Richtung ist die Verfügbarkeit von hoch-reinen vvRPO Komplexen I und II. Wie in den Kapiteln 4.1-4.4 beschrieben, ist dies durch die Verwendung von rekombinanten Viren gelungen und ermöglichte daher die angestrebten strukturellen Studien durch die Kryoelektronenmikroskopie (Kryo-EM-Studien). Alle Studien im Bereich der EM (EM-Studien mittels Negativkontrastierung sowie Kryo-EM-Studien) wurden in enger Kooperation mit Prof. Dr. Bettina Boettcher (Universität von Edinburgh, UK) durchgeführt. Die EM-Studien sollten uns die Möglichkeit geben diverse Prozessierungsfaktoren am Holoenzym der vvRPO zu lokalisieren und erste Einblicke in die Koordination der viralen Transkription zu untersuchen. Die Kryo-EM Studien sollten durch klassische Röntgenstrukturanalyse einzelner Polymerase-assoziierte Faktoren ergänzt werden. Demzufolge sollte eine Kombination beider Techniken ein Gesamtbild der vvRPO zusammen mit ihren Prozessierungsfaktoren generieren. Die Röntgenstrukturanalyse von individuellen vvRPO-assoziierten Faktoren wurde in enger Kooperation mit Dr. Clemens Grimm (Universität Würzburg, DE) durchgeführt und ausgewertet.

4.7.1 Strukturbiologische Untersuchung von Komplex I der vvRPO

Für eine detailliert strukturbiologische Untersuchung von Komplex I, wurde in einem ersten Schritt eine konventionelle EM-Studie mittels Negativkontrastierung durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten zeigen, ob die zur Verfügung stehende Probe in sich homogen und daher für die höher-auflösende Kryo-EM nutzbar zu machen ist.

Hierfür wurde die vvRPO wie in Abbildung 8 beschrieben aus infizierten HeLa S3 über eine α -FLAG Affinitätsmatrix aufgereinigt, von der Matrix mittels eines Überschusses an FLAG Peptid eluiert und einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Anschließend wurden

die Gradientenfractionen elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine über eine Silberfärbung sichtbar gemacht (Abbildung 17).

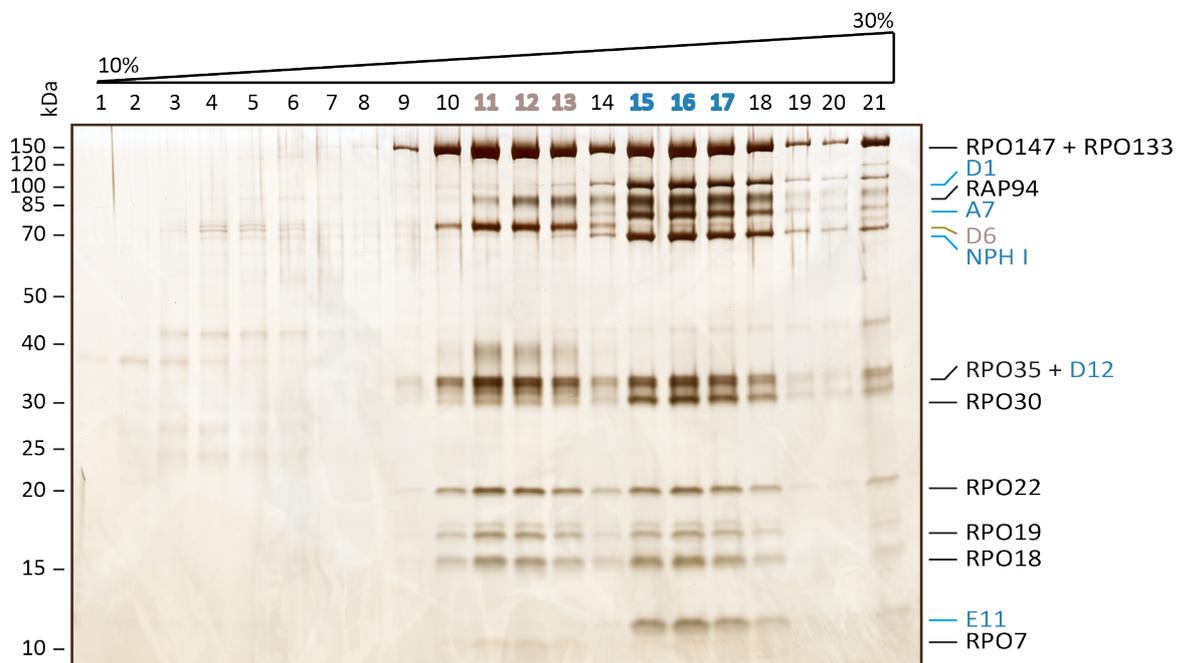


Abbildung 17: Dichtegradientenzentrifugation von affinitätsgereinigten nativen vvrPO Komplexen

Die Auftrennung des FLAG Peptid Eluates erfolgte wie in Abbildung 8 beschrieben über eine Dichtegradientenzentrifugation. Die Gradientenfractionen wurden mittels Bis-Tris SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Komplex I befindet sich den Fraktionen 11-13 (taupe markiert) und Komplex II in den Fraktionen 15-17 (blau markiert).

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich wird, sedimentiert Komplex I (Holoenzym der vvrPO zusammen mit RAP94 und der *VETF*-Untereinheit D6) in den Gradientenfractionen 11-13. Für eine Negativkontrastierung in einer konventionellen EM-Studie wurde Fraktion 12 verwendet (Abbildung 18). Die Pixelgröße der Projektion beträgt hierbei 3,06 Å. Im Mikrograph der Negativkontrastierung ist, durch die Anlagerung der Schwermetallsalze an die Oberflächendetails der vvrPO, deutlich eine homogene Partikelpopulation sichtbar (Abbildung 18A). Die Homogenität der Partikel ermöglichte eine semi-automatische Gruppierung der kontrastierten Partikel in 100 2D-Klassen. Einige ausgesuchte Klassenbilder sind in Abbildung 18B dargestellt. Weiterhin konnte, durch die einzelnen Klassenbilder, eine 3D Rekonstitution der vvrPO mit einer Auflösung von 21 Å generiert werden. Die Oberflächenpräsentationen der vvrPO aus vier verschiedenen Orientierungen sind in

Abbildung 18C gezeigt. Die Polymerase hat eine klauenförmige Struktur, bestehend aus zwei länglichen Domänen, welche durch einen großen zentralen Spalt getrennt sind.

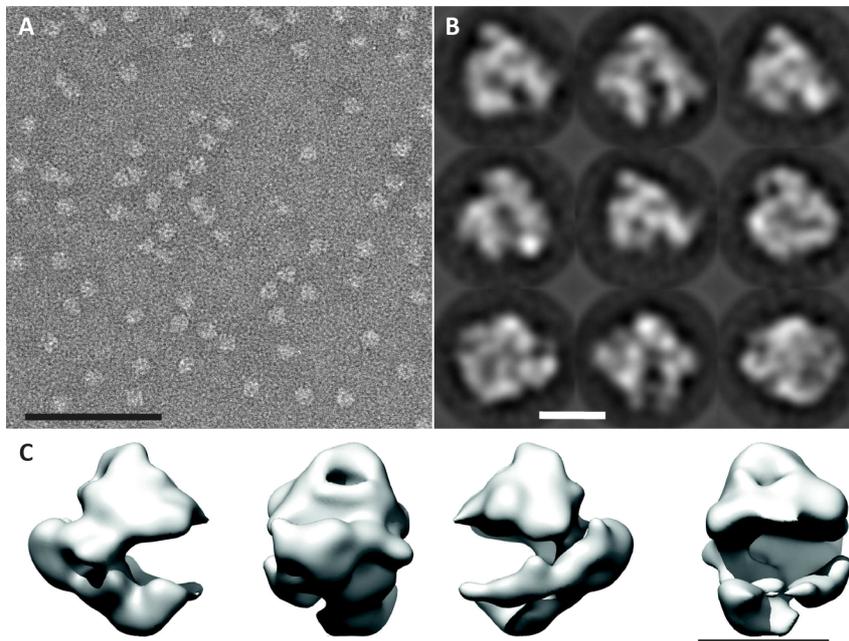


Abbildung 18: Negativkontrastierung von Komplex I der vvrPO

Komplex I der vvrPO diente als Vorlage für eine Negativkontrastierung, die von Prof. Bettina Boettcher durchgeführt wurde. (A) Mikroskopische Aufnahme mit homogenen vvrPO-Partikeln (Maßstab 100 nm). (B) Ausgesuchte Klassenbilder von Komplex I (Maßstab 10 nm). (C) Oberflächenpräsentation der vvrPO aus vier verschiedenen Orientierungen (Maßstab 10 nm).

Die Untereinheiten RPO147 und RPO133 der vvrPO weisen eine Sequenzhomologie von ca. 20 % zu den Untereinheiten RPB1 bzw. RPB2 der zellulären Pol II auf [47, 48, 58]. Die atomare Struktur der Pol II macht deutlich, dass sich RPB1 und RPB2 zu ihrer typischen Klauenform zusammenlagern [86]. Dies ließ vermuten, dass RPO147 und RPO133 das Grundgerüst der klauenförmigen Struktur von vvrPO ausbilden. Eine Vermutung, welche durch die Kryo-EM bestätigt werden konnte (Abbildung 19). Es ist aufgrund dieser Daten bereits klar geworden, dass vvrPO eine starke strukturelle Ähnlichkeit zur Pol II hat.

Da durch die Negativkontrastierung gezeigt werden konnte, dass es sich bei Komplex I der vvrPO um eine homogene Partikelpopulation handelt, konnte die aufgereinigte vvrPO als Ausgangsmaterial für eine höher-auflösende Kryo-EM Studie verwendet werden (Abbildung 19). Um Komplex I mit einer errechneten Masse von 575 kDa für eine Kryo-EM Studie verwenden zu können, musste dieser zunächst auf 1,7 mg/ml aufkonzentriert und in einen

Saccharose-freien Puffer überführt werden. Hierdurch war es möglich eine 3D Rekonstruktion der vvrPO mit einer Auflösung von 11 Å zu erhalten (Abbildung 19A-F). Die 3D Oberflächenstrukturen der vvrPO sind in drei unterschiedlichen Orientierungen des Komplexes gezeigt (Abbildung 19A-C).

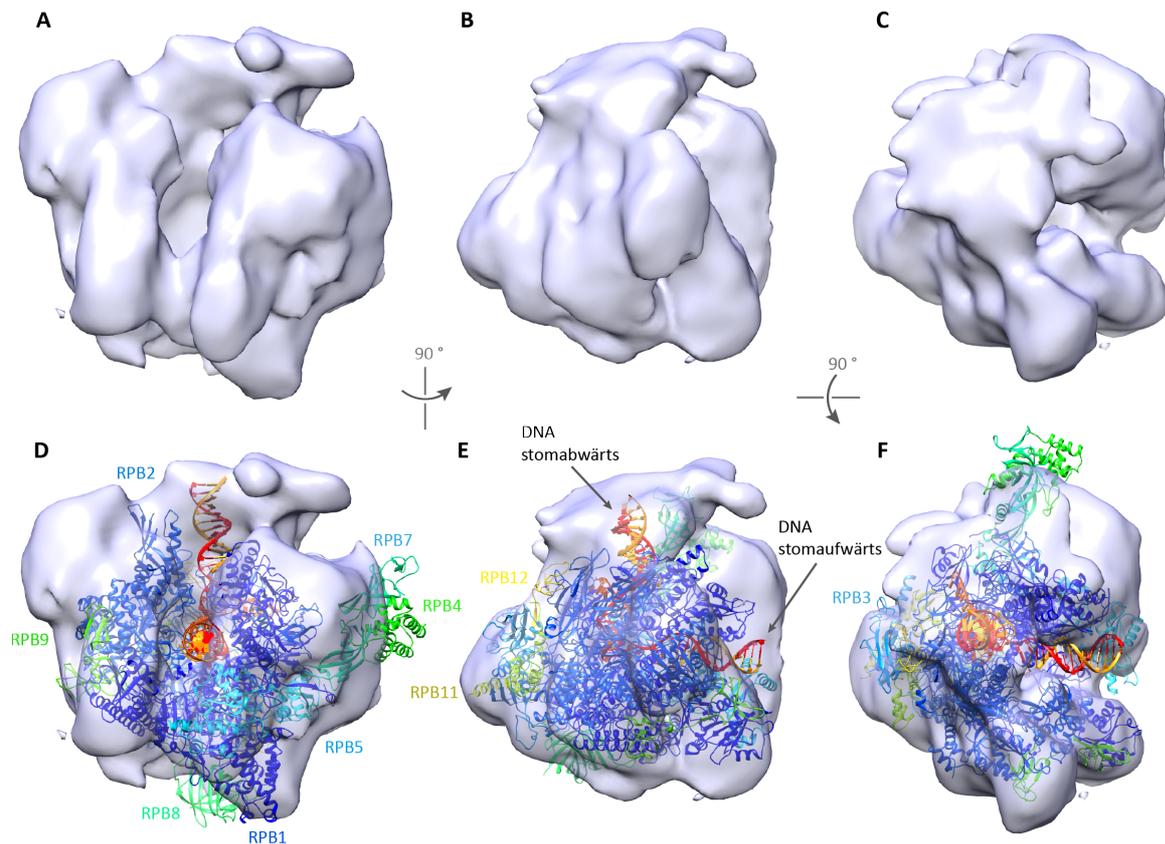


Abbildung 19: Kryo-EM Analyse von Komplex I der vvrPO im Vergleich zur humanen RNA Pol II

(A-F) Komplex I der vvrPO diente als Vorlage für eine Kryo-EM Studie, welche von Prof. Bettina Boettcher (Universität von Edinburgh, UK) durchgeführt wurde. Die Oberflächenpräsentationen besitzen eine Auflösung von 11 Å und sind jeweils in Relation zueinander um die horizontale Achse bzw. die vertikale Achse um 90° rotiert. (D-F) Einbettung der humanen transkribierenden Pol II (5FLM, RCSB PDB) in die Kryo-EM Struktur von Komplex I der vvrPO als Vergleich [87].

Wie anhand der Oberflächenstrukturen zu erkennen ist, handelt es sich bei der vvrPO um eine fast kugelförmige Struktur mit einer charakteristischen zentralen Spalte, welche die klauenförmigen Struktur der vvrPO prägt und für eukaryotische Polymerasen typisch ist [88]. Somit ist die Kryo-EM Struktur im guten Einklang mit der zuvor beschriebenen 3D Rekonstruktion der negativ-contrastierten Probe von Komplex I.

Um die strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Pol II und vvrPO näher zu untersuchen wurde die atomare Struktur der humanen, transkribierenden Pol II (5FLM, RCSB PDB) in die Kryo-EM Struktur von Komplex I der vvrPO eingepasst (Abbildung 15D-F). Deutlich ist die strukturelle Homologie, zwischen beiden Strukturen sichtbar [88]. Die Ähnlichkeit ist am größten im Bereich der beiden großen Untereinheiten, welche die Klaue und das katalytische Zentrum der Polymerasen ausbilden. Im Bereich des Stieles, welcher peripher an einer der klauenförmigen Domänen der Pol II lokalisiert ist und aus den Untereinheiten RPB4 und RPB7 zusammensetzt ist, lassen sich jedoch auch Unterschiede zur vvrPO erkennen. Auffällig ist bei dem Vergleich auch, dass die vvrPO Struktur in einigen Bereichen Dichten aufweist, die bei der Pol II nicht auftreten. Dies könnten Bereiche sein in denen RAP94 oder die kleine Untereinheit D6 von *VETF* lokalisiert sind, da beide Proteine keine Sequenzhomologie zu einer Untereinheit der Pol II aufweisen.

4.7.2 Strukturbiologische Untersuchung von Komplex II der vvrPO

Für die strukturbiologische Untersuchung von Komplex II der vvrPO wurde prinzipiell ähnlich wie bei der Untersuchung von Komplex I vorgegangen. Wie aus Abbildung 17 ersichtlich, sedimentiert Komplex II hauptsächlich in den Gradientenfraktionen 15-17 und besteht aus den Komponenten des Holoenzym der vvrPO, dem Capping-Enzym, RAP94, der großen Untereinheit A7 von *VETF*, NPH I und E11 (Abbildung 17, Spur 15-17). Für die konventionelle Negativkontrastierung wurde Gradientenfraktion 15 verwendet (Abbildung 20). Die Pixelgröße der Projektion betrug, ähnlich wie bei Komplex I, 3,06 Å. Weiterhin ist im Mikrograph, durch die Anlagerung der Schwermetallsalze an der Oberfläche der vvrPO, eine homogene Partikelpopulation sichtbar (Abbildung 20A). Die Homogenität der Partikel erlaubte eine semi-automatische Partikel-Gruppierung, welche eine 2D Klassifizierung der vvrPO Partikel ermöglichte. Ausgesuchte Klassenbilder sind in Abbildung 20B dargestellt. Die Oberflächenpräsentationen sind in Abbildung 20C aus vier verschiedenen Orientierungen gezeigt, wobei eine Auflösung von 19 Å in der Negativkontrastierung für Komplex II der vvrPO erreicht werden konnte. Deutlich sind im Vergleich zur Negativkontrastierung von Komplex I zusätzliche Dichten auszumachen. Bei den extra Dichten handelt es sich aller Wahrscheinlichkeit nach um die zusätzlichen Prozessierungsfaktoren, welche spezifische Komponenten von Komplex II sind.

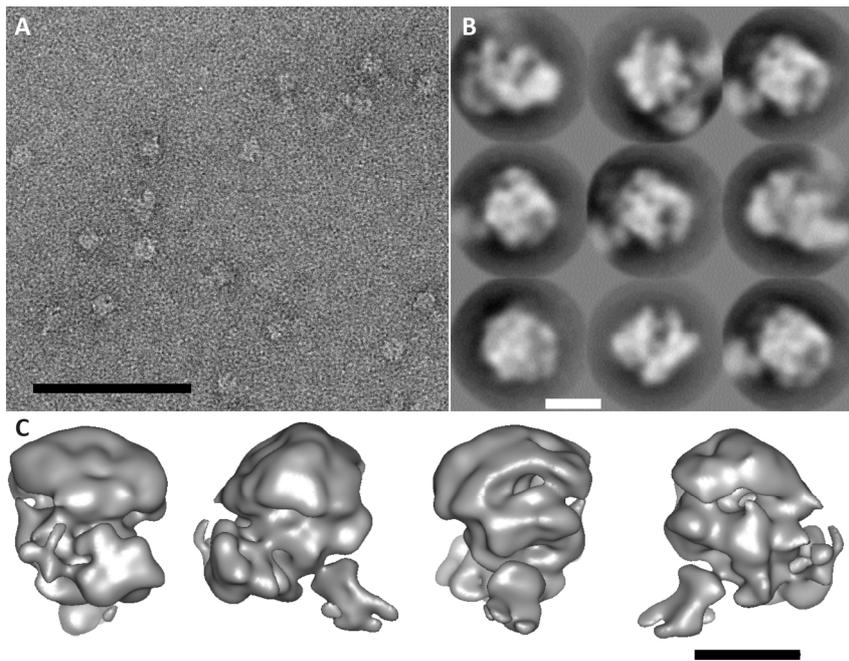


Abbildung 20: Negativkontrastierung von Komplex II der vvRPO

Komplex II der vvRPO diente als Ausgangsmaterial für eine Negativkontrastierung, die von Prof. Bettina Boettcher durchgeführt wurde. (A) Mikrograph mit homogenen vvRPO Partikeln (Maßstab 100 nm). (B) Ausgesuchte Klassenbilder von Komplex II (Maßstab 10 nm). (C) Oberflächenpräsentation der vvRPO aus vier verschiedenen Orientierungen (Maßstab 10 nm).

Um detailliertere Informationen über die Struktur von Komplex II zu erhalten, wurde eine Kryo-EM Studie durchgeführt. Die Gradientenfractionen 15-17, in denen Komplex II sedimentierte, wurden vereinigt und es erfolgte ein Pufferaustausch hin zu einem physiologischen Kryo-EM Puffer, um das Ausgangsmaterial von Saccachrose zu befreien. Um eine geeignete Konzentration für die Kryo-EM zu generieren wurde Komplex II auf 0,7 mg/ml aufkonzentriert. Die 3D Rekonstitution von Komplex II erreichte hierbei eine Auflösung von 12 Å. In Abbildung 21 sind die Oberflächenstrukturen von Komplex II in Relation zueinander, entweder um die horizontale Achse oder um die vertikale Achse um 90° gedreht, abgebildet (Abbildung 17A-F). Die Struktur von Komplex II hat im Gegensatz zum kugelförmigen Komplex I eine ovale Struktur.

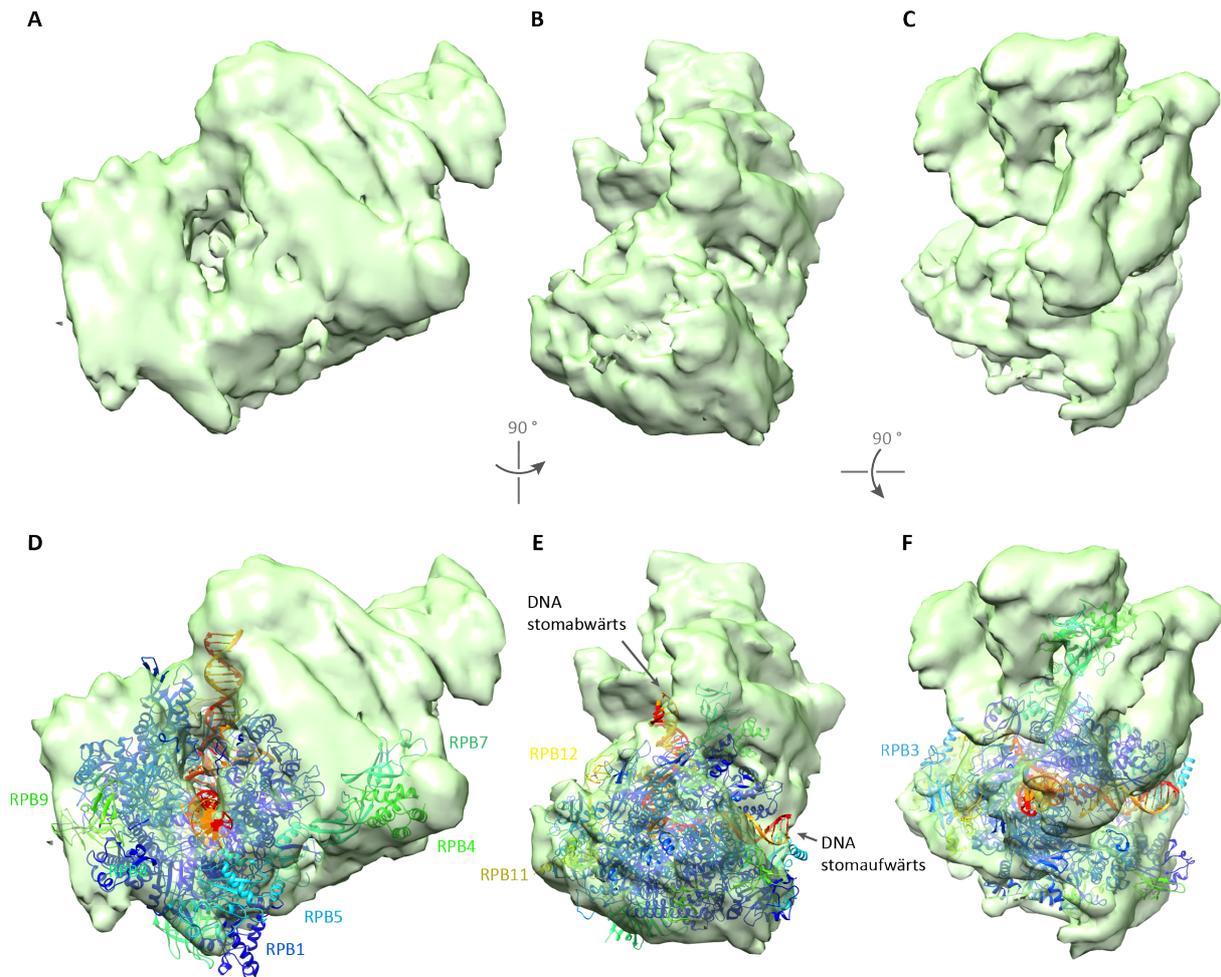


Abbildung 21: Kryo-EM Analyse von Komplex II der vvrPO im Vergleich zur humanen RNA Pol II

(A-F) Komplex II der vvrPO diente als Vorlage für eine Kryo-EM Studie, welche von Prof. Bettina Boettcher (Universität von Edinburgh, UK) durchgeführt wurde. Die Oberflächenpräsentationen besitzen eine Auflösung von 12 Å und sind jeweils in Relation zueinander um die horizontale Achse bzw. die vertikale Achse um 90° rotiert. (D-F) Die humane, transkribierende Pol II wurde in die Kryo-EM Struktur von Komplex II der vvrPO gefittet [87].

Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit beider Komplexe wurde in Komplex II die atomare Struktur der humanen, transkribierenden Pol II eingepasst (Abbildung 17D-F). Auch in Komplex II ist deutlich die zentrale Spalte mit der klauenförmigen Struktur zu erkennen. Offensichtlich sticht jedoch in der Kryo-EM Struktur die große extra Dichte, welche nicht durch die atomare Struktur der Pol II ausgefüllt wird, hervor. Bei dieser zusätzlichen Dichte handelt es sich vermutlich, um die assoziierten Prozessierungsfaktoren der vvrPO. Interessanterweise lokalisiert die Extra-Dichte hauptsächlich auf einer Seite der vvrPO, was zu einer ovalen Oberflächenstruktur von Komplexes II führt.

4.7.3 Quervernetzungsstudien geben Hinweise auf die Position von RPO35 im vvRPO Komplex

Um detailliertere Informationen über Interaktionen der vvRPO Untereinheiten untereinander und gegebenenfalls Informationen über die Interaktionen zwischen der vvRPO und den Prozessierungsfaktoren zu erhalten, wurde ein Quervernetzungsexperiment mit anschließender massenspektroskopischer Untersuchung im Labor von Prof. Dr. Henning Urlaub (MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen, DE) durchgeführt (6.2.2.21). Diese Methode verwendet eine chemische Quervernetzung von Lysin-Resten innerhalb von Proteinen mittels BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat), einem wasserlöslichen, nicht-proteolytisch spaltbaren Amin-Amin-Cross-Linker. Durch dieses Verfahren ist es möglich, Lysinreste bis zu einer maximalen Distanz von 30 Å kovalent zu verbinden. So erhält man definierte inter- als auch intra-Protein-Quervernetzungen und damit Informationen über Proteininteraktionen in hoch-molekularen Komplexen.

Für die Auswertung der Experimente wurde ein Homologie-Modell der vvRPO, basierend auf der Homologie zur zellulären Pol II, mittels SWISS-MODEL [89] generiert, wobei die Auswertung der Ergebnisse in enger Kooperation mit Dr. Clemens Grimm (Universität Würzburg, DE) erfolgte. Interessanterweise zeigen alle Untereinheiten, mit Ausnahme von RAP94 und RPO35, limitierte Homologie zu Untereinheiten der Pol II (Tabelle 1). Dementsprechend standen vor allem diese beiden Proteine im Vordergrund unserer Untersuchungen. Für die Auswertung der Untersuchungen wurden, sowohl die Quervernetzungs-Daten von Komplex I, als auch von Komplex II (siehe 8.2, 8.3) mit einbezogen. In Abbildung 22 sind, sowohl die erhalten Inter-Protein Quervernetzungen von RPO35, als auch von RAP94 innerhalb der vvRPO dargestellt. Es ist klar ersichtlich, dass sich die Quervernetzungen von RPO35 auf einen sehr eng umschriebenen Bereich auf der Oberfläche des Homologie-Modells konzentrieren (Abbildung 22A). Dadurch kann die Position der Untereinheit RPO35 relativ eindeutig innerhalb der Kryo-EM-Dichte für Komplex I festgelegt werden (Abbildung 22A). Diese Quervernetzungen sind vornehmlich auf den Untereinheiten RPO7 und RPO133 lokalisiert, wobei die Gütefaktoren hier bis zu einer Stärke von 13 reichen. Auf diesem Grund haben wir den markierten Dichtebereich der RPO35 Untereinheit zugeordnet (Abbildung 22A). Zusätzlich existiert eine sehr starke Quervernetzung von K134 (RPO35) zu K577 (RAP94) mit einem Gütefaktor von 12. Da RAP94

jedoch keine homologe Entsprechung in Pol II besitzt, ist dies nicht graphisch in Abbildung 22 darstellbar.

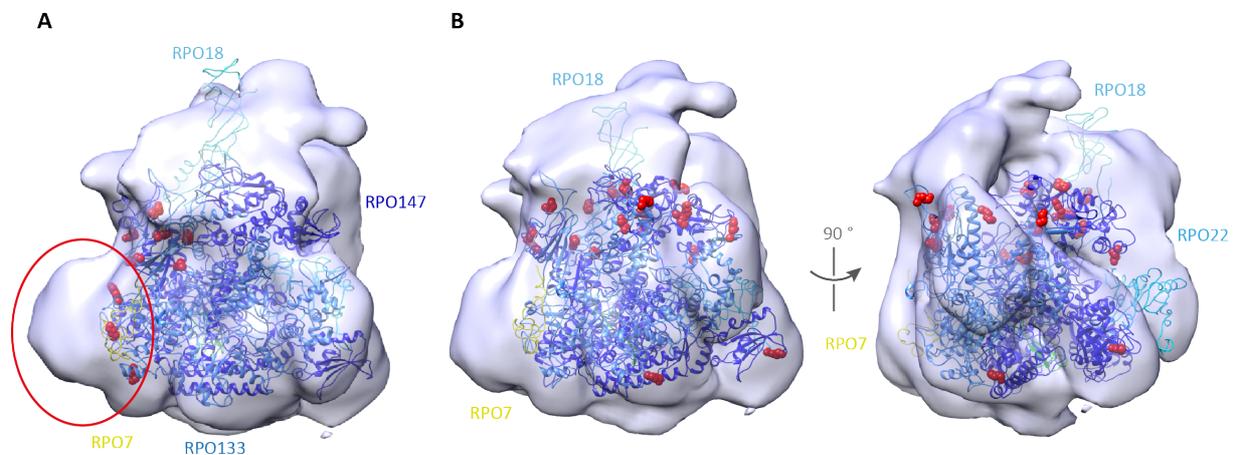


Abbildung 22: Quervernetzungen von RPO35 und RAP94 mit den zur Pol II homologen Untereinheiten der vvrPO

Das Homologie-Modell der vvrPO (SWISS-MODEL), basierend auf der Homologie zur zellulären Pol II, wurde für die Auswertung der Quervernetzungsexperimente in die Kryo-EM Oberflächenstruktur von Komplex I gefittet (A-B) (Abbildung 19). Ausschließlich Quervernetzungen mit einem Gütefaktor von mindestens 5 sind in der Auswertung dargestellt. Quervernetzte Lysinreste jeweils für RPO35 (A) oder RAP94 (B) sind in Kugeldarstellung (rot) gezeigt. Die Oberflächenstrukturen von Komplex I wurden um die horizontale Achse um 90° rotiert (B).

Aus Abbildung 22B ist ersichtlich, dass die Mehrzahl der Quervernetzungen zwischen RAP94 und dem Holoenzym der vvrPO sich im Bereich von RPO18 gruppiert. RPO18 besitzt eine Sequenzhomologie zu RPB7, welche zusammen mit RPB4 den Stiel der Pol II ausbildet. Ihn Anlehnung an die topologische Bezeichnung der zellulären Pol II wird der Bereich, welcher durch RPO18 definiert ist, ebenfalls als Stiel der vvrPO deklariert. Auch in diesem Bereich der Kryo-EM Struktur von Komplex I befindet sich eine zusätzliche Dichte, welche RAP94 beherbergen könnte (Abbildung 22B). Trotz einzelner starker Quervernetzungen, welche aus den Untersuchungen für RAP94 resultierten, war es zu diesem Zeitpunkt ein eindeutiges Docking in die EM-Dichte von Komplex I nicht möglich.

4.7.4 Atomare Struktur von E11 weist eine Dimerisierung des Proteins auf

E11 ist in meiner Arbeit als neue Komponente von Komplex II der vvrPO identifiziert worden. Durch funktionelle Studien konnte bereits gezeigt werden, dass E11 offensichtlich

für die virale Replikation relevant ist (Abbildung 15). E11 sollte daher neben der funktionellen Charakterisierung auch einer detaillierten strukturellen Untersuchung unterzogen werden. Für die strukturelle Charakterisierung wurde für E11 eine zweistufige Reinigungsstrategie gewählt. Anschließend an eine rekombinante Herstellung von E11 im bakteriellen Expressionssystem, sollte eine Affinitätsaufreinigung über eine GSH-Matrix mit einer darauffolgenden Gelfiltrationschromatografie zur weiteren Säuberung durchgeführt werden.

Für die bakterielle Expression, wurde E11 als Fusionsprotein mit einem N-terminalen GST-Tag versehen, wobei ein GST-Tag oftmals die Expressionsrate und gleichzeitig die Löslichkeit eines rekombinant exprimierten Proteins erhöht. Anschließend an die bakterielle Expression wurde GST-E11 mittels Glutathion-Sepharose-Matrix immobilisiert und durch PreScission Protease (PSP)-Verdau von der Matrix freigesetzt. Zur Kontrolle der Expression und zur Überprüfung der einzelnen Aufreinigungsschritte, wurde bei jedem Teilschritt eine Probe entnommen und über eine Bis-Tris SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 23A). Im zweiten Teil der Reinigungsstrategie wurde E11 einer Gelfiltrationschromatografie mittels HiLoad 26/60 Superdex 75 unterzogen (Abbildung 23B). Das Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatografie zeigt, dass E11 vermutlich als Dimer vorliegt, da es mit einem ungefähren Molekulargewicht von 28 kDa von der Säule eluiert. Die Peakfraktionen wurden vereinigt, auf 25 mg/ml konzentriert und in enger Kooperation mit Dr. Clemens Grimm (Universität Würzburg, DE) einem Kristallisationscreening unterworfen. In Anwesenheit von Polyethylenglycol (PEG) konnte das Protein kristallisiert werden, wobei die Kristalle bis zu einer Auflösung von 1,9 Å beugten. Da keine nennenswerten Sequenzhomologien zu anderen Proteinen mit bereits gelöster Struktur zu erkennen waren, wurde ein Screening nach geeigneten Schwermetallderivaten für die *de novo* Strukturaufklärung durchgeführt. Ein Datensatz mit Ethylquecksilberthiosalicylat (EMTS) derivatisierter Kristalle zeigte ein starkes anomales Signal und erlaubte so die Lokalisation von Schweratompositionen mit SHELX. Der so generierte fasiierte Datensatz erlaubte das automatische Bauen des Proteinmodells von E11. Die asymmetrische Einheit der Kristallstruktur weist zwei Moleküle von E11 auf, welche sehr enge Kontakte über vier β -Faltblätter besitzen. Eine Untersuchung mit PISA weist diesen Molekülkontakt als ein mit an Sicherheit grenzende Wahrscheinlichkeit biologisch relevanten Dimerisierungskontakt auf [90].

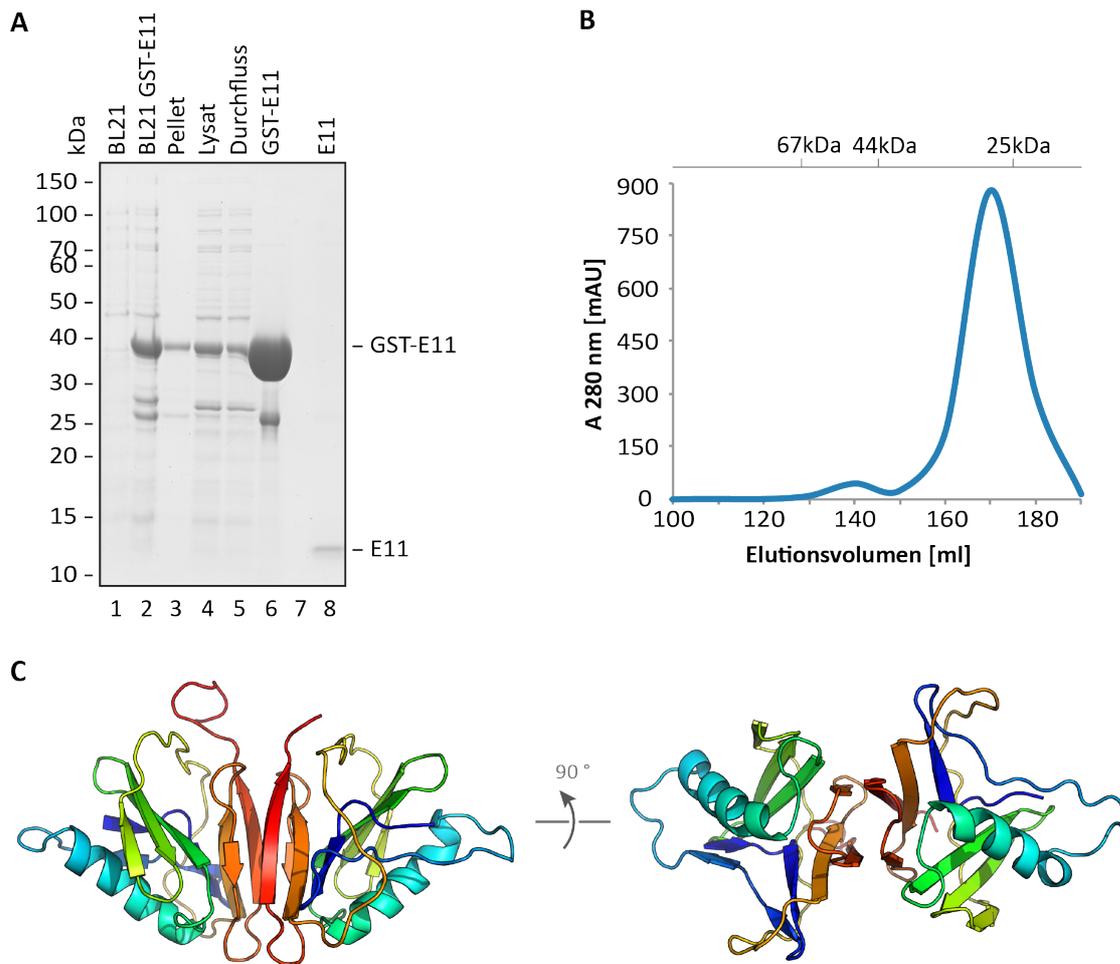


Abbildung 23: Mehrstufige Reinigungsstrategie mit der resultierenden atomaren Struktur von E11

(A) Expression von GST-E11 in BL21 Rosetta(DE3)pLysS für 20 h bei 15°C. Aufreinigung mittels Glutathion-Sepharose-Matrix (Spur 6) und anschließenden PreScission Protease Verdau (Spur 8). (B) Elutionsprofil der Gelfiltrationschromatografie über eine Superdex 75 (HiLoad 26/69). (C) Seitenansicht und Aufsicht der Kristallstruktur von E11 mit einer atomaren Auflösung von 1,9 Å.

5 Diskussion

Durch den erfolgreichen Einsatz als Vakzin gegen Pocken und als vielversprechendes onkolytisches Virus in der Tumorthherapie, ist das VACV seit Jahrzehnten im Fokus der biomedizinischen Forschung. Daher erscheint ein detailliertes Verständnis über alle Aspekte des viralen Lebenszyklus von großer Bedeutung, sowohl in der Grundlagenforschung, als auch in der angewandten biomedizinischen Forschung. Ein zentraler Aspekt dieser Studien ist naturgemäß das Verständnis über die virale Replikation, welche ausschließlich im Zytoplasma der Wirtszelle stattfindet. Die damit verbundene Unabhängigkeit bedingt eine Virus-spezifische Genexpressionsmaschinerie, die nahezu vollständig separiert von der Wirtszelle agiert [9]. So ist klar geworden, dass eine große Anzahl von Virus-spezifischen Enzymen, sowohl die DNA-Replikation, als auch die mRNA-Synthese (Transkription und Prozessierung) vermittelt.

Eine entscheidende Rolle bei der mRNA-Synthese spielt die makromolekulare RNA-Polymerase des VACV (vRPO), die offensichtlich völlig ohne Wirts-Transkriptionsfaktoren die virale Genexpression innerhalb des Zytoplasmas gewährleistet [9]. Zwar wurden in den letzten Jahren wichtige Studien zur biochemischen Zusammensetzung und Aktivität der Transkriptionsmaschinerie durchgeführt. Aber weder der Zusammenlagerungs-Prozess der vRPO *in vivo*, noch deren räumliche und zeitliche Interaktion mit Transkriptions- oder Prozessierungsfaktoren konnten bis heute im Detail geklärt werden.

Die hier vorliegende Arbeit fokussierte sich daher auf die Etablierung eines effizienten Aufreinigungsprotokolls für die native Isolierung der vRPO und seiner assoziierten Faktoren. Die Verfügbarkeit des nativen Enzymkomplexes sollten als Basis für detaillierte Einblicke in die Struktur, Zusammenlagerung und die Komposition des VACV Transkriptionssystems dienen.

1.1 Replikationsverhalten der rVACV GLV-1h439 und GLV-1h440

Als Basis für die Aufreinigung der viralen Transkriptionsmaschinerie dienten zwei rekombinante Viren (GLV-1h439, GLV-1h440), welche RPO133 als FLAG-Fusion exprimierten. Die Viren leiteten sich vom rVACV GLV-1h68 ab und zeigten im Vergleich zu diesem keine Beeinträchtigung im Replikationsverhalten [8]. Dies ließ sich sowohl anhand der Expression des GFP-Markergens (Abbildung 5) als auch anhand eines quantitativen Replikationstests (Abbildung 6) zeigen. Die Insertion des Affinitätstags (HA/FLAG) hatte daher weder bei GLV-1h439 noch bei GLV-1h440 einen messbaren Einfluss auf die Replikation des rVACV bzw. auf die Infektiosität neu gebildeter Viruspartikel. Es wurde folglich als wahrscheinlich angesehen, dass sich die Genexpressionsmaschinerien der rVACV nicht vom wildtypischen Virus unterscheiden und daher für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente geeignet waren.

1.2 Aufreinigung von RPO133 offenbart eine große Anzahl von viralen Interaktionspartnern

Für die ersten Schritte in Richtung einer biochemischen Charakterisierung der viralen Transkriptionsmaschinerie wurde die FLAG-fusionierte Untereinheit RPO133 durch Affinitätsreinigung aus infizierten Zellen isoliert (Abbildung 7). Diese Reinigung stellte sich als äußerst effizient heraus, da unter nativen Bedingungen nahezu 80 % des exprimierten FLAG-RPO133 aus infizierten Zellen gewonnen werden konnte. Das Eluat enthielt, wie erhofft, nicht nur RPO133, sondern auch alle bekannten basalen Faktoren, welche mit der frühen viralen Transkription in Verbindung gebracht wurden. So zeigten erschöpfende massenspektrometrische Analysen, dass das Immunpräzipitat zusätzlich zu den in stöchiometrischen Mengen vorhandenen Untereinheiten des vRPO Holoenzym (RPO147, RPO133, RPO35, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18, RPO7), auch RAP94 enthielt. RAP94 wird spät in der viralen Transkription exprimiert und agiert ausschließlich in der frühen Transkription als assoziierter Faktor der vRPO [59]. Zudem konnten das Capping-Enzym (D1, D12), VETF (A7, D6), NPH I und E11 als biochemische Komponenten des Immunpräzipitates identifiziert werden (Abbildung 7-8). Die Reinigung der vRPO machte dementsprechend deutlich, dass es möglich war, die komplette vRPO zusammen mit ihren Prozessierungsfaktoren und Proteinen der frühen Transkription zu präzipitieren.

1.3 vvrPO ist in mindestens zwei distinkten Komplexen organisiert

Die Affinitätsreinigung aus infizierten Zellen machte deutlich, dass sich die Untereinheiten der vvrPO zusammen mit den Prozessierungsfaktoren in größeren Molekülverbänden befinden. Dies ließ sich durch Dichtegradientenzentrifugation eindrucksvoll bestätigen. Hierbei zeigte sich, dass sich im eluierten FLAG-Immunpräzipitat mindestens zwei leicht voneinander trennbare makromolekulare Komplexe befanden (Abbildung 8A).

Komplex I: Der erste Komplex (Komplex I mit 575 kDa) besteht aus allen Untereinheiten des Holoenzym der vvrPO, sowie den Komponenten RAP94 und D6 (Abbildung 8B). D6 lagert sich mit A7 zum heterodimeren Transkriptionsfaktor *VETF* zusammen, wobei beide Untereinheiten essentiell für die virale Replikation sind [66]. Bereits in den späten 80ziger Jahren konnte der Nachweis gebracht werden, dass ausschließlich das Holoenzym der vvrPO, zusammen mit RAP94 und *VETF*, für eine *in vitro* Transkription eines DNA Templates unter der Kontrolle eines frühen viralen Promotors benötigt werden [60]. *VETF* bindet hierbei die frühen Promotoren der viralen DNA und rekrutiert das Holoenzym der vvrPO zusammen mit RAP94 zum Promotor, wobei die Rekrutierung durch eine Interaktion von *VETF* mit RAP94 ausgelöst wird [65, 66]. Fehlt RAP94, kommt es sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu keiner Interaktion zwischen *VETF* und der vvrPO, was die Bedeutung von RAP94 als Brückenelement zwischen den beiden Faktoren hervorhebt [66]. Zudem konnte Yang et al. belegen, dass für diese Interaktion beide Untereinheiten A7 und D6 von *VETF* essentiell sind [66]. Die Frage, ob es sich hierbei um eine transiente oder dauerhafte Interaktion zwischen A7 und D6 handelt, bleibt jedoch weitgehend offen [66]. In einer *in vitro* Bindungsstudie zeigte sich, dass ein funktioneller Präinitiationskomplex gebildet wird, wenn man eine RAP94-assoziierte vvrPO mit einem frühen Promotor Template, welches bereits *VETF* gebunden hat, inkubiert [64]. Bis heute fehlt jedoch der Nachweis *in vivo*, ob sich der Präinitiationskomplex vor oder nach der Bindung von *VETF* am Promoter zusammenlagert. Demnach ist unklar, ob *VETF in vivo* bereits die Promotorsequenz auf der viralen DNA gebunden hat, bevor die Interaktion mit RAP94 und dementsprechend mit vvrPO, zustande kommt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich bei Komplex I um zwei partiell ko-sedimentierende Komplexe handelt. Dies lässt sich daraus schließen, dass RAP94 ausschließlich in den Gradientenfraktionen 11-12 zu finden ist, obwohl alle anderen biochemischen Komponenten von Komplex I, darunter die acht Untereinheiten des Holoenzym der vvrPO und die kleine Untereinheit D6 von *VETF*, bereits in der

Gradientenfraktion 10 sedimentieren. Dies würde bedeuten, dass die kleine Untereinheit D6 von *VETF* erst mit dem Holoenzym der vvRPO interagiert, bevor die Interaktion mit RAP94 zustande kommt.

Im Anbetracht dessen, könnte es sich bei Komplex I um eine stabile Untereinheit des Präinitiationskomplex handeln, welcher zur Bindung an den frühen viralen Promoter lediglich die große Untereinheit A7 von *VETF* fehlt (Abbildung 24). Für diese Hypothese würde zudem die Tatsache sprechen, dass Komplex I im durchgeführten *in vitro* Transkriptionsstudien keine Aktivität aufweist (Abbildung 9). Die Verfügbarkeit von nativem und hoch-reinem Komplex I lässt eine Funktionsanalyse durch *in vitro* Transkriptionsstudien machbar erscheinen. Im oben skizzierten Falle müsste demnach, durch die Komplementierung des *in vitro* Transkriptonssystems (Abbildung 9) mit isolierter Untereinheit A7 von *VETF*, die Transkription von frühen Promotoren erfolgen.

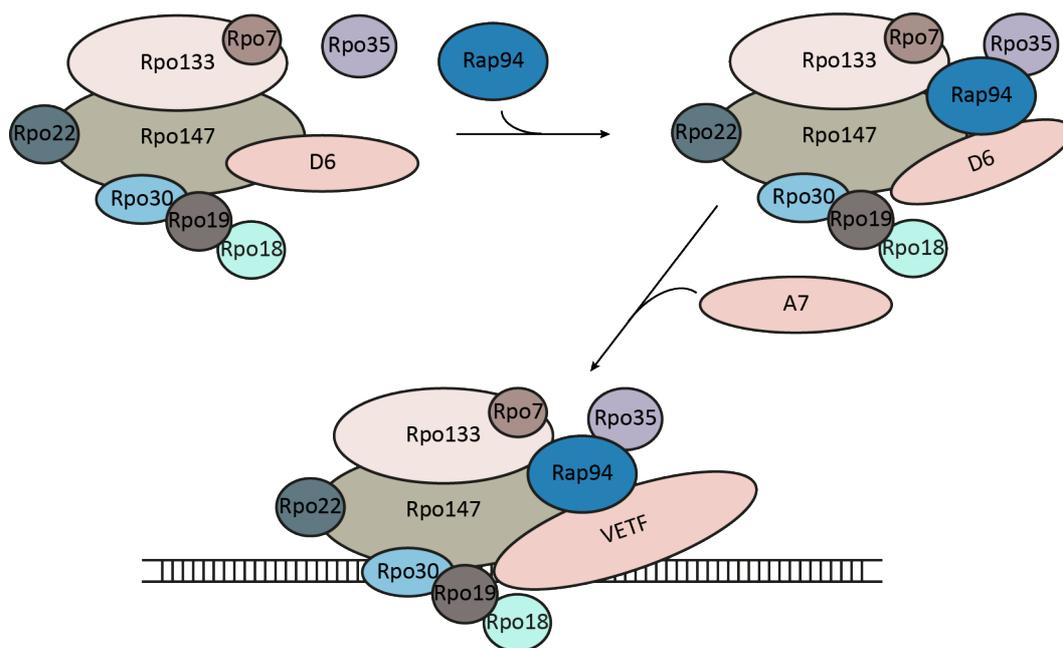


Abbildung 24: Model zur Formation des Präinitiationskomplexes an frühen, viralen Promotoren

Entsprechend der Resultate (Abbildung 8-9) wäre folgendes Model für die Funktion von Komplex I denkbar: Erst interagiert die kleine Untereinheit D6 von *VETF* mit der vvRPO (Abbildung 8A, Spur 10), woraufhin die Interaktion mit RAP94 zustande kommt (Abbildung 8A, Spur 11-12). Demzufolge würde sich erst im letzten Schritt Komplex I mit A7 zusammenlagern, ein funktionelles Heterodimer von *VETF* ausbilden und so mit der viralen DNA interagieren.

Komplex II: Diese Einheit ist, aufgrund einer ganzen Reihe von weiteren Faktoren wesentlich größer als der zuvor beschriebene Komplex I. Er enthält neben den Untereinheiten des Holoenzym der vVRPO, beide Untereinheiten des Capping-Enzyms (D1, D12), A7, den Terminationsfaktor NPH I und E11, einem bislang unbekanntem Polymerase-assoziierten Faktor (Abbildung 8A-B). Es ist nicht völlig ausgeschlossen, dass sich hinter Komplex II mehrere ähnlich sedimentierende Einheiten verbergen. Jedoch halte ich dieses für äußerst unwahrscheinlich, da die Ko-Sedimentation aller Einheiten auch bei unterschiedlichen Aufreinigungen und bei Variation der Gradientenbedingungen sehr offensichtlich war (Daten nicht gezeigt).

Es stellt sich die Frage nach der funktionellen Bedeutung eines aus dem vVRPO-Holoenzym und einer großen Anzahl von Prozessierungsfaktoren bestehenden Komplexes. Im Fall der eukaryotischen Pol II ist bekannt, dass die Faktoren für Capping, Spleißen und Polyadenylierung ko-transkriptionell in einer definierten Prozessabfolge agieren. Zum Beispiel wird das Capping-Enzym durch die Phosphorylierung von Serin 5 innerhalb der CTD ab einer Länge der naszierenden RNA von 13 Nukleotiden rekrutiert [91, 92]. Anschließend folgen die weiteren ko-transkriptionellen Prozessierungen. Hier ist also nicht zu erwarten, dass alle Prozessierungsfaktoren gleichzeitig, sondern eher sequentiell mit der Polymerase interagieren. Die CTD (bzw. eine CTD-äquivalente Domäne) ist jedoch bei der vVRPO nicht zu erkennen, sodass bislang unklar ist, ob sämtliche Prozessierungsschritte ko- oder post-transkriptional erfolgen. Bisher konnte ausschließlich durch *in vitro* Transkriptionsstudien gezeigt werden, dass ab einer mRNA Länge von ca. 31 Nukleotiden sich das Capping-Enzym *VTF* an das 5'-Ende der RNA anlagert und die Bildung des m⁷G-Caps katalysiert [93].

Interessanterweise werden die identifizierten Prozessierungsfaktoren von Komplex II (A7, NPH I, E11) spät in der Transkription exprimiert, was ihre Bedeutung in der frühen Transkription hervorhebt. Eine Ausnahme in diesem Zusammenhang stellt das virale Capping-Enzym dar, dessen Untereinheiten D1 und D12 einen frühen und einen späten Promotor besitzen. Dies ist vermutlich damit zu erklären, dass das Capping-Enzym zusätzliche Funktionen bei der Initiation der mittleren Transkription ausübt [94-96]. In Anbetracht aller bislang verfügbaren Befunde lässt die biochemische Komposition von Komplex II, mit mindestens zwei funktionellen Einheiten, in unterschiedlichen Replikationsstadien in Einklang bringen. Zum einen könnte es sich um die vVRPO handeln, welche in neue Viruspartikel verpackt wird um in der darauffolgenden Infektionsrunde in der

frühen Transkription aktiv zu werden. Für diese Hypothese würde vor allem sprechen, dass Komplex II transkriptionell am frühen Promotor *in vitro* aktiv war (Abbildung 9). Dies bedeutet jedoch, dass in diesem Komplex die kleine Untereinheit D6 von *VETF* in substöchiometrischen Mengen vorhanden sein müsste, um das für die Transkription notwendige *VETF* Heterodimer zu bilden und bei Re-Infektion die basale frühe Transkription starten zu können [97].

In einer Studie von Zhang et al. über die Funktion von RAP94 konnte gezeigt werden, dass RAP94 eine zentrale Rolle im Zusammenlagerungsprozess eines makromolekularen Transkriptionskomplexes einnimmt [98]. Wird die Synthese von RAP94 unterdrückt, werden Enzyme der Genexpressionsmaschinerie und insbesondere Faktoren der frühen Transkription nicht in neu assemblierte Virionen verpackt [98]. Darunter fallen das Holoenzym der vvrPO, das Capping-Enzym, NPH I, NPH II, die Poly(A)-Polymerase und eine Topoisomerase [98]. Interessanterweise sind die Mehrzahl dieser Faktoren, Komponenten vom isolierten Komplex II. Im Gegensatz hierzu ist die Verpackung von *VETF* nicht durch eine Entfernung von RAP94 betroffen [98], obwohl die große Untereinheit A7 eine Komponente von Komplex II darstellt. In der Literatur wurde gezeigt, dass *VETF* über die Bindung an frühe virale Promotoren in neue Virionen verpackt werden kann [65]. Jedoch muss auch mindestens ein weiterer Verpackungsmechanismus für *VETF* in neue Viruspartikel existieren, da sich herausgestellt hat, dass sich trotz gestörter DNA Verpackung reduzierte Mengen an *VETF* in den Virionen befinden [99]. Im Zusammenhang mit der skizzierten Hypothese, dass es sich bei Komplex II um einen Verpackungskomplex der vvrPO handelt, könnte dies erklären, warum die große Untereinheit A7 von *VETF* eine Komponente von Komplex II dargestellt.

Zum Anderen könnte Komplex II einen Übergangszustand darstellen, welcher sich gerade in der Transition zwischen der Transkriptionsinitiation und -elongation befindet. In der Literatur konnte nachgewiesen werden, dass sowohl NPH I, als auch *VETF*, mit dem N-terminalen Bereich von RAP94 interagieren [66, 74, 100]. Es wurde daher vermutet, dass *VETF* erst vom Initiationskomplex an der viralen DNA dissoziiert, bevor NPH I zusammen mit dem Capping-Enzym an die vvrPO und RAP94 binden kann, um einen Elongations- und Terminationskomplex auszubilden (Abbildung 4). Yang konnte jedoch belegen, dass beide Proteine (*VETF* und NPH I) simultan an RAP94 binden können [66]. So könnte Komplex II den Komplex darstellen, welcher beide Proteine (NPH I und *VETF*) gebunden hat, bevor *VETF*

vom Komplex dissoziiert und die Transkription in die Elongationsphase übergeht. Da jedoch ausschließlich A7 als stöchiometrische Komponente in Komplex II vorhanden ist, würde diese Hypothese davon ausgehen, dass *VETF* schrittweise vom Komplex dissoziiert.

Aufgrund gegenwärtiger Datenlage lässt sich jedoch nicht eindeutig vorhersagen, welche Funktion Komplex II im Kontext der viralen Replikation einnimmt. Weiterführende funktionelle und strukturelle Untersuchungen werden hier in kürze Aufschluss geben können. So sollte zum Beispiel eine Isolation der vVRPO aus gereinigten Virionen aufzeigen, ob es sich bei Komplex II um einen Verpackungskomplex der vVRPO handelt.

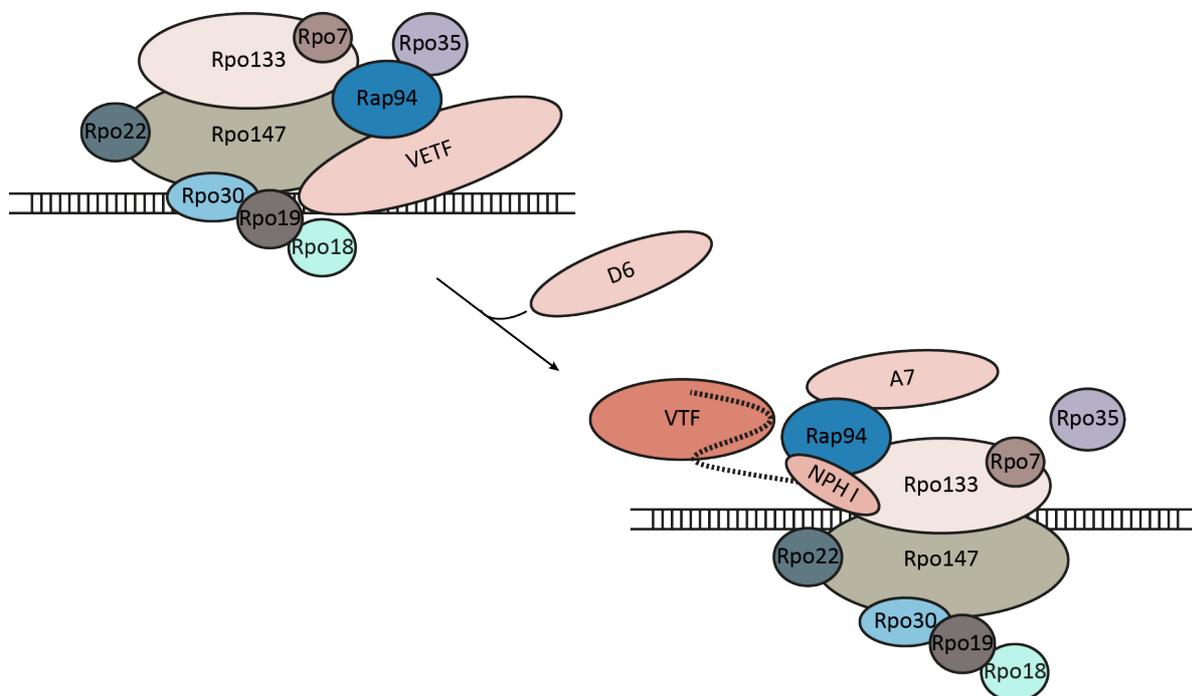


Abbildung 25: Model einer möglichen Funktion von Komplex II als Übergangskomplex zwischen Transkriptionsinitiation und Transkriptionselongation

Komplex II könnte in der viralen frühen Transkription eine Art Übergangskomplex darstellen. So wäre es denkbar, dass im ersten Schritt nach der Transkriptionsinitiation die kleine Untereinheit D6 von *VETF* vom Initiationskomplex dissoziiert und sich die Transkriptionsfaktoren, wie das Capping-Enzym und NPH I, an die vVRPO anlagern. Abschließend würde es zur Dissoziation von A7 kommen.

1.4 Nativer RNA Polymerase Komplex II interagiert mit zwei neuen Komponenten

Für eine detaillierte Untersuchung der frühen viralen Genexpressionsmaschinerie wurde besonderen Wert auf die Identifikation und die damit verbundene biochemische und strukturelle Charakterisierung neuer Interaktionspartner gelegt. Interessanterweise konnten keine Hinweise auf Wirts-Faktoren gefunden werden, die mit den identifizierten Komplexen in Wechselwirkung treten. Ich konnte hingegen zeigen, dass Komplex II mit den tRNAs für Glutamin und Arginin ($tRNA^{Gln}$, $tRNA^{Arg}$), sowie dem viralen Faktor E11 (14 kDa) ko-sedimentierte und daher sehr wahrscheinlich mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren (Abbildung 8, 11, 12).

1.4.1 $tRNA^{Gln}$ und $tRNA^{Arg}$ als RNA Komponenten von Komplex II

In den letzten Jahren wurden vermehrt RNAs als Struktur- und Funktionsgebende-Komponenten makromolekularer Komplexe identifiziert. Aus diesem Grund wurden beide Komplexe der vVRPO auf eine RNA Komponente getestet und Komplex II konnte als RNP mit zwei RNA Komponenten ($tRNA^{Gln}$, $tRNA^{Arg}$) identifiziert werden (Abbildung 12). Zudem konnte beobachtet werden, dass es sich bei den RNA Komponenten um nicht stöchiometrische Faktoren von Komplex II handelt, da sie in einem unterrepräsentierten Verhältnis zu den Proteinkomponenten von Komplex II auftreten.

Es stellte sich die Frage nach der Funktion der tRNAs im Kontext der viralen Transkription. Eine unspezifische Assoziation erscheint unwahrscheinlich, da man hier vermuten würde, dass unterschiedliche RNA Spezies dies gleichermaßen tun würden. Einen Hinweis auf eine Funktion könnten aber erst kürzlich erhaltene Daten geben die zeigten, dass das VACV Glutamin, anstatt Glukose als kritischen Energielieferant für eine effiziente Virusreplikation benötigt [101]. In Säugerzellen sind, sowohl Glukose, als auch Glutamin primäre Metaboliten der Energie-Homöostase. Glukose wird anaerob in der Glykolyse oxidiert und dann über den Citratzyklus in die aerobe Zellatmung eingeschleust, wobei ATP generiert wird. Werden Kohlenstoffatome, welche durch Glukose und damit durch die Glykolyse in den Citratzyklus eingebracht wurden, aus dem Citratzyklus abgeleitet, wie es bei vielen Krebszellen der Fall ist, kann Glutamin dazu verwendet werden, den Citratzyklus wieder mit Intermediaten aufzufüllen (anaplerotische Reaktion) [102]. Fontaine konnte jedoch nachweisen, dass durch eine VACV Infektion keine Induktion der Glykolyse hervorgerufen wird, wie dies bei vielen

anderen Virus-Infektionen der Fall ist [101, 103]. Entzieht man VACV-infizierten Zellen exogene Glukose, hat dies keinen signifikanten Effekt auf die Virus Replikation [101]. Dies bedeutet, dass Glukose weder die essentielle Kohlenstoffquelle noch die essentielle Energiequelle für das VACV darstellt. Stattdessen konnte beobachtet werden, dass exogenes Glutamin benötigt wird, um den Citratzyklus aufzufüllen [101]. Hierfür wird Glutamin über zwei Desaminierungsreaktionen zu α -Ketoglutarat umgewandelt und als Intermediat in den Citratzyklus eingeschleust [101]. Entzieht man zum Beispiel infizierten Zellen Glutamin, kommt es zu einem dramatischen Abfall in der Virus Produktion [101]. Jedoch kann durch eine Zugabe von Intermediaten des Citratszykluses wie zum Beispiel α -Ketoglutarat und Oxalacetat oder durch die Zugabe von Pyruvat die Reproduktionsfähigkeit des VACV fast vollständig wieder hergestellt werden [101]. Obwohl diese Zugabe von Intermediaten des Citratzyklus die Virusproduktion signifikant wieder herstellen kann, konnte keine vollständige Erholung beobachtet werden [101]. Dies liegt an der Tatsache, dass Glutamin zusätzlich als Stickstoff-Donor für die Nukleotidbiosynthese dient. So spielt Glutamin eine duale Rolle im Metabolismus von infizierten Zellen [101]. Wie jedoch die Glutaminolyse, während der Infektion der Zelle mit dem VACV induziert wird, ist noch vollständig unklar. Es erscheint daher möglich, dass die Interaktion der $tRNA^{Gln}$ und $tRNA^{Arg}$ mit Komplex II den Energiestatus/Metabolismus-Status der Wirtszelle mit der Replikation verknüpft. So könnte das VACV über den Beladungszustand der Zelle den Energiestatus der Zelle detektieren und dementsprechend als eine Art Metabolismus-Sensor fungieren.

Eine weitere Funktion der tRNAs könnte struktureller Natur sein bzw. die Funktion von gebundenen Proteinen oder makromolekularen Proteinkomplexen beeinflussen. Ein besonders beeindruckendes Beispiel in diesem Zusammenhang, ist die nicht-codierende Y RNA, welche das bakterielle Rsr Protein an die ringförmige Exoribonuklease PNPase bindet [104, 105]. Das hierbei entstehende RNP weist eine doppelte Ringstruktur auf und es entsteht die Möglichkeit das Rsr strukturierte RNAs in die Öffnung der Ringstrukturen dirigiert, um die RNAs dort abzubauen [104]. Durch eine Interaktion mit einer nicht-kodierenden RNA kann also die Funktion von makromolekularen Komplexen geändert oder induziert werden. Es ist vorstellbar, dass die tRNAs im Kontext von Komplex II als Bindeglied zwischen dem Holoenzym und dem einen oder anderen Prozessierungsfaktor dienen. Dieses Modell würde implizieren, dass ein vollständiger RNase Verdau von Komplex II mit der Dissoziation von Faktoren einhergeht. Erste Versuche die ich im Rahmen dieser Arbeit

durchgeführt habe, ergaben diesbezüglich jedoch keine eindeutigen Ergebnisse, da sich die tRNAs nur partiell abbauen ließen, was auf deren massiven Schutz hindeutet (Abbildung 13-14).

1.4.2 E11 ist ein bislang nicht bekannter Interaktionspartner der vVRPO

Wie die massenspektrometrische Analyse von Komplex II ergab, interagiert E11 als bisher unbekannter Interaktionspartner mit der vVRPO. Ebenso wie weitere interagierende Prozessierungsfaktoren (NPH I, *VETF*) der frühen Transkription wird E11L spät in der viralen Transkription exprimiert. Bis heute konnte E11 keinen definierten Prozess in der viralen Replikation zugeordnet werden. Es ist ausschließlich bekannt, dass bei einer temperatursensitiven Mutation (ts49 Mutante) des viralen E11L Genes ein massives Replikationsdefizit auftritt, sobald die Temperatur von einer permissiven (31 °C) zu einer nicht-permissiven (40 °C) Temperatur angehoben wird [106]. Bei einem Vergleich zwischen der ts49 Mutante und einem Wildtyp-VACV konnte bei permissiver Temperatur beobachtet werden, dass der Wildtyp durchschnittlich 50 % mehr Viruspartikel produziert. Bei der nicht-permissiven Temperatur kommt es zu fast keiner Produktion von Viruspartikeln durch die ts49 Mutante [106]. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass das Level der Proteinsynthese in der ts49 Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, bei beiden Temperaturen (permissive und nicht-permissive) unverändert bleibt und die Mutation damit keinen Einfluss auf die Proteinsynthese ausübt [106].

Durch einen quantitativen Replikationsassay, konnte in dieser Arbeit E11 als wichtiger Faktor in der viralen Replikation verifizieren werden (Abbildung 15). Interessanterweise zeigte jedoch die Aufreinigung der vVRPO, nach einer RNA Interferenz-vermittelten Inaktivierung von E11, keinen Unterschied in ihrer biochemischen Komposition (Abbildung 16). Dies deutet an, dass E11 ein peripherer Faktor des Komplexes II ist und das dessen Fehlen nicht mit dem gleichzeitigen Verlust anderer Untereinheiten einhergeht.

Die bedeutende Frage in diesem Kontext wäre, ob die Unterdrückung der Synthese von E11 und die damit einhergehende geringe Infektiösität neuer Virionen, mit einem biochemischen Defekt korreliert. Dies konnte zum Beispiel für die ts-Mutante des H4L-Gens, welches für RAP94 kodiert, nachgewiesen werden [107]. Wird die Synthese von RAP94 behindert, werden bestimmte Enzyme für die virale frühe Transkription nicht in neu assemblierte Virionen verpackt [98]. Im Fall von E11 konnte bis heute jedoch kein

spezifischer biochemischer Defekt, mit dem Fehlen der Infektiösität nach einer E11 Inaktivierung, in Verbindung gebracht werden. Um weitere Hinweise auf eine etwaige Funktion von E11 zu erhalten, wäre die Generierung eines rekombinanten Virus mit einem IPTG-induzierbaren E11L-Gen denkbar. Durch diesen Virus würde die Möglichkeit geschaffen, sowohl die Replikationsfähigkeit, als auch die biochemische Komposition der nativen vvrPO Komplexe unter induzierten und nicht-induzierten Bedingungen zu testen.

1.5 vvrPO weist massive strukturelle Ähnlichkeit zur zellulären Pol II auf

Zusätzlich zur biochemischen Charakterisierung wurde in dieser Arbeit eine strukturelle elektronenmikroskopische Analyse beider nativer vvrPO Komplexe (Komplex I, Komplex II) durchgeführt. Für beide Komplexe konnte eine Kryo-EM-Struktur mit einer Auflösung von 11-12 Å generiert werden (Abbildung 19, 21). Bei der Betrachtung der Kryo-EM-Strukturen fällt deren strukturelle Ähnlichkeit zur zellulären Pol II auf, weshalb die atomare Struktur der transkribierenden Pol II (5FLM, RCSB PDB) als Vergleich für unsere strukturellen Analysen verwendet wurde (Abbildung 19, 21) [87]. Zusätzlich wurden zur besseren Lokalisierung der Untereinheiten, innerhalb der Kryo-EM-Dichte und zur detaillierten Identifikation des Interaktionsnetzwerkes der vvrPO, Quervernetzungsexperimente mit gekoppelter MS-Analyse mit beiden Komplexen durchgeführt (Abbildung 22).

So wurde zur näheren Untersuchung von Komplex I die atomare Struktur der Pol II in die Kryo-EM-Dichte eingepasst (Abbildung 19). Komplex I besitzt eine theoretische Masse von 575 kDa und besteht aus den acht Untereinheiten des vvrPO Holoenzym zusammen mit RAP94 und der kleinen Untereinheit D6 von *VETF*. Bereits 2008 konnte Knutson, anhand einer bioinformatischen Auswertung über HHpred nachweisen, dass sieben (RPO147, RPO133, RPO30, RPO22, RPO19, RPO18, RPO7) der acht Polymeraseuntereinheiten eine limitierte Homologie zu Untereinheiten der zellulären Pol II aufweisen (Tabelle 1) [58]. Die einzige Untereinheit ohne eine homologe Entsprechung in der Pol II stellt RPO35 dar. Aus den beobachteten Homologien wurde schließlich eine Strukturvorhersage für die vvrPO im Vergleich zur Pol II veröffentlicht [58], welche als Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen während meiner Arbeit verwendet wurde (Abbildung 26). Die höchste Sequenzhomologie, mit ungefähr 20 % besteht zwischen den beiden großen Untereinheiten der vvrPO (RPO147, RPO133) und der Pol II (RPB1,RPB2). Im Falle der Pol II bilden diese Untereinheiten die charakteristische Klauenform der zellulären Polymerasen aus und beherbergen das

katalytische Zentrum. Man kann daher davon ausgehen, dass auch im Fall der vvRPO die beiden homologen Untereinheiten eine entsprechende strukturelle und katalytische Rolle spielen.

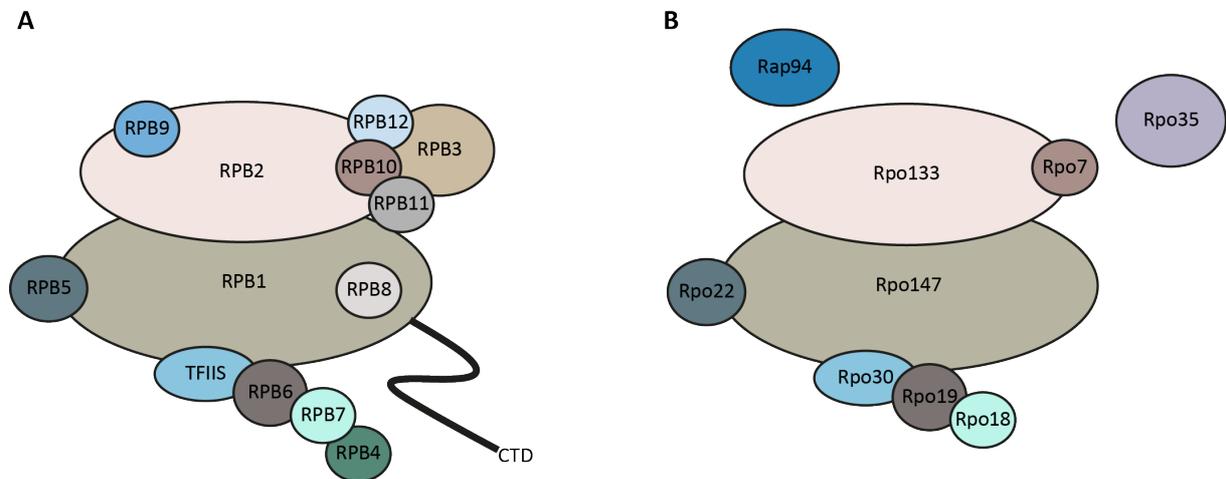


Abbildung 26: Strukturvorhersage der vvRPO im Vergleich zur zellulären RNA Polymerase II

Vorhergesagte Interaktionsstruktur der vvRPO (B), basierend auf der Homologie zur zellulären Pol II (A), anhand einer durchgeführten HHpred Analyse. Proteine, die eine limitierte Sequenzhomologie besitzen, sind in der gleichen Farbe dargestellt. Die Abbildung wurde adaptiert und modifiziert von [58].

Interessanterweise besitzt die vvRPO kein Homolog für die Untereinheit RPB3 der Pol II [58]. RPB3 ist ein Hauptbestandteil einer der drei Subkomplexe, welche während der Biogenese der Pol II gebildet werden [108]. RPB3 rekrutiert die Untereinheiten RPB10, RPB11 und RPB12 an die beiden großen Untereinheiten RPB1 und RPB2 der Pol II und nimmt so eine entscheidende Rolle bei der Zusammenlagerung der zellulären Pol II ein [108, 109]. Dementsprechend wurde spekuliert, dass RPO35, die keine homologe Entsprechung in der Pol II besitzt, funktionell analog zu RBP3 ist. Jedoch enthält RPO35, weder eine koordinative Metall-Bindestelle, noch ein Leucin-Zipper-Motiv, wie die im Fall von RBP3 gefunden wurde [58]. Alternativ wäre es denkbar, dass kein Äquivalent für RBP3 im Zusammenlagerungsprozess notwendig ist, da die vvRPO ebenfalls keine Homologen für RPB11 und RPB12 besitzt [58]. Andererseits konnte mittels Quervernetzungsexperimenten eine starke Interaktion zwischen RPO35 und RPO7 nachgewiesen werden, wobei RPO7 homolog zur Pol II-Untereinheit RPB10 ist. Zudem konnten weitere starke Quervernetzungen zwischen RPO35 und RPO133 beobachtet werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass RPO35 den Platz von RPB3 in der vvRPO einnehmen könnte. Im Gegensatz zu den bisher

diskutierten Ähnlichkeiten zur zellulären Pol II, fallen bei genauerer Betrachtung der Kryo-EM-Struktur von Komplex I, auch gewisse Unterschiede zur Pol II auf (Abbildung 19). Besonders im Bereiches des Stieles, der sich bei der Pol II aus den Untereinheiten RPB4 und RPB7 zusammensetzt, werden diese Unterschiede deutlich, da der vvrPO ein Homolog für RPB4 fehlt. RPO18 zeigt eine limitierte Sequenzhomologie zu RPB7. RPB4 bildet mit RPB7 den heterodimeren Stiel der Pol II und stabilisiert die Interaktion zwischen RPB7 und der Kern-Polymerase [110]. Im Gegenzug hierzu benötigt RPO18 kein Äquivalent zu RPB4, um stabil mit der Polymerase zu interagieren. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei RPO18 um eine essentielle Untereinheit der vvrPO innerhalb der viralen Replikation handelt. So führen Mutationen im D7R-Gen, welches für RPO18 kodiert, zu einer bedingten Letalität [111]. Sowohl für den frühen Transkriptionsfaktor *VETF* mit seiner kleinen Untereinheit D6, welche mit Komplex I ko-sedimentiert, als auch für den, in der frühen Transkription essentiellen Faktor, RAP94 konnte kein Homologe innerhalb der zellulären Pol II oder interagierenden Faktoren nachgewiesen werden. Trotzdem konnte RAP94 durch eine Kombination unserer Quervernetzungsdaten und der Kryo-EM-Dichte um die Region des Stiels der vvrPO lokalisiert werden (Abbildung 22).

So lässt sich festhalten, dass zwar massive strukturelle Ähnlichkeiten zur zellulären Pol II in der Kryo-EM Dichte von Komplex I in der Arbeit aufgezeigt werden konnten, es aber auch durchaus interessante Differenzen zwischen den beiden Polymerasen gibt. Hervorheben möchte ich in diesem Kontext, vor allem RPO35 und seine mögliche Funktion in der vvrPO RPB3 zu ersetzen. Diese Möglichkeit sollte sich, zum Beispiel zielgerichtet durch eine strukturelle Analyse von RPO35 in Verbindung mit den durchgeführten Quervernetzungsexperimenten, erörtern lassen.

Bei der weiterführenden strukturellen Untersuchung von Komplex II stellte sich heraus, dass Komplex I fast vollständig in Komplex II vertreten ist. So besteht Komplex II aus den acht Untereinheiten des Holoenzym der vvrPO zusammen mit RAP94. Im Gegensatz zu Komplex I beinhaltet Komplex II jedoch große Untereinheit A7 von *VETF*, anstelle der kleinen Untereinheit D6 von *VETF*. Zusätzlich erhält der höhermolekulare Komplex noch das virale Capping-Enzym (D1, D12), den Terminationsfaktor der frühen Transkription NPH I und E11 (Abbildung 8). Bei einer Überlagerung der EM-Dichten von Komplex I und Komplex II fällt besonders auf, dass die Dichte für Komplex II im Bereich des Stiels eine erheblich größere Ausdehnung zeigt, was vermutlich auf die in diesem Bereich zusätzlichen lokalisierten

Prozessierungsfaktoren NPH I und Capping-Enzym zurückzuführen ist (Abbildung 21). Diese Lokalisierung wird durch die Daten eines ersten Quervernetzungsexperiments mit Komplex II unterstützt. So existiert zum Beispiel eine starke Quervernetzung mit einem Gütefaktor von 15 zwischen dem Lysinrest K33 von RPO18 und K84 innerhalb der großen Untereinheit D1 des Capping-Enzyms (*VTF*) (siehe 8.3). Außerdem konnte eine starke Quervernetzung zwischen NPH I und RAP94, beobachtet werden (Abbildung 22B). Betrachtet man die Lokalisation von RAP94 in Kombination mit den Quervernetzungsdaten von Komplex II und den aus der Literatur bekannten Angaben über RAP94, so erweist sie sich als wahrscheinlich. So konnte Niles zum einen zeigen, dass sich ein ternärer Komplex zwischen dem viralen Capping-Enzym, RAP94 und NPH I ausbildet [112]. Zum anderen konnten die Quervernetzungsdaten Hinweise, auf eine Lokalisation der Prozessierungsfaktoren im Bereich um RAP94 geben. Trotz einzelner starker Quervernetzungen zwischen RPO18 und dem viralen Capping-Enzym, sowie zwischen RAP94 und NPH I, war jedoch zu diesem Zeitpunkt ein eindeutiges Docking der Capping-Enzym-Struktur in die EM-Dichte von Komplex II nicht möglich. Da in dem dafür in Frage kommenden Bereich um den Stiel der vRPO, noch sehr viel nicht annoncierte Dichte vorhanden ist, die nach Stand der eben diskutierten Dinge, den Faktoren NPH I, A7, RAP94 zuzuordnen ist. Für diese Prozessierungsfaktoren ist noch keine atomare Struktur, welche für ein detailgetreues Docking verwendet werden könnte, verfügbar. Aufgrund der Quervernetzungsdaten vermuten wir, dass auch E11 in diesem Bereich bindet, da es zum Beispiel zwei Quervernetzungen mit den Lysinresten 62 und 122 zum Lysinrest 32 von NPH I ausbildet (Abbildung 22).

Abschließend lässt sich festhalten, dass für beide Kryo-EM Komplexe erste vielversprechende Untersuchungen zu den Interaktionen der vRPO-Untereinheiten untereinander und zu den ko-sedimentierten Prozessierungsfaktoren durchgeführt wurden, welche als Basis weiterer Experimente verwendet werden können.

6 Material & Methoden

6.1 Materialien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von BD Biosciences, Merck, Serva, Sigma-Aldrich, Boehringer Ingelheim, Riedel-de Haen und Roth bezogen. Radiochemikalien stammen von Hartmann Analytic. Verbrauchsmaterialien wurden von Hartenstein, Macherey-Nagel, Eppendorf, Sarstedt, Satorius stedim, Dispomed und Greiner bezogen.

6.1.1 Längenstandards

Spezifität	Herkunft
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

6.1.2 Enzyme

Spezifität	Herkunft
PreScission Protease	Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg
T7 Polymerase	Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg
2x Phusion PCR MasterMix	Thermo Fisher Scientific
FastAP Alkaline Phosphatase (1 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
RNase A (1 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific
RNase T1 (1000 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase (5 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
T4 RNA Ligase (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
T4 Polynucleotide Kinase (10 U/μl)	Thermo Fisher Scientific
Restriktionsenzyme (BamHI, KpnI, NcoI, SmaI, XhoI)	Thermo Fisher Scientific

6.1.3 Kits

Kits	Herkunft
Lipofectamin RNAiMAX	Thermo Fisher Scientific
NEBNext® Small RNA Library Prep Set for Illumina	<i>New England Biolabs GmbH (NEB)</i>
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoBond® PC 500</i>	Macherey-Nagel
<i>The SuperScript III</i> (First-Strand Synthesis System)	Thermo Fisher Scientific
<i>TURBO DNA-free</i>	Thermo Fisher Scientific

6.1.4 Puffer und Lösungen

6.1.4.1 Allgemeine Puffer

Puffer/Lösungen	Komposition
5x TBE (Tris/Borat/EDTA)	445 mM Tris-HCl, pH 8.3 445 mM Borsäure 10 mM Na ₂ EDTA
10x PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)	1.4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄
6x Proteinprobenpuffer	300 mM Tris-HCl, pH 6.8 12% (w/v) SDS 30% (v/v) Glycerin 600 mM DTT 0.04% (w/v) Bromphenolblau

DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin 5 mM Tris HCl, pH 8,0 0,05 mM EDTA 0,04 % (w/v) Bromphenolblau 0,04 % (w/v) Xylencyanol
------------------	---

6.1.4.2 Western-Blot

Puffer/Lösungen	Komposition
10x Towbin	0.25 M Tris 1.92 M Glycin 3,5 mM SDS
1x Towbin WB-Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,35 mM SDS 10 % (v/v) Methanol
Amidoschwarz-Färbelösung	0,2 % Amidoschwarz 10 % (v/v) Methanol 3 % (v/v) Essigsäure
Amidoschwarz-Entfärbelösung	90 % (v/v) Methanol 3 % (v/v) Essigsäure
1x PBS-T (WB-Waschlösung)	100 ml 10x PBS 0,05 % (w/v) Tween
10x NET	1.5 M NaCl 0.05 M NaEDTA, pH 8.0 0.5 M Tris, pH 7.5 0.5 % (v/v) Triton X-100

1x NET-Gelatine Lösung	100 ml 10x NET 900 ml ddH ₂ O 0.25 % (w/v) Gelatine
WB-Detektionslösung 1	1,25 mM Luminol 100 mM Tris HCl, pH 8,5
WB-Detektionslösung 2	6,8 mM p-Cumarinsäure in DMSO

6.1.4.3 Northern-Blot

Puffer/Lösungen	Komposition
20x SSC	3 M NaCl, pH 7,0 0,3 M Natriumcitrat
2x SSC	100 ml 20x SSC 900 ml H ₂ O

6.1.4.4 Agarosegelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Komposition
1x TBE (Laufpuffer)	200 ml 5x TBE 800 ml ddH ₂ O
Agarosegel	0.5 %–2.0 % (w/v) Agarose 1x TBE 5 µg/ml Ethidiumbromid

6.1.4.5 Antibiotika (Stocklösungen)

Puffer/Lösungen	Konzentration	Lösungsmittel
Ampicilin	100 mg/ml	H ₂ O
Chloramphenicol	30 mg/ml	Ethanol
Penicillin/Streptomycin	100x Stocklösung (PAA)	

6.1.4.6 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Puffer/Lösungen	Komposition
LB Medium (Luria Broth)	1,0 % (w/v) Bacto™ Tryptone (BD Biosciences) 0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences) 1,0 % (w/v) NaCl
TB Medium (Terrific Broth)	1,2 % (w/v) Bacto™ Tryptone 2,4 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 0,4 % (v/v) Glycerin 17 mM KH ₂ PO ₄ 72 mM K ₂ HPO ₄
SB Medium (Super Broth)	3,5 % (w/v) Bacto™ Tryptone 2,0 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl

Zur Selektion wurde den Medien 100 µg/ml Ampicillin (Roth) und 30 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) zugegeben. Durch Zugabe von 2 % (w/v) Bacto™ Agar (BD Biosciences) wurden Festmedien hergestellt.

6.1.4.7 Medien und Zusätze für die Gewebekultur

Kulturmedium und –zusätze sowie Antibiotikallösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, von Life Technologies bezogen. Zellkulturutensilien wurden von der Firma Becton Dickinson, Sarstedt, Greiner und TPP bezogen.

Medien	Komposition
Kulturmedium HeLa / CV-1	DMEM 10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep
Kulturmedium HeLa S3	DMEM 5 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep
Kulturmedium A549	RPMI 10 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep
Infektionsmedium	DMEM oder RPMI 2 % (v/v) FBS 1 % (v/v) Pen/Strep
Transfektionsmedium	DMEM 10 % (v/v) FBS

6.1.4.8 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Puffer/Lösungen	Komposition
Bis-Tris SDS-PAGE	5,73 ml Bis-Tris, pH 6,8 (1,25 M)
Trenngel 12 %	8 ml Rotiphorese 30 6,13 ml ddH ₂ O 66,67 µl (v/v) APS 10 % 66,67 µl (v/v) TEMED 99 %

Bis-Tris SDS-PAGE	3,43 ml Bis-Tris pH 6,8 (1,25 M)
Sammelgel	2 ml Rotiphorese 30
	6,57 ml ddH ₂ O
	60,0 µl (v/v) APS 10 %
	30,0 µl (v/v) TEMED 99 %
20x MOPS-Laufpuffer	1 M MOPS
	1 M Tris
	69,3 mM SDS
	20,5 mM EDTA
1x MOPS-Laufpuffer	50 ml 20x MOPS-Laufpuffer
	950 ml ddH ₂ O

6.1.4.9 SDS-PAGE-Färbung: Coomassie

Puffer/Lösungen	Komposition
Coomassie-Färbelösung	45 % (v/v) Methanol
	10 % (v/v) Essigsäure
	0,2 % (w/v) Serva Blue R 250
Coomassie-Entfärbelösung	20 % (v/v) Essigsäure

6.1.4.10 SDS-PAGE-Färbung: Silber

Puffer/Lösungen	Komposition
Fixierlösung / Stopplösung	50 % (v/v) Methanol
	12 % (v/v) Essigsäure
	direkt vor Gebrauch 0,05 % (v/v) 37 %
	Formaldehyd zugeben
Waschlösung	50 % (v/v) Ethanol

Natriumthiosulfatlösung	0,2 g/l Natriumthiosulfat
Silberlösung	2 g/l Silbernitrat direkt vor Gebrauch 0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd zugeben
Entwicklerlösung	60 g/l Natriumcarbonat direkt vor Gebrauch 0,05 % (v/v) 37 % Formaldehyd zugeben

6.1.4.11 Protein-Aufreinigungspuffer

Puffer/Lösungen	Komposition
GST-Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris, pH 7.9 10 mM EDTA 5 mM DTT 1:1000 Proteaseinhibitoren
GST-Waschpuffer (300 mM NaCl)	300 mM NaCl 50 mM Tris, pH 7.9 10 mM EDTA 5 mM DTT
GST-Waschpuffer (150 mM NaCl)	150 mM NaCl 50 mM Tris, pH 7.9 10 mM EDTA 5 mM DTT
Gelfiltrationspuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris, pH 7.9 1 mM DTT

Kryo-EM Puffer	150 mM NaCl
	20 mM Tris, pH 6.5
	1 mM DTT

6.1.4.12 Immunpräzitationspuffer (IP-Puffer)

Puffer/Lösungen	Komposition
IP-Lysepuffer	150 mM NaCl
	50 mM Tris, pH 6.5
	1.5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0,5 % (v/v) NP-40
	1:1000 Proteaseinhibitoren
IP-Lysepuffer (HS)	750 mM NaCl
	50 mM Tris, pH 6.5
	1.5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0,5 % (v/v) NP-40
	1:1000 Proteaseinhibitoren
IP-Waschpuffer	150 mM NaCl
	50 mM Tris, pH 6.5
	1.5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0,1 % (v/v) NP-40
IP-Waschpuffer (HS)	750 mM NaCl
	50 mM Tris, pH 6.5
	1.5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	0,1 % (v/v) NP-40

IP-Elutionspuffer	150 mM NaCl
	20 mM Tris, pH 6.5
	1.5 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	200 µg/ml 3x FLAG Peptide

6.1.5 Gradientenpuffer

Puffer/Lösungen	Komposition
10x Gradientenpuffer	1,5 M NaCl 200 mM Tris, pH 6.5
1x Gradientenpuffer	150 mM NaCl 20 mM Tris, pH 6.5 1 mM DTT

6.1.6 *in vitro* Transkriptionspuffer

Puffer/Lösungen	Komposition
10x Transkriptionspuffer	0,5 M NaCl 0,2 M Tris, pH 6.5 60 mM MgCl ₂ 20 mM DTT 1,4 mM EDTA
10x NTP-Mix	10 mM ATP 10 mM CTP 1 mM UTP

6.1.6.1 Proteaseinhibitoren (Stocklösungen)

Puffer/Lösungen	Konzentration	Lösungsmittel
Leupeptin/Pepstatin A	1 mg/ml	DMSO

Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	100 mM	Ethanol
4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)	100 mM	H ₂ O
Aprotinin	1 mg/ml	H ₂ O

6.1.6.2 Denaturierende RNA Polyacrylamidgelelektrophorese

Puffer/Lösungen	Komposition
Denaturierendes RNA PAA-Gel 10 %	4 ml 10x TBE Rotiphorese Puffer-Konzentrat 16 ml Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat 20 ml Rotiphorese Sequenziergel Verdünner
Denaturierendes RNA PAA-Gel 12,5 %	4 ml 10x TBE Rotiphorese Puffer-Konzentrat 20 ml Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat 16 ml Rotiphorese Sequenziergel Verdünner

6.1.7 Antikörper

6.1.7.1 Primärantikörper (Western-Blot und Immunfluoreszenz)

Spezifität	WB/IF	Herkunft
HA.11-Antibody	1:1000	Hiss Diagnostics (MMS-101R)
Polyklonaler α -RPO35	1:1000	Institut für Biochemie, Universität Würzburg (diese Arbeit)
Polyklonaler α -RPO30	1:100	Institut für Biochemie, Universität Würzburg (diese Arbeit)
Polyklonaler α -E11	1:100	Institut für Biochemie, Universität Würzburg (diese Arbeit)

6.1.7.2 Sekundärantikörper (Western-Blot und Immunfluoreszenz)

Spezifität	Konjugat	WB/IF	Herkunft
α -Mouse gIgG (whole molecule)	Peroxidase	1:5000	Sigma-Aldrich (A4416)
α -Rabbit gIgG (whole molecule)	Peroxidase	1:5000	Sigma-Aldrich (A6154)
α -chicken IgY(H+L)	Cy5	1:100	Dianova, Hamburg

6.1.8 Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
pGEX-6P-1		GE-Healthcare
E11L-pGEX-6P-1	E11L-ORF Insertion	Diese Arbeit
E11L-pETM-11	E11L-ORF Insertion	Diese Arbeit
pSB24	Insertion eines synthetischen frühen viralen Promotors stromaufwärts einer 382 nt langen Genkassette ohne Guanin	Steven S. Broyles (University of Purdue)

6.1.9 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

6.1.9.1 Bakterienstämme

Stämme	Beschreibung	Herkunft
E.coli DH5 α	F- ϕ 80lac Z Δ M15 Δ (lacZYA-arg F)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 l-	Invitrogen
E.coli BL21(DE3) pLysS	F ⁻ , ompT, hsdS _B (r _B ⁻ , m _B ⁻), dcm, gal, λ (DE3), pLysS, CM ^r	Promega

6.1.9.2 Eukaryotische Zelllinien

Stämme	Beschreibung	Herkunft
A549	adhärent wachsende humane Lungen-Karzinomzellen	ATCC
CV-1	adhärent wachsende Fibroblasten aus der Niere der afrikanischen grünen Meerkatze	ATCC
HeLa	adhärent wachsende humane Zervixkarzinomzellen	ECACC
HeLa S3	in Suspension wachsende humane Zervixkarzinomzellen	ECACC

6.1.10 DNA und RNA Oligonukleotide

6.1.10.1 DNA Oligonukleotide

6.1.10.1.1 Primer für Klonierung

Name	Sequenz (5`-3`)
E11L-pGEX-6P-1 BamHI for	CGCGGATCCATGGAAGTGGTT
E11L-pGEX-6P-1 XhoI rev	CCGCTCGAGTTATAAACTTAACCC
E11L-pETM-11 NcoI for	CATGCCATGGAAGTGGTTAATATTTTTTTAG
E11L-pETM-11 KpnI rev	CGGGGTACCTTATAAACTTAACCC

6.1.10.1.2 Primer für qPCR

Name	Sequenz (5`-3`)
RT ACTB for	TAATACGACTCACTATAGGGGTTCC
RT ACTB rev	TATTCTCGCACGGACTACAACC

RT E11L for (1)	CTTTGACGAACCCTTGCTGT
RT E11L for (2)	GACGAACCCTTGCTGTTTGT
RT E11L rev	CAACTGAAATAACCGCGTGA

6.1.10.1.3 Primer für Northern-Blot

Name	Sequenz (5`-3`)
tRNA ^{Glu} 5`-Primer (wt/m)	TAATACGACTCACTATAGGGGTTTC
tRNA ^{Glu} 3`-Primer (wt/m)	TATTCTCGCACGGACTACAACC
tRNA ^{Gln} 5`-Primer (wt/ TTG + CTG)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG GT
tRNA ^{Gln} 3`-Primer (wt/ TTG)	AGG TCC CAC CGA GAT TTG AAC
tRNA ^{Gln} 3`-Primer (wt/CTG)	AGG TTC CAC CGA GAT TTG AAC T
tRNA ^{Arg} 5`-Primer (wt/ACG + CCG)	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGG G
tRNA ^{Arg} 3`-Primer (wt/ACG)	CGA GCC AGC CAG GAG TC
tRNA ^{Arg} 3`-Primer (wt/CCG)	CGA CCA CGA AGG GAC TCG

6.1.10.1.4 DNA Oligonukleotide für Northern-Blot

Name	Sequenz (5`-3`)
tRNA ^{Glu} (wt/m)	TAATACGACTCACTATAGGGGTTCTTGTAGTTGAAAT ACAACGATGGTTTTTCATATCATTGGTCTTGGTTGTA GTCCGTGCGAGAATA
tRNA ^{Gln} (wt/TTG/Chr.17)	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCCCATGGTGTAAT GGTTAGCACTCTGGACTTTGAATCCAGCGATCCGAGT TCAAATCTCGGTGGGACCT
tRNA ^{Gln} (wt/CTG/Chr.15)	TAATACGACTCACTATAGGGGGTCCCATGGTGTAAT GGTTAGCACTCTGGACTCTGAATCCAGCGATCCGAG TTCAAATCTCGGTGGAACCT
tRNA ^{Arg} (wt/ACG/Chr.6)	TAATACGACTCACTATAGGGGGGCCAGTGCGCAAT GGATAACGCGTCTGACTACGGATCAGAAGATTCCAG GTTCGACTCCTGGCTGGCTCG

tRNA ^{Arg} (wt/CCG/Chr.6)	TAATACGACTCACTATAGGGGGCCGCGTGGCCTAAT GGATAAGGCGTCTGATTCCGGATCAGAAGATTGAGG GTTCGAGTCCCTTCGTGGTCG
------------------------------------	---

6.1.10.2 RNA Oligonukleotide

6.1.10.2.1 siRNA

Name	Sequenz (5`-3`)
E11L	siTools

6.1.11 Rekombinante Viruskonstrukte

In dieser Arbeit wurden insgesamt drei verschiedene rekombinante Viruskonstrukte (rVACV) mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund verwendet. Das in der Literatur beschriebene Virus GLV-1h68 (Genelux Virus-1h68) entstand aus dem ursprünglichen Vaccinia Virus Listerstamm L1VP durch zielgerichtete Mutagenese und diente für die in der Arbeit verwendeten rVACV als parentales Viruskonstrukt (Abbildung 27) [8]. Das rVACV GLV-1h439 hat zusätzlich, zu den drei veränderten Genloki des Parentalvirus GLV-1h68 am C-terminale Ende des Genlokus A24R, welcher für die vRPO Untereinheit RPO133 kodiert, einen hinzugefügten HA-FLAG-Tag. Im Gegensatz hat das virale Konstrukt GLV-1h440 einen zusätzlichen HA-FLAG-Tag am N-Terminus von A24R. Alle nicht publizierte rVACV wurden von Dr. Q. Zhang der Genelux Corp. San Diego, USA, konstruiert und zu Analysezwecken der AG Fischer der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

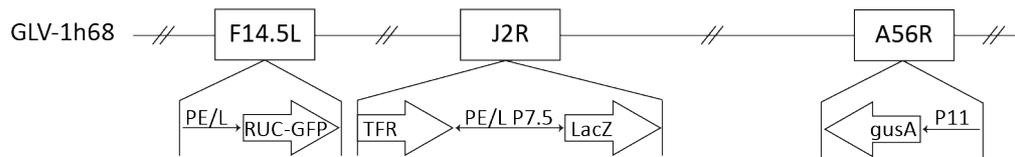
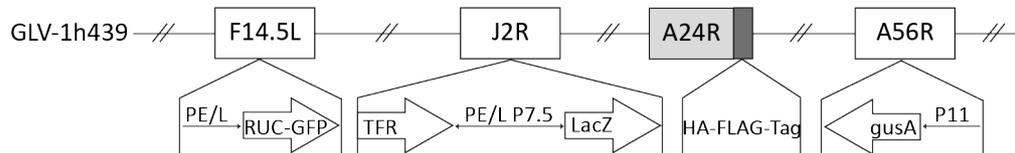
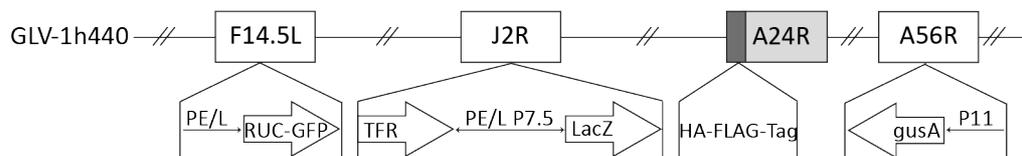
A**B****C**

Abbildung 27: Genetischer Hintergrund der rekombinanten Viren GLV-1h68, GLV-1h439 und GLV-1h440

Für die Generierung von GLV-1h439 wurde ein HA-FLAG-Tag an den N-Terminus von RPO133 insertiert. Bei GLV-1h440 wurde ein HA-FALG-Tag an den C-Terminus von RPO133 hinzugefügt. Für beiden rVACV GLV-1h439 und GLV-1h440 diente als genetischer Hintergrund und Parentalvirus GLV-1h68.

6.2 Methoden

6.2.1 Molekularbiologische Methoden

6.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Dabei wurde entweder die Phusion (2x Phusion® Master Mix with HF Buffer, Thermo Fisher Scientific) oder Taq (Thermo aquaticus) DNA-Polymerase eingesetzt. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 3 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur des verwendeten DNA-Oligonukleotid-Paares (Primer-Paares) gewählt. Alle anderen Temperaturen entsprachen den allgemeinen Standards der verschiedenen Polymerasen. In der Regel wurden 30 Reaktionszyklen verwendet. Zur Aufreinigung der erhaltenen PCR-Fragmente wurde das NucleoSpin® PCR and Gel Clean-up Kit verwendet.

6.2.1.2 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifisch palindromische Sequenzen in doppelsträngiger DNA schneiden. Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific) erfolgte für 2 h bei 37 °C, unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen.

6.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Nach der Hydrolyse eines Plasmids wurde die Plasmid DNA durch Zugabe von 1 µl FastAP dephosphoryliert, um eine Religation des Plasmid zu verhindern. Die Reaktion wurde für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

6.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Generierung eines rekombinanten Vektors mit einer gewünschten Insert, wurde die hydrolysierte Plasmid-DNA zu einem 10-fachen molaren Überschuss zum Insert gegeben. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT, wobei folgender Reaktionsansatz verwendet wurde:

32,5 µl	Insert/Plasmid-DNA
1 µl	T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific)
1 µl	ATP (10 mM)
4 µl	10 x T4 DNA-Ligase Puffer
2 µl	PEG 6000 (24 % (w/v))

6.2.1.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen

100 µl chemisch-kompetente *E.coli* DH5α wurden auf Eis aufgetaut, mit der Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert und für exakt 90 s einem Hitzeschock mit 42 °C unterzogen. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf Eis abgekühlt, mit 500 µl LB-Medium supplementiert und für 40 min bei 37 °C geschüttelt (1000 rpm). Die transformierten Bakterien wurden für die Selektion auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

6.2.1.6 Kontrolle der Klonierung durch Kolonie-PCR

Zur weiteren Kontrolle der Klonierung wurde eine PCR in Form einer Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei dienten Einzelkolonien von der Selektionsplatte an Stelle einer Plasmid-DNA als Template zur Amplifikation. Die Kolonie wurde in einen 20 µl Reaktionsansatz gegeben:

0,25 µl	5`-Primer (100 µM)
0,25 µl	3`-Primer (100 µM)
10 µl	2 x PCR MasterMix (Taq-Polymerase)
9,5 µl	ddH ₂ O

Die amplifizierte DNA wurde auf einem entsprechenden Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht.

6.2.1.7 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Um DNA gelelektrophoretisch aufzutrennen wurde je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente, ein 0,5 % bis 2 % Ethidiumbromid-haltiges (1 µg/ml) Agarosegel in 1 x TBE verwendet. Die Elektrophorese wurde ebenfalls in 1 x TBE bei einer Spannung von 140 V durchgeführt. Durch die Zugabe von Ethidiumbromid war die Visualisierung der DNA-Banden im UV-Licht (302 nm) möglich.

6.2.1.8 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder Reaktionsansätzen

Für die Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen oder direkt aus PCR-Ansätzen wurde das NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up Kit von Macherey-Nagel verwendet, wobei die Herstellerangaben eingehalten wurden.

6.2.1.9 Isolierung von Plasmid DNA

Für die Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5α im kleinen Maßstab (4 ml) oder im großen Maßstab (500 ml), wurde das LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika (1:1000) versetzt, durch eine einzelne Bakterienkolonie angeimpft und bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Die Aufreinigung erfolgte mittels NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kit (Macherey-Nagel) oder über das NucleoBond® PC500 Kit (Macherey-Nagel) nach den Angaben des Herstellers.

6.2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde durch die Aufnahme einer Absorptionskurve am Spektralphotometer NanoVue™ (GE Healthcare) bestimmt.

6.2.1.11 Kontrolle der Klonierung durch Sequenzierung

Zur Kontrolle der Klonierung wurde eine Sequenzierung der DNA, entweder bei der Firma GATC (Konstanz) oder bei Eurofins (Ebersberg), durchgeführt.

6.2.2 Biochemische Methoden

6.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Für die Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien wurde zuerst eine Übernachtskultur mit 4 ml LB-Medium und den entsprechenden kompetenten Bakterienzellen *E.coli* BL21(DE3)pLysS oder *E.coli* DH5 α angeimpft. Anschließend wurde mit je 2 ml Vorkultur die Hauptkultur (2x 250 ml) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Die angewachsenen Kulturen wurden daraufhin auf Eis (10 min) gekühlt und für 10 min bei 1500 g und 4 °C abzentrifugiert. Nach der Resuspension des Pellets mit 100 ml kaltem TFBII (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8), erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis für 10 min und eine weitere Zentrifugation (1500 g, 10 min, 4 °C). Die Bakterien wurden in 13 ml kaltem TFBII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,5) resuspendiert und zu je 100 μ l Ansätzen aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

6.2.2.2 Expression und Aufreinigung von rekombinatem E11

Für die Expression wurde E11L-pGEX-6P-1 in *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformiert (siehe 6.2.1.5). 10 % und 90 % der transformierten Bakterien wurden anschließend über Nacht bei 37 °C auf Selektionsplatten mit dem entsprechenden Antibiotika Ampicillin und Chloramphenicol ausplattiert. Für die Expressionskultur wurden 1,6 l SB-Medium mit je 1,6 ml Ampicillin und Chloramphenicol versetzt und die Bakterienkolonien wurden von beiden Selektionsplatten, durch quantitatives Abspülen der Platten mit dem Kulturmedium zugegeben. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C inkubiert und die Expression, durch die Zugabe von 1 mM IPTG (Roth) induziert, wobei die anschließende Expressionskultur 20 h bei 15 °C geschüttelt (180 rpm) wurde. Nach der Ernte (4000 rpm, 20 min, 4 °C) wurde der Überstand verworfen und die insgesamt 4 Bakterienpellets wurden mit je 40 ml GST-Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch dreimalige Sonifikation für je 5 min (Stufe 5, Output 50 %, Sonifier 250, Branson). Um das Lysat zu klären, wurde es für 30 min bei 40000 rpm und 4 °C zentrifugiert und nachfolgend mit 5 ml in GST-Lysepuffer äquilibrierter Glutathionsepharose 4B (GE Healthcare) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Sepharose wurde, mittels einer Säule dekantiert, mit 10 SV GST-Lysepuffer

und 30 SV GST-Waschpuffer (300 mM NaCl) gewaschen. Für die Entfernung des GST-Tags mittels PreScission Protease (PSP), wurde die Sepharose mit 10 SV GST-Waschpuffer (150 mM NaCl) gewaschen und über Nacht bei 4 °C in GST-Waschpuffer (150 mM NaCl) mit 2 % PSP inkubiert. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen, auf eine Konzentration von 30 mg/ml einkonzentriert und mittels Gelfiltrationschromatografie in Gelfiltrationspuffer über eine SuperdexTM75 26/60 HL-Säule (GE Healthcare) der Größe nach weiter gereinigt.

6.2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Auftrennung von Proteinen ihrer Größe nach wurde eine denaturierende Bis-Tris SDS-PAGE verwendet. Zur Denaturierung wurden die Proben mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 3 min bei 95 °C erhitzt. Die SDS-PAGE wurde anschließend mit den denaturierten Proben beladen und bei einer Stromstärke 75 mA in 1x MOPS-Laufpuffer durchgeführt.

Trenngel	10 %	12 %
1,25 mM Bis-Tris, pH 6.8	5,73 ml	5,73 ml
Rotiphorese 30 (37,5:1, Roth)	6,7 ml	8 ml
ddH ₂ O	7,43 ml	6,13 ml
APS (10 %(w/v))	66,67 µl	66,67 µl
TEMED	66,67 µl	66,67 µl

Sammelgel	
1,25 mM Bis-Tris, pH 6.8	3,43 ml
Rotiphorese 30 (37,5:1, Roth)	2 ml
ddH ₂ O	6,57 ml
APS (10 %(w/v))	60 µl
TEMED	30 µl

6.2.2.4 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Nach der Auftrennung der Proteine über eine Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3), werden die Gele in 100 ml Coomassie-Färbelösung für 1 h bei RT inkubiert und anschließend über eine Coomassie-Entfärbelösung unter mehrmaligem Wechsel entfärbt. Der Entfärbeprozess wird so lange durchgeführt, bis die Proteinbanden in einem optimalen Kontrast zu erkennen sind.

6.2.2.5 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von SDS-Gelen zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität im Vergleich zur Coomassie-Färbung aus. Für die Fixierung der Proteine wurde die Bis-Tris SDS-PAGE für 1 h in 100 ml Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3 x mit der 100 ml Waschlösung für je 20 min gewaschen und für 1 min mit 100 ml einer Natriumthiosulfatlösung sensibilisiert. Der Waschschrift erfolgte durch dreimaliges Waschen mit ddH₂O für je 20 s, woraufhin das Gel für 20 min in Silbernitratlösung imprägniert und anschließend wieder 3x mit ddH₂O für je 20 s gewaschen wurde. Um das SDS-Gel zu entwickeln wurde es mit 100 ml Natriumcarbonatlösung inkubiert und bei der gewünschten Kontrastierung der Proteinbanden mit ddH₂O gewaschen. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100 ml Fixierlösung gestoppt.

6.2.2.6 Regeneration von Glutathionsepharose

Nach dem Gebrauch der Glutathionsepharose wurde die Sepharose zur Wiederverwendung regeneriert. Hierfür wurde sie mit 10 SV 20 mM Glutathion behandelt um restliche Fusionsproteine zu eluieren. Es folgte ein Waschschrift mittels 0,5 M NaOH und eine anschließende Inkubation für 1 h in 8,75 M Harnstoff mit 10 mM DTT. Die Inkubation mit Harnstoff wurde zweimal durchgeführt, bevor die Sepharose mit 10 SV ddH₂O gewaschen wurde. Die Lagerung der Glutathionsepharose erfolgte in 20 % Ethanol.

6.2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford, bei welcher zunächst mittels definierter BSA Proteinmenge (0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg) eine Eichkurve an einem Biophotometer (Eppendorf) erstellt wurde. Anschließend

wurde 200 μl Protein Assay Dye Reagent Konzentrat (Bio Rad), 798 μl H_2O und 2 μl Proteinprobe gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen und anhand der durchgeführten Eichgerade konnte die Proteinkonzentration bestimmt werden.

6.2.2.8 5'-Endmarkierung von DNA-Oligonukleotiden

DNA Oligonukleotide wurden für die Verwendung als DNA-Hybridisierungssonden (z.B als Northern-Blot Sonden) radioaktiv markiert. Diese Markierung erfolgte mittels radioaktiver Phosphorylierung am 5'-Ende durch γ -[^{32}P]ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 6000 mCi/mmol). Für die Markierung wurde folgender Reaktionsansatz verwendet:

2 μl	DNA-Oligonukleotid (10 μM)
1,5 μl	10 x PNK-Puffer A
2,5 μl	γ -[^{32}P]ATP
8 μl	ddH ₂ O

Zur Denaturierung wurde der Ansatz bei 95 °C für 30 s erhitzt und anschließend für 1 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 1 μl T4-Polynukleotidkinase folgte eine Inkubation der Reaktion für 15 min bei 37 °C, welche mit 15 μl RNA-Probenpuffer gestoppt und auf ein 12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 6.2.2.11) aufgetragen wurde. Die markierten Proben wurden nach der Auftrennung aus dem Gel eluiert (siehe 6.2.2.12) und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

6.2.2.9 3'-Endmarkierung von RNA

Die Markierung von RNA am 3'-Ende erfolgte durch eine Ligation von [5'- ^{32}P]pCp mittels T4 RNA-Ligase. Hierfür wurde aus je 50 μl Gradientenfraction (siehe 6.2.2.20) eine RNA-Extraktion (siehe 6.2.2.13) durchgeführt, wobei die RNA anschließend in 11 μl ddH₂O aufgenommen wurde.

Reaktionsansatz:

11 µl	RNA
4 µl	DMSO (99 %)
1 µl	ATP (100 mM)
1 µl	T4 RNA-Ligase
2 µl	10 x T4 RNA-Ligase Puffer
1 µl	[5 ⁻³² P]pCp (10 µCi/µl, 3000 Ci/mmol)

Der Reaktionsansatz wurde bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die markierte RNA wurde anschließend durch eine PCI-Extraktion (siehe 6.2.2.13) isoliert. Das RNA-Pellet wurde in 10 µl RNA-Probenpuffer resuspendiert, über ein 12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 6.2.2.11) aufgetrennt und mittels Autoradiografie detektiert.

6.2.2.10 Präparative *in vitro* Transkription früher viraler mRNA

Um die Aktivität der aufgereinigten vvrPO zu bestimmen wurde eine *in vitro* Transkription von früher viraler mRNA durchgeführt. Hierfür wurde das pSB24 Plasmid, welches einen synthetischen frühen Promotor gefolgt von einer 382 nt langen DNA-Sequenz ohne Guanin-Basen enthält, verwendet [63]. Das Plasmid wurde mittels Smal Restriktionsendonuklease linearisiert und über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 6.2.1.8). Die *in vitro* Transkription wurde wie folgt durchgeführt:

4 µl	linearisiertes Template (0,8 µg/µl)
5 µl	Komplex I/II (Abbildung 8)
5 µl	10 x Transkriptionspuffer
5 µl	10 x NTP-Mix
1 µl	α-[³² P]UTP (10 µCi/µl, 6000 Ci/mmol)
30 µl	ddH ₂ O

Die Reaktion wurde bei 30 °C für 30 min inkubiert und anschließend für 10 min mit 50 U RNase T1 verdaut. Die RNase Behandlung, wurde durch die Zugabe von 10 µl RNA-Probenpuffer gestoppt, wobei die darauffolgende Auftrennung der Proben anhand eines 12,5 % denaturierenden Polyacrylamidgels (siehe 6.2.2.11) erfolgte.

6.2.2.11 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur RNA Auftrennung wurden 10 % bis 12,5 % denaturierende Polyacrylamidgele verwendet. Hierfür wurden die Proben mit RNA-Probenpuffer versetzt und auf das Gel geladen, welches anschließend für 1 h bei 30 W gefahren wurde. Als Laufpuffer für die Gelelektrophorese diente 1x TBE.

	10 %	12,5 %
Rotiphorese Sequenziergel Konzentrat	16 ml	20 ml
Rotiphorese Sequenziergel Verdünner	20 ml	16 ml
Rotiphorese Puffer-Konzentrat	4 ml	4 ml
APS (10 %(w/v))	400 µl	400 µl
TEMED	40 µl	40 µl

6.2.2.12 Reinigung von RNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen

Nach der Auftrennung der RNA mittels denaturierender RNA Gelelektrophorese wurde die RNA durch Autoradiografie auf einen Röntgenfilm (Amersham Hyperfilm MP, GE Healthcare) oder durch Interkalierung von Ethidiumbromid in die RNA detektiert und die entsprechende Bande konnte aus dem Gel ausgeschnitten werden. Das Gelstück wurde daraufhin für eine verbesserte Elution für 20 min bei -80 °C gefroren, bevor die RNA mithilfe einer 0,4 M NaCl-Lösung über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln eluiert wurde. Das erhaltene Eluat wurde mittels 3 Volumen eiskaltem 96 % Ethanol und 15 µg GlycoBlue™ Coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) für 12 h über Nacht bei -20 °C gefällt und abzentrifugiert (20 000 g, 30 min, 4 °C). Das RNA Pellet wurde daraufhin nach Abnahme des Überstandes bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O resuspendiert.

6.2.2.13 Phenolextraktion von RNA aus Gradientenfractionen oder Zellextrakten

Um RNA aus Gradientenfractionen zu isolieren, wurde die Fraktion in einem Verhältnis von 1:4 mit ddH₂O verdünnt und anschließend mit 1 Volumen PCI (Phenol (Roti-Aqua-Phenol zur RNA Extraktion, Roth)/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1) vermengt. Bei der Reinigung von RNA aus Zellextrakt erfolgt eine direkte Vermengung des Extraktes mit 1 Volumen PCI.

Das Gemisch wurde für 20 s gevortext, für 5 min bei RT (20000 g) zentrifugiert und anschließend wurde die wässrige Phase abgenommen. Nach Zugabe von 1 Volumen Cl (Chloroform/Isoamylalkohol, 25:1) wurde das Gemisch erneut für 20 s gevortext und abzentrifugiert (5 min, 20 000 g, RT). Für die RNA Präzipitation wurde neben 3 Volumen eiskaltem 96 % Ethanol, 0,1 Volumen 3 M Ammoniumacetat (pH 5,2) und 15 µg GlycoBlue™ Coprecipitant (Thermo Fisher Scientific) zur abgenommenen wässrigen Phase dazu gegeben und über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (30 min, 20000 g, 4 °C) wurde der Überstand verworfen, das RNA-Pellet bei RT getrocknet und im geeigneten Volumen in ddH₂O aufgenommen.

6.2.2.14 Spezifischer RNA Nachweis durch Northern-Blot Analyse

Für eine Northern-Blot Analyse wurden je 1 µl zu identifizierende RNA und je 30 ng Gesamt-RNA aus HeLa Zellen über ein 10 % denaturierendes Polyacrylamidgel (siehe 6.2.2.11) aufgetrennt und für 10 min 1 x TBE mit 1 µg/ml Ethidiumbromid für eine Ladekontrolle inkubiert. Anschließend wurde die RNA elektrophoretisch über eine *Semi-Dry* Blotapparatur auf eine Hybond™-N + Nylon Transfermembran (Amersham) übertragen (siehe 6.2.2.15) und durch einen UV-Crosslink (240 mJ/cm²) fixiert. Daraufhin wurde die Membran mit 10 ml Rapid-hyb™ Buffer für 45 min bei 40 °C in einem Hybridisierungsöfen prehybridisiert, wobei der Puffer für 10 min bei 40 °C vorgewärmt wurde. Zur Detektion der spezifischen RNA wurde anschließend je 20 µl der entsprechenden radioaktiv markierten Hybridisierungssonde (siehe 6.2.2.8) zum Rapid-hyb™ Buffer zugegeben und über Nacht bei 40 °C inkubiert. Die Membran wurde daraufhin mit je 15 ml 2 x SSC Waschpuffer für je 10 min gewaschen und autoradiografisch analysiert.

6.2.2.15 Elektrophoretischer Polyacrylamid Blot

Für einen elektrophoretischen Polyacrylamid Blot wurde die zu analysierende RNA über ein denaturierendes Polyacrylamid (siehe 6.2.2.11) aufgetrennt und anschließend auf eine Hybond™-N+Nylon Transfermembran in einer *Semi-Dry*-Blotapparatur übertragen. Hierzu wurde die in 1 x TBE inkubierte Membran auf 3 Lagen in 1 x TBE getränktes Whatman Zellulose Filterpapier gelegt und daraufhin mit dem Polyacrylamidgel beschichtet.

Zum Abschluss folgten drei weitere Lagen in 1 x TBE getränktes Whatman Zellulose Filterpapier. Die Übertragung der RNA erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 400 mA.

6.2.2.16 Spezifischer Endoribonuklease Verdau von RNA

Für die Behandlung der zu identifizierenden RNA mit den Endoribonukleasen T1 und A (RNase T1, RNase A) wurde folgender Reaktionsansatz verwendet, wobei die Endkonzentration von RNase T1 bei 2 U/ μ l und von RNase A bei 0,02 μ g/ μ l lag:

7 μ l RNA

2 μ l ddH₂O

1 μ l RNase T1 oder RNase A

Der Reaktion wurde für 5 min bei 21 °C inkubiert und anschließend durch eine PCI-Extraktion (siehe 6.2.2.13) der RNA gestoppt.

6.2.2.17 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Die Sequenzierung der zu identifizierenden RNA wurde im Labor von Prof. Dr. Jörg Vogel (Institut für molekulare Infektionsbiologie (IMIB), Universität Würzburg, DE) durchgeführt. Hierfür wurde die RNA zu Generierung einer cDNA-Bibliothek an die Firma vertis Biotechnology AG (Freising, DE) gesendet. Anschließend wurde die cDNA über ein Agencourt AMPure XP Kit (Beckman Coulter Genomics) aufgereinigt und über Kapillarelektrophorese analysiert.

6.2.2.18 Next Generation Sequencing (NGS)

Die Sequenzierung der cDNA-Bibliothek wurde über *Next Generation Sequencing* (Illumina MiSeq) von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jörg Vogel (Institut für molekulare Infektionsbiologie (IMIB), Universität Würzburg, DE) durchgeführt.

6.2.2.19 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Für die Knockdown-Kontrolle von E11L wurden HeLa Zellen in 24-wells ausgesät und sowohl mit E11L-siRNA als auch mit einer Kontroll-siRNA transfiziert (siehe 6.2.5.6). Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen mit GLV-1h439 infiziert (siehe 6.2.6.1) und es wurden jeweils nach 6, 24, 48, 72, 96 h Proben entnommen. Dazu wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und mit 200 µl Trypsin von der Kulturplatte gelöst, wobei die Reaktion mit 500 µl Kulturmedium abgestoppt wurde. Die Proben wurden anschließend für 2 min (10000 rpm, 4 °C) zentrifugiert und die entstandenen Zellpellets wurden in 50 µl 1 x PBS aufgenommen. Für die Kontrolle des Knockdowns über eine Western-Blot Analyse (siehe 6.2.4.1) wurde die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (siehe 6.2.2.7) bestimmt und 50 µg Gesamtprotein mittels diskontinuierlichen SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Aus dem restlichen Zellextrakt wurde die RNA mithilfe einer PCI-Extraktion (siehe 6.2.2.13) und anschließender Isopropanol-Fällung isoliert. Das Pellet wurde in 20 µl ddH₂O resuspendiert und eine DNA-Hydrolyse erfolgte daraufhin anhand eines TURBO DNA-freeTM-Kits nach Herstellerangaben. Im Anschluss folgte gemäß den Herstellerangaben eine reverse Transkription mit dem SuperScriptIII First-strand-Kit, wobei Oligo(dt)-Primer eingesetzt wurden. Für die qPCR wurde das Real-Time System CFX96 TouchTM von Bio-Rad verwendet. Als Kontrolle diente die ACTB-mRNA.

Reaktionsansatz:

6 µl iTagTM Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)

2 µl Primer-Mix (5`- und 3`-Primer je 1,5 µM)

4 µl RT-Ansatz (25 ng/µl)

PCR-Programm:

95 °C, 30 s	} 40 Zyklen
95 °C, 5 s	
60 °C, 30 s	

6.2.2.20 Dichtegradientenzentrifugation

Für eine weitere Reinigung der immunpräzipitierten vvrPO wurde eine lineare Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Hierfür wurde das Eluat der α -FLAG IP auf ein Volumen von 200 μ l einkonzentriert und auf einen 10-30 % Saccharose-Gradienten geladen. Der Gradient wurde vorher, anhand eines Gradientenmischers (Gradient Mate™) in einen 1 x Gradientenpuffer, erstellt und für mindestens 1 h bei 4°C gekühlt. Nach der Zentrifugation (35000 rpm, 16 h, 4 °C, Rotor SW60Ti (Beckman Coulter)) wurden Fraktionen mit je 200 μ l per Hand vom Gradienten abgenommen, mit Protein-Probenpuffer versetzt und über eine SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Die Analyse spezifischer Proteine erfolgte über einen Western-Blot (siehe 6.2.4.1).

6.2.2.21 Bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3) Protein-Protein-Crosslink mit gekoppelter Proteinmassenspektrometrie

Das BS3 Protein-Protein-Crosslink Experiment, mit der anschließenden proteinmassenspektrometrische Analyse wurde im Labor von Prof. Dr. Henning Urlaub (Max Planck Institut für biophysikalische Chemie Göttingen, DE) durchgeführt. Diese Methode verwendet eine chemische Quervernetzung von Lysin-Resten innerhalb von Proteinen mittels BS³ (Bis(sulfosuccinimidyl)suberat), einem wasserlöslichen, nicht-proteolytisch spaltbaren Amin-Amin-Cross-Linker.

6.2.2.22 Proteinmassenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analysen wurden von der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Andreas Schlosser (Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) durchgeführt.

Die zu untersuchenden Proteinkomplexe wurden über eine Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt und anschließend mit Coomassie (siehe 6.2.2.4) gefärbt. Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden die Gelspuren in Banden zerschnitten und mit 30 % Acetonitril entfärbt. Die Gelstücke wurden weiterhin mit 100 % Acetonitril geschrumpft, über einen Vacuumkonzentrator getrocknet und daraufhin über Nacht mit 0,1

µg Trypsin bei 37 °C in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) verdaut. Die Elution der erhaltenen Peptide erfolgte mit 5 % Ameisensäure aus den Gelstücken.

Die NanoLC-MS/MS-Analysen wurden auf einem LTQ-Orbitrap Velos Pro-Massenspektrometer, der mit einer EASY-Spray Ionenquelle ausgestattet und mit einem EASY-nLC 1000 UHPLC-System (alles Thermo Fisher Scientific) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Peptide wurden auf die Vorsäule geladen (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) und über einen 30 min linearen Gradienten von 3 bis 30 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure mit 200 nl/min auf der analytischen Säule aufgetrennt (EASY-Spray, 25 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße). MS-Spektren wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 30.000 bei 400 m/z aufgenommen. HCD Fragmentierungsspektren (MS/MS-Spektren) wurden in einer Ionenfalle mit einer Auflösung von 7.500 bei 400 m/z detektiert. Die max. 5 intensivsten Peptidvorläuferionen jedes MS-Spektrums wurden datenabhängig für die MS/MS-Analyse ausgewählt. Weitere Methodenparameter waren eine dynamische Ausschlussliste ohne Wiederholungen und einer Ausschlussdauer von 30 s sowie Ausschluss von einfach geladenen Ionen. Für die Peptidvorläuferselektion wurde ein Schwellenwert von 50.000 verwendet. Für die prädiktive automatische Verstärkungsregelung (AGC) wurden Zielwerte von 1E6 für MS-Spektren bzw. 5E4 für MS/MS-Spektren vorgegeben. Für die interne Kalibrierung („lock mass“) wurde die Masse des protonierten Decamethylcyclopentasiloxan (m/z 371.10124) verwendet.

Zur Prozessierung der Rohdaten und für die Generierung einer Peak-Liste wurde Mascot Distiller 2.5 verwendet. Dabei wurden die Standardeinstellungen für den Orbitrap Velos-Massenspektrometer (high/high) verwendet. Die Datenbanksuche erfolgte mit dem Mascot Server 2.4 mit den folgenden Parametern: 10 ppm, MS/MS-Massentoleranz: 0,02 Da, Enzym: Trypsin, wobei drei verpasste Schnittstellen erlaubt waren; feste Modifikationen: Carbamidomethyl (C); variable Modifikationen: N-terminale Acetylierung, Gln zu pyro-Glu-Umwandlung, Oxidation (M) und Phosphorylierung (STY). Für die Datenbanksuche wurde die humane UniProt Datenbank sowie eine Datenbank, die Kontaminationen enthält, verwendet.

6.2.3 Strukturbiologische Untersuchungen

6.2.3.1 Negativkontrastierung (Prof. Dr. Bettina Boettcher)

Die konventionellen elektronenmikroskopischen Untersuchungen mittels Negativkontrastierung wurden von Prof. Dr. Bettina Boettcher (Universität von Edinburgh, UK) durchgeführt und ausgewertet. Als Ausgangsmaterial diente Komplex I bzw. Komplex II der aufgereinigten vVRPO (Abbildung 17).

6.2.3.2 Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) (Prof. Dr. Bettina Boettcher)

Die Kryo-EM Studien wurden von Prof. Dr. Bettina Boettcher (Universität von Edinburgh, UK) durchgeführt und ausgewertet. Als Ausgangsmaterial diente Komplex I bzw. Komplex II der aufgereinigten vVRPO (Abbildung 17).

6.2.3.3 Kristallographie (Dr. Clemens Grimm)

Der Kristallisationscreen wurde von Dr. Clemens Grimm (Universität von Würzburg, DE) durchgeführt und ausgewertet. Als Ausgangsmaterial diente E11, welches über eine bakterielle Expression mit anschließender Reinigung über ein fusioniertes GST-Tag isoliert wurde (siehe 6.2.2.2).

6.2.4 Immunbiochemische Methoden

6.2.4.1 Western-Blot Analyse von einer Bis-Tris SDS-PAGE

Für eine Antikörper-vermittelte Detektion von individuellen Proteinen wurde diese über eine Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran (0,45 µm, Merck Millipore) mittels *Semi-Dry* Blot transferiert [113]. Hierfür wurden 2 Lagen in 1 x Towbin WB-Transferpuffer getränktes Whatman Zellulose-Filterpapier mit einer in 100 % Methanol inkubierten PVDF Membran bedeckt. Die Bis-Tris SDS-PAGE wurde auf die Membran gelegt und erneut mit 2 Lagen Whatman Zellulose-Filterpapier, welches in 1 x Towbin WB-Transferpuffer getränkt wurde, überschichtet. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA/cm² und wurde anschließend über eine Amidoschwarz-Färbung

kontrolliert. Hierfür wurde die Membran für mind. 5 min mit der Amidoschwarz-Färbelösung inkubiert und solange mit Amidoschwarz-Entfärbelösung inkubiert, bis die gewünschte Kontrastierung der Proteinbanden sichtbar war. Daraufhin wurde die Membran mit 5 % (w/v) Magermilchpulver für 40 min in 1x PBS-T geblockt, mit 1 x PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 1 x NET-Gelantinepuffer mit der entsprechenden Primärantikörperverdünnung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x für mind. 5 min mit 1 x PBS-T gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper, welche in PBS-T 1:5000 verdünnt wurde, inkubiert. Nach weiteren 3 x Waschen für 5 min bei RT in 1 x PBS-T wurde der Western-Blot durch eine Chemolumineszenz-Reaktion entwickelt. Hierfür wurden 10 ml WB-Detektionslösung mit 100 µl WB-Detektionslösung 2 und 8 µl H₂O₂ (30 %) gemischt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz-Reaktion erfolgte mittels Molecular Imager® ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad).

6.2.4.2 Immunpräzipitation von HA/FLAG-RPO133

Für die Immunpräzipitation (IP) von HA/FLAG-RPO133 wurden vier 14,5 cm Schalen HeLa S3 Zellen ausgesät und bei Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurde je eine Schale mit dem entsprechenden rVACV GLV-1h439, GLV-1h440 und GLV-1h68 infiziert (siehe 6.2.6.1). Als Kontrolle diente nicht infizierter Zellextrakt. Für die Infektion wurde eine MOI von 1 verwendet. 24 h nach der Infektion wurde der Zellextrakt mit dem IP-Lysepuffer pH 6.5 hergestellt (siehe 6.2.5.5) und mit je 400 µl FLAG Agarose (ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) pro IP für 2 h bei 4 °C auf den Überkopffrotator inkubiert. Die Agarose wurde anschließend 2 x mit IP-Lysepuffer pH 6.5 und 4 x mit IP-Waschpuffer pH 6.5 gewaschen. Während des Waschprozesses wurde zusätzlich das Reaktionsgefäß gewechselt, um mögliche unspezifische Bindungen zu vermeiden. Zur Analyse der IP wurde sowohl 20 µg Zellextrakt (Input), als auch 20 µg Überstand über ein Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt und über einen Western-Blot (siehe 6.2.4.1) mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Zur Kontrolle der immobilisierten Proteine wurden zusätzlich denaturierte Proteine aus 5 µl Agarose mit aufgetrennt und analysiert.

6.2.4.3 Immunpräzipitation von HA/FLAG-RPO133 unter Hochsalz-Bedingungen

Für die Immunopräzipitation (IP) von HA/FLAG-RPO133 unter Hochsalz-Bedingungen wurden HeLa S3 Zellen in einem Kulturvolumen von einem Liter und einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml ausgesät. Bei Erreichen einer Konzentration von ungefähr 2×10^6 Zellen/ml wurden die Zellen nach einer Zentrifugation (3 min, 1000 rpm, 21 °C) in 5 % des eigentlichen Kulturvolumens im entsprechenden Infektionsmedium resuspendiert und mit dem rVACV GLV-1h439 (MOI 1,2) infiziert (siehe 6.2.6.1). 24 h nach der Infektion wurde der Zellextrakt mit dem IP-Lysepuffer (HS) pH 6.5 hergestellt (siehe 6.2.5.5) und mit 5 ml FLAG Agarose (ANTI-FLAG[®] M2 Affinity Gel, Sigma-Aldrich) für 2 h bei 4 °C auf den Überkoprotator inkubiert. Die Agarose wurde anschließend 2 x mit IP-Lysepuffer (HS) pH 6.5 und 4 x mit IP-Waschpuffer (HS) pH 6.5 gewaschen.

Anschließend wurden die Matrix 2 x mit IP-Waschpuffer pH 6.5 gewaschen, um die Salzkonzentration wieder auf ein physiologisches Niveau zu reduzieren. Zur Analyse der IP wurde sowohl 20 µg Zellextrakt (Input), als auch 20 µg Überstand über ein Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt und über einen Western-Blot (siehe 6.2.4.1) mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Zur Kontrolle der immobilisierten Proteine wurden zusätzlich denaturierte Proteine aus 5 µl Agarose mit aufgetrennt und analysiert.

6.2.4.4 FLAG Peptid Elution von immobilisiertem HA/FLAG-RPO133

Anschließend an die IP von HA/FLAG-RPO133 wurden die an FLAG Agarose immobilisierten Proteine 3 x mit IP-Elutionspuffer pH 6.5 gewaschen. Die Elution erfolgte daraufhin mit je 400 µl 3x FLAG Peptid (200 µg/ml) für 1 h bei 4 °C auf dem Überkoprotator. Für die Elution im größeren Maßstab wurde zu den 5 ml FLAG Agarose, 5 ml FLAG Peptid (200 µg/ml) gegeben und ebenfalls für 1 h bei 4 °C auf dem Überkoprotator inkubiert. Zur Analyse der Elution wurden zu 15 µl Elution, 5 µl 6x Proteinprobenpuffer zugegeben, für 3 min bei 95 °C denaturiert und über ein Bis-Tris SDS-PAGE (siehe 6.2.2.3) aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend einer Silberfärbung (siehe 6.2.2.5) unterzogen.

6.2.4.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden A549 Zellen in 6-well Kulturschalen auf Deckgläschen kultiviert und bei Erreichen einer Konfluenz von 70 % mit dem rVACV GLV-1h439 und einer MOI von 0,1 infiziert (siehe 6.2.6.1). Nach 24 h wurden die Zellen mittels 3,7 % Formaldehyd für 30 min bei RT fixiert, für 5 min mit 1 x PBS gewaschen und für 30 min mit einer Permeabilisierungslösung (1 % BSA, 0,2 % Triton-X-100 in 1 x PBS) inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneuter Waschschrift für 5 min mit 1 x PBS und darauffolgend wurde eine Ko-Färbung mittels der Primärantikörperverdünnung α -RPO35 (1:100) und Phalloidin (1:200, Phalloidin-Tetramethylrhodamine B isothiocyanate, Sigma-Aldrich) in 1 % BSA in 1 x PBS für 1 h durchgeführt. Die Zellen wurden erneut mit 1 x PBS für 5 min gewaschen und daraufhin einer Ko-Färbung mit der Sekundärantikörperverdünnung α -chicken Cy5 (1:100) und Hoechst (1:400) in 1 % BSA in 1 x PBS für 1 h unterzogen. Die Zellen wurden 5 min in 1 x PBS und 5 min in ddH₂O gewaschen und mit Moviol eingebettet.

6.2.5 Zellbiologische Methoden

6.2.5.1 Bestimmung der Zellzahl mit der Hilfe der Fuchs-Rosenthal Zählkammer

Für eine genaue Bestimmung der Zellzahl wurde eine Fuchs-Rosenthal Zählkammer verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Objektträger, der über ein eingezühtes Gitternetzwerk verfügt. Mit dem aufgelegten Deckgläschen ergibt sich genau definiertes Flüssigkeitsvolumen, indem sich die Zellen befinden. Das Gitternetzwerk besteht aus 16 großen Quadraten, von denen jedes Quadrat aus je 16 kleineren Quadraten besteht. Bei der Bestimmung der Zellzahl, wurden von den 16 großen Quadraten 5 unter dem Mikroskop ausgezählt und die Zellzahl wurde wie folgt errechnet:

$$\text{gezählte Zellzahl} \times 10E3 \times \text{Verdünnungsfaktor der Zellsuspension} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}}$$

6.2.5.2 Kultivierung adhärent wachsender eukaryotischer Zelllinien

Adhärenent wachsende Zelllinien (HeLa wt Zellen, HeLa S3 Zellen, CV-1 Zellen, A549 Zellen) wurden in dem entsprechenden Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von 95-100 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die Zellen mit 1 x PBS gewaschen, mit 0,25 % Trypsin/EDTA (Life Technologies) von der Kulturschale abgelöst und in einer definierten Verdünnung auf einer neuen Kulturschale ausgesät.

6.2.5.3 Kultivierung in Suspension wachsender HeLa S3 Zellen

In Suspension wachsende HeLa S3 Zellen wurden in einem entsprechenden Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in geeigneten Spinner-Kulturflaschen kultiviert. Bei Erreichen einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml wurden die Zellen passagiert und mit einer Konzentration von 3×10^5 Zellen/ml neu eingesät.

6.2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Um adhärenent wachsende Zelllinien einzufrieren wurden diese mit Trypsin/EDTA von der Kulturschale abgelöst und in Kulturmedium aufgenommen. Die Zellen wurden bei 400 g für 5 min (RT) zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (70 % Kulturmedium, 20 % FBS, 10 % DMSO) resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen aliquotiert, auf -80 °C abgekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die eingefrorene Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit Kulturmedium versetzt und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT), um das enthaltende DMSO zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen, um die Zellen in eine Kulturschale auszusähen.

6.2.5.5 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen

Um aus adhärenenten Zellen einen Zellextrakt zu generieren wurden die Zellen im ersten Schritt mit 1 x PBS gewaschen und anschließend in einem geeigneten Lysepuffer aufgenommen. Hierfür wurden die Zellen anhand einer Zellkulturschabers von

Kulturschalenboden abgeschabt, mittels einer Pipette vorsichtig durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt und in einer Reaktionsgefäß überführt. Der Extrakt wurde für mind. 10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation für 10 min bei 10000 rpm (4 °C) geklärt. Anschließend wurde der Überstand zur Lagerung in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C weggefroren.

6.2.5.6 *Transiente Transfektion von siRNA*

Um HeLa Zellen mit einer siRNA zu transfizieren wurden die Zellen in 24-well Kulturplatten mit Transfektionsmedium ausgesät und bis zu einer maximalen Konfluenz von 60 % kultiviert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofectamine® RNAiMax Reagent (Life Technologies) gemäß den Herstellerangaben.

6.2.6 **Virologische Methoden**

6.2.6.1 *Infektion von adhärenenten, eukaryotischen Zellen mit rVACV*

Für eine Infektion mit VACV sollten die Zellen entsprechend der ausgesäten Kulturschale eine Konfluenz von 90-100 % erreicht haben. Um die benötigte Virusmenge der verwendeten VACV Stammlösung zu ermitteln, wird eine zusätzlich ausgesäte Kulturschale mittels Trypsinierung geerntet und gezählt. Für die Berechnung der benötigten Virusmenge entsprechend der gewünschten MOI (multiplicity of infection), wurde folgende Formel verwendet.

$$\frac{\text{Gesamtzellzahl} \times \text{MOI}}{\text{Virustiter}} = \text{benötigte Virusmenge (Volumen)}$$

Die Angabe MOI 1 bedeutet, dass theoretisch jede Zelle von einem Viruspartikel infiziert wird, wobei der Virustiter in der Einheit pfu/ml (plaque forming units pro ml) angegeben wird. Die VACV Stammlösung wurde vor jeder Infektion im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und dreimal für je 30 s bei 4 °C sonifiziert, um die Formierung von Virusaggregaten zu vermeiden. Die berechnete Virusmenge wurde für die Infektion einer Kulturschale in ein geeignetes Volumen an Infektionsmedium (250 µl/24-well, 1 ml/6-well, 5 ml/10cm Schalen,

10 ml/14,5cm Schalen) gegeben, gevortext und anschließend auf die Zellen gegeben. Die Kulturschalen wurden für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Schalen insgesamt dreimal leicht geschwenkt um die gleichmäßige Verteilung der Viren zu gewährleisten. Am Ende der Inkubation wurde das Infektionsmedium durch ein definiertes Volumen an Kulturmedium (1 ml/24-well, 3 ml/6-well, 12 ml/10cm Schale, 25 ml/14,5cm Schale) ersetzt.

6.2.6.2 Replikationsassay

Zur Analyse der replikativen Eigenschaften des verwendeten rVACV-Konstrukt GLV-1h439 im Vergleich zum Parentalvirus GLV-1h68 in HeLa S3 Zellen wurden diese kultiviert und nach Aussaat in 24-well Platten mit einer MOI von 1 infiziert (siehe 6.2.6.1). Zu den Zeitpunkten 2, 6, 24, 48 und 72 h nach viraler Infektion (hpi) wurde der Überstand abgenommen und bei -80 °C gelagert. Die Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen, mit 250 µl Trypsin/EDTA von der Kulturschale gelöst und anschließend wurde die Reaktion mit 500 µl Kulturmedium gestoppt. Die Zellen wurden bei 3000 rpm für 3 min zentrifugiert, das Pellet wurde in 1 ml 1 x PBS resuspendiert und das Zelllysate wurde ebenso bei -80 °C gelagert. Für die folgende Analyse durch einen Standard Plaque Assay wurde das Zelllysate sowie der Zellüberstand drei aufeinanderfolgenden Auftau-Einfrier-Zyklen mit flüssigem Stickstoff unterzogen. Die Analyse wurde aus statistischen Gründen in Triplikaten durchgeführt.

6.2.6.3 Standard Plaque Assay

Der Standard Plaque Assay ist ein virologischer Standardtest, welchen den Virustiter einer definierten Probe durch die Einheit plaque forming units (pfu) pro Milliliter festlegt. Hierfür wurden CV-1 Zellen in 24-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 100 % inkubiert. Jede zu analysierende Probe wurde dreimal für je 30 s sonifiziert und anschließend wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} angelegt. Handelt es sich bei der zu analysierenden Probe um ein aufgereinigtes Virus, erfolgt eine Verdünnung bis zu einem Verhältnis von 10^{-9} . Die CV-1 Zellen wurden mit 1 x PBS gewaschen und mit 250 µl der jeweiligen Verdünnung infiziert. Pro Verdünnung werden zwei Wells infiziert und in der Endauswertung ein Mittelwert der beiden gebildet. Die Zellen wurden für je eine Stunde mit dem entsprechenden Infektionsmedium inkubiert. Die Infektion wurde durch die

Überschichtung mit Carboxymethylcellulose-Medium (CMC-Medium) an einer flächendeckenden Ausbereitung gehindert, wodurch nach der Färbung isolierte Plaques erkennbar sind. Die Färbung wird nach zweitägiger Inkubation durch die Zugabe von 250 µl Kristallviolett-Färbelösung für 24-48 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Die einzelnen Plaques sind das Ergebnis einer definierten Zellyse, nach einer viralen Infektion innerhalb der ausgesäten Zellschicht, welche durch die Färbelösung erkennbar sind. Hierbei wird vorausgesetzt, dass ein infektiöser Viruspartikel eine Zelle infiziert und letztendlich einen Virusplaque formt. Anschließend werden die Zellen mit H₂O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Ausschließlich Wells die eine Plaquedichte zwischen 10-100 besitzen werden gezählt und für die statistische Auswertung verwendet. Der Virustiter wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Plaques}}{\text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Infektionsvolumen}} = \text{Virustiter (Pfu/ml)}$$

7 Literaturverzeichnis

1. Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, & Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12(1):1-8.
2. Berget SM, Moore C, & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(8):3171-3175.
3. Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, & Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39(3 Pt 2):499-509.
4. Malim MH, McCarn DF, Tiley LS, & Cullen BR (1991) Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol* 65(8):4248-4254.
5. Martuza RL, Malick A, Markert JM, Ruffner KL, & Coen DM (1991) Experimental therapy of human glioma by means of a genetically engineered virus mutant. *Science* 252(5007):854-856.
6. Southam CM, Hilleman MR, & Werner JH (1956) Pathogenicity and oncolytic capacity of RI virus strain RI-67 in man. *J Lab Clin Med* 47(4):573-582.
7. Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, Parrott RH, & Ward TG (1953) Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84(3):570-573.
8. Zhang Q, *et al.* (2007) Eradication of solid human breast tumors in nude mice with an intravenously injected light-emitting oncolytic vaccinia virus. *Cancer Res* 67(20):10038-10046.
9. Broyles SS (2003) Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* 84(Pt 9):2293-2303.
10. Harrison SC, *et al.* (2004) Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(31):11178-11192.
11. Anonymous (1902) Edward Jenner. his Life. his Work, and his Writings. *Br Med J* 2(2166):1-17.
12. Condit RC, Moussatche N, & Traktman P (2006) In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res* 66:31-124.
13. Mercer J & Helenius A (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* 320(5875):531-535.
14. Schmidt FI, Bleck CK, Helenius A, & Mercer J (2011) Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J* 30(17):3647-3661.
15. Schmidt FI, Bleck CK, & Mercer J (2012) Poxvirus host cell entry. *Curr Opin Virol* 2(1):20-27.
16. Ichihashi Y & Oie M (1983) The activation of vaccinia virus infectivity by the transfer of phosphatidylserine from the plasma membrane. *Virology* 130(2):306-317.
17. Mercer J & Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11(5):510-520.
18. Frei AP, *et al.* (2012) Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nat Biotechnol* 30(10):997-1001.
19. Townsley AC & Moss B (2007) Two distinct low-pH steps promote entry of vaccinia virus. *J Virol* 81(16):8613-8620.
20. Townsley AC, Weisberg AS, Wagenaar TR, & Moss B (2006) Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* 80(18):8899-8908.
21. Ichihashi Y (1996) Extracellular enveloped vaccinia virus escapes neutralization. *Virology* 217(2):478-485.

22. Rizopoulos Z, *et al.* (2015) Vaccinia Virus Infection Requires Maturation of Macropinosomes. *Traffic* 16(8):814-831.
23. Schmidt FI, *et al.* (2013) Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. *Cell Rep* 4(3):464-476.
24. Dales S (1963) The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. *J Cell Biol* 18:51-72.
25. Kates JR & McAuslan BR (1967) Poxvirus DNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(1):134-141.
26. Munyon W, Paoletti E, & Grace JT, Jr. (1967) RNA polymerase activity in purified infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58(6):2280-2287.
27. Kilcher S, *et al.* (2014) siRNA screen of early poxvirus genes identifies the AAA+ ATPase D5 as the virus genome-uncoating factor. *Cell Host Microbe* 15(1):103-112.
28. Kates JR & McAuslan BR (1967) Messenger RNA synthesis by a "coated" viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 57(2):314-320.
29. Holowczak JA (1972) Uncoating of poxviruses. I. Detection and characterization of subviral particles in the uncoating process. *Virology* 50(1):216-232.
30. Jones EV & Moss B (1984) Mapping of the vaccinia virus DNA polymerase gene by marker rescue and cell-free translation of selected RNA. *J Virol* 49(1):72-77.
31. Lee-Chen GJ & Niles EG (1988) Transcription and translation mapping of the 13 genes in the vaccinia virus HindIII D fragment. *Virology* 163(1):52-63.
32. Smith GL, Chan YS, & Kerr SM (1989) Transcriptional mapping and nucleotide sequence of a vaccinia virus gene encoding a polypeptide with extensive homology to DNA ligases. *Nucleic Acids Res* 17(22):9051-9062.
33. Tolonen N, Doglio L, Schleich S, & Krijnse Locker J (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* 12(7):2031-2046.
34. Roberts KL & Smith GL (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol* 16(10):472-479.
35. Liu L, Cooper T, Howley PM, & Hayball JD (2014) From crescent to mature virion: vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses* 6(10):3787-3808.
36. Ulaeto D, Grosenbach D, & Hruby DE (1996) The vaccinia virus 4c and A-type inclusion proteins are specific markers for the intracellular mature virus particle. *J Virol* 70(6):3372-3377.
37. Ward BM (2005) Visualization and characterization of the intracellular movement of vaccinia virus intracellular mature virions. *J Virol* 79(8):4755-4763.
38. Sanderson CM, Hollinshead M, & Smith GL (2000) The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J Gen Virol* 81(Pt 1):47-58.
39. Schmelz M, *et al.* (1994) Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* 68(1):130-147.
40. Hiller G & Weber K (1985) Golgi-derived membranes that contain an acylated viral polypeptide are used for vaccinia virus envelopment. *J Virol* 55(3):651-659.
41. Tooze J, Hollinshead M, Reis B, Radsak K, & Kern H (1993) Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* 60(1):163-178.
42. Ward BM & Moss B (2001) Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. *J Virol* 75(23):11651-11663.

43. Frischknecht F, *et al.* (1999) Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling. *Nature* 401(6756):926-929.
44. Newsome TP, Scaplehorn N, & Way M (2004) SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. *Science* 306(5693):124-129.
45. Payne LG (1979) Identification of the vaccinia hemagglutinin polypeptide from a cell system yielding large amounts of extracellular enveloped virus. *J Virol* 31(1):147-155.
46. Doceul V, Hollinshead M, Breiman A, Laval K, & Smith GL (2012) Protein B5 is required on extracellular enveloped vaccinia virus for repulsion of superinfecting virions. *J Gen Virol* 93(Pt 9):1876-1886.
47. Broyles SS & Moss B (1986) Homology between RNA polymerases of poxviruses, prokaryotes, and eukaryotes: nucleotide sequence and transcriptional analysis of vaccinia virus genes encoding 147-kDa and 22-kDa subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(10):3141-3145.
48. Patel DD & Pickup DJ (1989) The second-largest subunit of the poxvirus RNA polymerase is similar to the corresponding subunits of procaryotic and eucaryotic RNA polymerases. *J Virol* 63(3):1076-1086.
49. Amegadzie BY, *et al.* (1991) Identification, sequence, and expression of the gene encoding the second-largest subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 180(1):88-98.
50. Ahn BY & Moss B (1992) RNA polymerase-associated transcription specificity factor encoded by vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(8):3536-3540.
51. Amegadzie BY, Ahn BY, & Moss B (1991) Identification, sequence, and expression of the gene encoding a Mr 35,000 subunit of the vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 266(21):13712-13718.
52. Amegadzie BY, Ahn BY, & Moss B (1992) Characterization of a 7-kilodalton subunit of vaccinia virus DNA-dependent RNA polymerase with structural similarities to the smallest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *J Virol* 66(5):3003-3010.
53. Ahn BY, Gershon PD, Jones EV, & Moss B (1990) Identification of rpo30, a vaccinia virus RNA polymerase gene with structural similarity to a eucaryotic transcription elongation factor. *Mol Cell Biol* 10(10):5433-5441.
54. Ahn BY, Jones EV, & Moss B (1990) Identification of the vaccinia virus gene encoding an 18-kilodalton subunit of RNA polymerase and demonstration of a 5' poly(A) leader on its early transcript. *J Virol* 64(6):3019-3024.
55. Ahn BY, Rosel J, Cole NB, & Moss B (1992) Identification and expression of rpo19, a vaccinia virus gene encoding a 19-kilodalton DNA-dependent RNA polymerase subunit. *J Virol* 66(2):971-982.
56. Broyles SS & Pennington MJ (1990) Vaccinia virus gene encoding a 30-kilodalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 64(11):5376-5382.
57. Quick SD & Broyles SS (1990) Vaccinia virus gene D7R encodes a 20,000-dalton subunit of the viral DNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 178(2):603-605.
58. Knutson BA & Broyles SS (2008) Expansion of poxvirus RNA polymerase subunits sharing homology with corresponding subunits of RNA polymerase II. *Virus Genes* 36(2):307-311.
59. Ahn BY, Gershon PD, & Moss B (1994) RNA polymerase-associated protein Rap94 confers promoter specificity for initiating transcription of vaccinia virus early stage genes. *J Biol Chem* 269(10):7552-7557.
60. Broyles SS, Yuen L, Shuman S, & Moss B (1988) Purification of a factor required for transcription of vaccinia virus early genes. *J Biol Chem* 263(22):10754-10760.

61. Broyles SS & Fesler BS (1990) Vaccinia virus gene encoding a component of the viral early transcription factor. *J Virol* 64(4):1523-1529.
62. Gershon PD & Moss B (1990) Early transcription factor subunits are encoded by vaccinia virus late genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(11):4401-4405.
63. Li J & Broyles SS (1993) Recruitment of vaccinia virus RNA polymerase to an early gene promoter by the viral early transcription factor. *J Biol Chem* 268(4):2773-2780.
64. Baldick CJ, Jr., Cassetti MC, Harris N, & Moss B (1994) Ordered assembly of a functional preinitiation transcription complex, containing vaccinia virus early transcription factor and RNA polymerase, on an immobilized template. *J Virol* 68(9):6052-6056.
65. Cassetti MA & Moss B (1996) Interaction of the 82-kDa subunit of the vaccinia virus early transcription factor heterodimer with the promoter core sequence directs downstream DNA binding of the 70-kDa subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15):7540-7545.
66. Yang Z & Moss B (2009) Interaction of the vaccinia virus RNA polymerase-associated 94-kilodalton protein with the early transcription factor. *J Virol* 83(23):12018-12026.
67. Li J & Broyles SS (1993) The DNA-dependent ATPase activity of vaccinia virus early gene transcription factor is essential for its transcription activation function. *J Biol Chem* 268(27):20016-20021.
68. Morgan JR, Cohen LK, & Roberts BE (1984) Identification of the DNA sequences encoding the large subunit of the mRNA-capping enzyme of vaccinia virus. *J Virol* 52(1):206-214.
69. Niles EG, Lee-Chen GJ, Shuman S, Moss B, & Broyles SS (1989) Vaccinia virus gene D12L encodes the small subunit of the viral mRNA capping enzyme. *Virology* 172(2):513-522.
70. Christen LM, Sanders M, Wiler C, & Niles EG (1998) Vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I is an essential viral early gene transcription termination factor. *Virology* 245(2):360-371.
71. Deng L & Shuman S (1998) Vaccinia NPH-I, a DExH-box ATPase, is the energy coupling factor for mRNA transcription termination. *Genes Dev* 12(4):538-546.
72. Mohamed MR, Latner DR, Condit RC, & Niles EG (2001) Interaction between the J3R subunit of vaccinia virus poly(A) polymerase and the H4L subunit of the viral RNA polymerase. *Virology* 280(1):143-152.
73. Shuman S, Broyles SS, & Moss B (1987) Purification and characterization of a transcription termination factor from vaccinia virions. *J Biol Chem* 262(25):12372-12380.
74. Mohamed MR & Niles EG (2000) Interaction between nucleoside triphosphate phosphohydrolase I and the H4L subunit of the viral RNA polymerase is required for vaccinia virus early gene transcript release. *J Biol Chem* 275(33):25798-25804.
75. Shuman S & Moss B (1988) Factor-dependent transcription termination by vaccinia virus RNA polymerase. Evidence that the cis-acting termination signal is in nascent RNA. *J Biol Chem* 263(13):6220-6225.
76. Yuen L & Moss B (1987) Oligonucleotide sequence signaling transcriptional termination of vaccinia virus early genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(18):6417-6421.
77. Tate J & Gollnick P (2011) Role of forward translocation in nucleoside triphosphate phosphohydrolase I (NPH I)-mediated transcription termination of vaccinia virus early genes. *J Biol Chem* 286(52):44764-44775.

78. Tate J & Gollnick P (2015) The role of vaccinia termination factor and cis-acting elements in vaccinia virus early gene transcription termination. *Virology* 485:179-188.
79. Kyrieleis OJ, Chang J, de la Pena M, Shuman S, & Cusack S (2014) Crystal structure of vaccinia virus mRNA capping enzyme provides insights into the mechanism and evolution of the capping apparatus. *Structure* 22(3):452-465.
80. Shuman S & Hurwitz J (1981) Mechanism of mRNA capping by vaccinia virus guanylyltransferase: characterization of an enzyme-guanylate intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(1):187-191.
81. Luo Y, Mao X, Deng L, Cong P, & Shuman S (1995) The D1 and D12 subunits are both essential for the transcription termination factor activity of vaccinia virus capping enzyme. *J Virol* 69(6):3852-3856.
82. Gershon PD, Ahn BY, Garfield M, & Moss B (1991) Poly(A) polymerase and a dissociable polyadenylation stimulatory factor encoded by vaccinia virus. *Cell* 66(6):1269-1278.
83. Schnierle BS, Gershon PD, & Moss B (1992) Cap-specific mRNA (nucleoside-O^{2'}-)-methyltransferase and poly(A) polymerase stimulatory activities of vaccinia virus are mediated by a single protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(7):2897-2901.
84. Gershon PD & Moss B (1993) Stimulation of poly(A) tail elongation by the VP39 subunit of the vaccinia virus-encoded poly(A) polymerase. *J Biol Chem* 268(3):2203-2210.
85. Zheng G, *et al.* (2015) Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing. *Nat Methods* 12(9):835-837.
86. Cramer P, Bushnell DA, & Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: RNA polymerase II at 2.8 angstrom resolution. *Science* 292(5523):1863-1876.
87. Bernecky C, Herzog F, Baumeister W, Plitzko JM, & Cramer P (2016) Structure of transcribing mammalian RNA polymerase II. *Nature* 529(7587):551-554.
88. Werner F & Grohmann D (2011) Evolution of multisubunit RNA polymerases in the three domains of life. *Nat Rev Microbiol* 9(2):85-98.
89. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, & Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22(2):195-201.
90. Krissinel E & Henrick K (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J Mol Biol* 372(3):774-797.
91. Martinez-Rucobo FW, *et al.* (2015) Molecular Basis of Transcription-Coupled Pre-mRNA Capping. *Mol Cell* 58(6):1079-1089.
92. Ho CK & Shuman S (1999) Distinct roles for CTD Ser-2 and Ser-5 phosphorylation in the recruitment and allosteric activation of mammalian mRNA capping enzyme. *Mol Cell* 3(3):405-411.
93. Hagler J & Shuman S (1992) A freeze-frame view of eukaryotic transcription during elongation and capping of nascent mRNA. *Science* 255(5047):983-986.
94. Ensinger MJ, Martin SA, Paoletti E, & Moss B (1975) Modification of the 5'-terminus of mRNA by soluble guanylyl and methyl transferases from vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(7):2525-2529.
95. Martin SA & Moss B (1975) Modification of RNA by mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7)-methyltransferase from vaccinia virions. *J Biol Chem* 250(24):9330-9335.

96. Martin SA, Paoletti E, & Moss B (1975) Purification of mRNA guanylyltransferase and mRNA (guanine-7-) methyltransferase from vaccinia virions. *J Biol Chem* 250(24):9322-9329.
97. Broyles SS & Moss B (1988) DNA-dependent ATPase activity associated with vaccinia virus early transcription factor. *J Biol Chem* 263(22):10761-10765.
98. Zhang Y, Ahn BY, & Moss B (1994) Targeting of a multicomponent transcription apparatus into assembling vaccinia virus particles requires RAP94, an RNA polymerase-associated protein. *J Virol* 68(3):1360-1370.
99. Cassetti MC, Merchinsky M, Wolffe EJ, Weisberg AS, & Moss B (1998) DNA packaging mutant: repression of the vaccinia virus A32 gene results in noninfectious, DNA-deficient, spherical, enveloped particles. *J Virol* 72(7):5769-5780.
100. Piacente SC, Christen LA, Mohamed MR, & Niles EG (2003) Effect of selected mutations in the C-terminal region of the vaccinia virus nucleoside triphosphate phosphohydrolase I on binding to the H4L subunit of the viral RNA polymerase and early gene transcription termination in vitro. *Virology* 310(1):109-117.
101. Fontaine KA, Camarda R, & Lagunoff M (2014) Vaccinia virus requires glutamine but not glucose for efficient replication. *J Virol* 88(8):4366-4374.
102. Deberardinis RJ, Sayed N, Ditsworth D, & Thompson CB (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr Opin Genet Dev* 18(1):54-61.
103. Vastag L, Koyuncu E, Grady SL, Shenk TE, & Rabinowitz JD (2011) Divergent effects of human cytomegalovirus and herpes simplex virus-1 on cellular metabolism. *PLoS Pathog* 7(7):e1002124.
104. Chen X, *et al.* (2013) An RNA degradation machine sculpted by Ro autoantigen and noncoding RNA. *Cell* 153(1):166-177.
105. Wolin SL, *et al.* (2013) Non-coding Y RNAs as tethers and gates: Insights from bacteria. *RNA Biol* 10(10):1602-1608.
106. Wang SP & Shuman S (1996) A temperature-sensitive mutation of the vaccinia virus E11 gene encoding a 15-kDa virion component. *Virology* 216(1):252-257.
107. Kane EM & Shuman S (1992) Temperature-sensitive mutations in the vaccinia virus H4 gene encoding a component of the virion RNA polymerase. *J Virol* 66(10):5752-5762.
108. Wild T & Cramer P (2012) Biogenesis of multisubunit RNA polymerases. *Trends Biochem Sci* 37(3):99-105.
109. Gnatt AL, Cramer P, Fu J, Bushnell DA, & Kornberg RD (2001) Structural basis of transcription: an RNA polymerase II elongation complex at 3.3 Å resolution. *Science* 292(5523):1876-1882.
110. Armache KJ, Kettenberger H, & Cramer P (2003) Architecture of initiation-competent 12-subunit RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(12):6964-6968.
111. Seto J, Celenza LM, Condit RC, & Niles EG (1987) Genetic map of the vaccinia virus HindIII D Fragment. *Virology* 160(1):110-119.
112. Christen LA, Piacente S, Mohamed MR, & Niles EG (2008) Vaccinia virus early gene transcription termination factors VTF and Rap94 interact with the U9 termination motif in the nascent RNA in a transcription ternary complex. *Virology* 376(1):225-235.
113. Towbin H, Staehelin T, & Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4354.

8 Anhang

8.1 Tabelle der RNA Sequenzierergebnisse

Chr.	Typ	Start	Ende	Attribute	1h439	1h68	Anreicherung	Länge
chr17	tRNA	47269889	47269961	name=chr17.tRNA16-GlnTTG	936,73	1,00	936,726	72
chrX	rRNA	41152051	41152169	gene_id=ENSG00000199564	43,56	0,05	914,297	118
chr6	tRNA	26311974	26312046	name=chr6.tRNA173-GlnTTG	744,32	1,00	744,317	72
chr7	exon	32620554	32801399	name=ENST00000417811	4,00	0,01	636,000	180845
chr3	tRNA	45730490	45730563	name=chr3.tRNA11-ArgACG	167,57	0,35	478,762	73
chr3	exon	45730512	45730626	name=ENST00000429798.1	153,32	0,35	438,048	114
chr1	tRNA	147505037	147505109	name=chr1.tRNA19-GlnCTG	212,46	0,50	424,925	72
chr1	tRNA	145963303	145963375	name=chr1.tRNA15-GlnCTG	211,46	0,50	422,925	72
chr6	tRNA	27638343	27638416	name=chr6.tRNA138-ArgACG	294,88	0,70	421,262	73
chr7	rRNA	128337493	128337610	gene_id=ENSG00000201041	13,26	0,05	278,388	117
chr6	tRNA	28849164	28849237	name=chr6.tRNA73-ArgCCG	3199,08	12,00	266,590	73
chr14	tRNA	23398909	23398982	name=chr14.tRNA7-ArgACG	23,07	0,10	230,667	73
chr14	exon	23398818	23398961	name=ENST00000548819.1	23,07	0,10	230,667	143
chr6	piRNA	26537764	26537791	name=piR-41435	21,57	0,10	215,667	27
chr6	tRNA	26537725	26537798	name=chr6.tRNA8-ArgACG	21,57	0,10	215,667	73
chr1	tRNA	17199077	17199149	name=chr1.tRNA5-GluTTC	8,24	0,04	214,200	72
chr1	exon	17197440	17199602	name=ENSE00001698707	8,24	0,04	214,200	2162
chr16	exon	3357573	3358393	name=ENST00000574245.1	1,85	0,01	192,400	820
chr15	tRNA	89878303	89878376	name=chr15.tRNA4-ArgTCG	432,00	2,75	157,091	73
chr15	exon	89878284	89879392	name=ENST00000569473.1	432,00	2,75	157,091	1108
chr2	snRNA	175422694	175422800	gene_id=ENSG00000206965	11,70	0,12	101,599	106
chr15	tRNA	66161399	66161471	name=chr15.tRNA7-GlnCTG	301,38	3,00	100,459	72
chr3	snRNA	196511851	196511957	gene_id=ENSG00000206892	6,11	0,06	97,723	106
chr17	tRNA	73031207	73031280	name=chr17.tRNA19-ArgTCG	88,08	1,00	88,083	73
chr4	snRNA	89605999	89606105	gene_id=ENSG00000207524	9,77	0,12	84,848	106
chr3	snRNA	180949525	180949631	gene_id=ENSG00000206932	9,77	0,12	84,848	106
chr10	snRNA	103124602	103124792	gene_id=ENSG00000222414	17,57	0,21	84,320	190
chr15	snRNA	68132277	68132383	gene_id=ENSG00000206625	8,20	0,12	71,199	106
chr12	snRNA	98115494	98115600	gene_id=ENSG00000206899	8,20	0,12	71,199	106
chr1	rRNA	204531541	204531649	gene_id=ENSG00000200408	21,00	0,33	64,306	108
chr2	tRNA	11691826	11691898	name=chr2.tRNA1-PseudoCCC	7,42	0,14	51,972	72
chr19	exon	49993107	49993347	transcript_id=ENST00000484279	16,33	0,33	49,000	240
chr19	snoRNA	49993222	49993305	gene_id=ENSG00000201675	16,33	0,33	49,000	83
chrMT	tRNA	3230	3304	gene_id=ENSG00000209082	38,83	0,83	46,600	74
chrX	exon	138516716	139115600	name=AW391396	15,00	0,33	45,000	598884
chr14	miRNA	76070552	76070604	ID=MI0024976	1,06	0,02	44,517	52
chr14	rRNA	76070516	76070621	gene_id=ENSG00000201096	1,06	0,02	44,517	105
chr6	tRNA	27515530	27515602	name=chr6.tRNA146-GlnCTG	216,83	5,00	43,367	72
chr6	rRNA	153741573	153741707	gene_id=ENSG00000222806	2,01	0,05	42,111	134
chr11	rRNA	124506355	124506488	gene_id=ENSG00000200278	0,65	0,02	41,081	133

chr8	rRNA	28387928	28388036	gene_id=ENSG00000202411	1,96	0,05	41,081	108
chr6	misc	52860418	52860748	gene_id=ENSG00000202198	116,25	3,00	38,750	330
chr6	exon	52860417	52860749	name=Inc-FBXO9-1:1	116,25	3,00	38,750	332
chr18	rRNA	21750469	21750587	gene_id=ENSG00000199874	1,75	0,05	38,544	118
chr3	rRNA	179879674	179879765	gene_id=ENSG00000201822	4,19	0,11	36,856	91
chr17	tRNA	66016012	66016085	name=chr17.tRNA23-ArgCCG	36,00	1,00	36,000	73
chr14	snRNA	32672369	32672475	gene_id=ENSG00000202337	3,97	0,12	34,449	106
chr14	snRNA	32671251	32671357	gene_id=ENSG00000201654	3,97	0,12	34,449	106
chr1	rRNA	182913500	182913625	gene_id=ENSG00000199837	0,80	0,02	34,314	125

8.2 Crosslink-Daten: Komplex I der vvRPO (Prof. Dr. Henning Urlaub)

Protein 1	Intra_Inter	Protein 2	Aminosäurerest 1	Aminosäurerest 2	Anzahl	max. Score	
Rap94	Inter	Rpo133	127	732	1	1,77	
			300	1151	4	16,49	
			577	790	21	18,71	
			605	3	5	10,15	
			667	60	1	4,64	
				109	9	10,31	
				676	109	1,62	
				683	60	16,68	
				109	3	12,40	
				204	70	12,44	
			75	2,67			
			452	148	1	1,98	
		Rpo35	1	296	1	1,68	
			646	121	1	1,71	
			655	121	1	2,24	
		Intra	Rap94	127	162	4	17,79
				145	187	2	13,52
				162	127	4	17,79
					187	7	26,35
				177	187	2	14,98
			186	204	4	2,39	
			187	145	2	13,52	
				162	7	26,35	
				177	2	14,98	
				187	2	1,45	
				204	3	9,47	
			204	186	4	2,39	
				187	3	9,47	
			205	245	1	10,12	
			206	233	2	6,30	
				245	14	8,56	
			233	206	2	6,30	
				245	17	15,45	
			242	261	1	4,21	
			245	205	1	10,12	
				206	14	8,56	
				233	17	15,45	
			261	242	1	4,21	
			300	303	7	12,16	
			303	300	7	12,16	
			452	459	12	9,43	

			459	452	12	9,43
			655	667	1	2,81
			667	655	1	2,81
				682	1	1,68
				683	9	10,69
			676	683	4	12,16
			682	667	1	1,68
			683	667	9	10,69
				676	4	12,16
Rpo133	Inter	Rap94	3	605	5	10,15
			60	667	1	4,64
				683	6	16,68
			109	667	9	10,31
				676	1	1,62
				683	3	12,40
			732	127	1	1,77
			790	577	21	18,71
			1151	300	4	16,49
		Rpo147	452	269	4	3,09
				958	1	4,20
				974	5	9,71
				1097	1	1,57
			455	974	1	4,22
			790	352	2	2,68
			845	352	2	3,54
			1025	335	1	2,95
			1036	352	2	4,65
			1052	269	2	2,60
			1108	65	10	12,15
			1117	2	3	5,99
		Rpo19	1151	43	1	3,27
				60	1	1,12
		Rpo22	1151	134	6	10,78
		Rpo30	3	195	1	5,50
			184	60	7	10,39
			452	67	5	8,65
			461	67	3	11,69
		Rpo35	800	174	1	10,42
			851	174	2	5,99
		Rpo7	946	29	2	10,04
			979	29	6	17,63
				36	4	13,30
	Intra	Rpo133	16	726	5	8,98
			53	116	15	17,03
			60	109	4	9,80
				390	2	6,15
				421	1	11,91
			88	129	2	4,39
			109	60	4	9,80
			116	53	15	17,03
				129	1	5,75
			123	165	1	3,42
			129	88	2	4,39
				116	1	5,75
			139	695	2	13,67
				732	1	7,88
			160	777	1	7,11
				866	1	2,84
			165	123	1	3,42
				421	1	3,88
				777	4	11,05

			173	452	1	5,80
			179	209	10	4,29
				421	25	15,25
				452	6	9,57
				455	2	7,29
			184	452	1	3,30
			209	179	10	4,29
				452	1	7,18
			299	390	1	5,67
			337	452	1	1,30
			390	60	2	6,15
				299	1	5,67
			418	421	1	9,72
			421	60	1	11,91
				165	1	3,88
				179	25	15,25
				418	1	9,72
				452	5	11,79
				777	2	9,42
				1025	2	9,54
			452	173	1	5,80
				179	6	9,57
				184	1	3,30
				209	1	7,18
				337	1	1,30
				421	5	11,79
				461	7	8,37
			455	179	2	7,29
				461	2	4,00
			461	452	7	8,37
				455	2	4,00
			652	656	1	5,65
			656	652	1	5,65
				695	2	14,47
			695	139	2	13,67
				656	2	14,47
				1025	2	5,83
			708	777	3	7,15
			726	16	5	8,98
			732	139	1	7,88
			776	790	1	3,34
				1025	13	12,88
			777	160	1	7,11
				165	4	11,05
				421	2	9,42
				708	3	7,15
				941	1	1,01
				1025	4	10,18
			790	776	1	3,34
				800	7	9,63
				1036	1	3,55
			800	790	7	9,63
			866	160	1	2,84
			873	1025	2	4,26
			882	1025	20	13,22
				1036	1	6,42
			941	777	1	1,01
			1025	421	2	9,54
				695	2	5,83
				776	13	12,88
				777	4	10,18

				873	2	4,26
				882	20	13,22
				1036	5	9,23
				1052	2	5,56
			1036	790	1	3,55
				882	1	6,42
				1025	5	9,23
			1052	1025	2	5,56
			1117	1151	1	5,17
			1151	1117	1	5,17
Rpo147	Inter	Rap94	70	204	12	12,44
			75	204	2	2,67
			148	452	1	1,98
		Rpo133	2	1117	3	5,99
			65	1108	10	12,15
			269	452	4	3,09
				1052	2	2,60
			335	1025	1	2,95
			352	790	2	2,68
				845	2	3,54
				1036	2	4,65
			958	452	1	4,20
			974	452	5	9,71
				455	1	4,22
			1097	452	1	1,57
		Rpo19	122	43	6	5,84
			324	162	2	4,42
			485	162	2	3,59
			1228	43	20	26,85
		Rpo22	6	135	5	4,91
			1202	141	5	15,80
			1210	135	1	3,98
			1228	135	8	4,23
		Rpo30	590	191	7	6,65
				195	4	5,98
			598	198	2	2,25
			617	140	1	7,40
			666	198	3	3,70
			835	195	7	6,37
			937	195	10	3,34
			951	67	1	2,39
			956	191	6	5,01
			958	67	1	5,61
			974	60	16	21,31
			1097	60	9	10,16
				67	2	5,06
				80	1	8,09
				85	1	5,76
			1100	60	2	2,59
				67	3	3,48
			1119	191	2	2,61
				195	1	2,34
		Rpo7	1097	20	1	2,40
	Intra	Rpo147	15	1227	2	3,19
			28	70	2	3,20
			37	229	3	8,89
			70	28	2	3,20
			109	122	7	6,16
				1228	2	5,71
			122	109	7	6,16
			126	128	2	3,17

				154	1	2,05
			128	126	2	3,17
				154	1	7,30
			141	154	5	19,19
			154	126	1	2,05
				128	1	7,30
				141	5	19,19
				154	2	13,84
			229	37	3	8,89
			326	352	4	4,82
				355	5	3,83
				357	1	4,53
				1271	3	7,26
				1276	1	3,29
			352	326	4	4,82
			355	326	5	3,83
			357	326	1	4,53
			493	497	1	3,10
				511	1	1,62
			497	493	1	3,10
			511	493	1	1,62
			608	617	2	8,13
			617	608	2	8,13
			761	1210	1	2,40
			821	1118	2	8,94
			856	902	3	13,48
			902	856	3	13,48
			951	1100	1	3,54
			956	1100	1	4,99
			958	974	1	10,80
				1100	1	1,21
			974	958	1	10,80
				1100	1	1,63
			1100	951	1	3,54
				956	1	4,99
				958	1	1,21
				974	1	1,63
			1118	821	2	8,94
			1202	1218	1	8,27
				1228	8	12,59
			1210	761	1	2,40
				1218	1	2,46
				1228	1	2,45
			1218	1202	1	8,27
				1210	1	2,46
				1228	7	11,61
			1227	15	2	3,19
			1228	109	2	5,71
				1202	8	12,59
				1210	1	2,45
				1218	7	11,61
			1267	1276	3	5,27
				1278	1	5,78
			1271	326	3	7,26
			1276	326	1	3,29
				1267	3	5,27
			1278	1267	1	5,78
Rpo18	Intra	Rpo18	33	47	1	4,37
			47	33	1	4,37
Rpo19	Inter	Rpo133	43	1151	1	3,27
			60	1151	1	1,12

		Rpo147	43	122	6	5,84
				1228	20	26,85
			162	324	2	4,42
				485	2	3,59
		Rpo22	43	134	1	2,42
				135	2	2,16
				141	3	7,66
				160	10	7,02
			60	135	2	1,69
				160	3	5,95
	Intra	Rpo19	156	162	1	1,35
			162	156	1	1,35
Rpo22	Inter	Rpo133	134	1151	6	10,78
		Rpo147	135	6	5	4,91
				1210	1	3,98
				1228	8	4,23
			141	1202	5	15,80
		Rpo19	134	43	1	2,42
			135	43	2	2,16
				60	2	1,69
			141	43	3	7,66
			160	43	10	7,02
				60	3	5,95
	Intra	Rpo22	134	141	1	4,54
				160	1	7,97
			135	141	4	5,34
				160	4	6,52
			141	134	1	4,54
				135	4	5,34
				160	29	16,41
			160	134	1	7,97
				135	4	6,52
				141	29	16,41
Rpo30	Inter	Rpo133	60	184	7	10,39
			67	452	5	8,65
				461	3	11,69
			195	3	1	5,50
		Rpo147	60	974	16	21,31
				1097	9	10,16
				1100	2	2,59
			67	951	1	2,39
				958	1	5,61
				1097	2	5,06
				1100	3	3,48
			80	1097	1	8,09
			85	1097	1	5,76
			140	617	1	7,40
			191	590	7	6,65
				956	6	5,01
				1119	2	2,61
			195	590	4	5,98
				835	7	6,37
				937	10	3,34
				1119	1	2,34
			198	598	2	2,25
				666	3	3,70
	Intra	Rpo30	50	115	1	6,45
				140	2	4,39
			54	85	3	6,45
				115	8	10,68
			60	80	3	8,57

				85	39	14,44
			80	60	3	8,57
				85	5	7,30
			85	54	3	6,45
				60	39	14,44
				80	5	7,30
				91	3	7,34
			91	85	3	7,34
				108	14	20,46
				115	25	8,85
				130	1	5,02
			108	91	14	20,46
			115	50	1	6,45
				54	8	10,68
				91	25	8,85
			130	91	1	5,02
				191	2	8,32
			140	50	2	4,39
				191	5	8,15
				195	6	8,50
			191	130	2	8,32
				140	5	8,15
			195	140	6	8,50
Rpo35	Inter	Rap94	121	646	1	1,71
				655	1	2,24
			296	1	1	1,68
		Rpo133	174	800	1	10,42
				851	2	5,99
		Rpo7	121	20	1	4,43
	Intra	Rpo35	289	297	2	14,50
			297	289	2	14,50
Rpo7	Inter	Rpo133	29	946	2	10,04
				979	6	17,63
			36	979	4	13,30
		Rpo147	20	1097	1	2,40
		Rpo35	20	121	1	4,43
	Intra	Rpo7	20	25	1	2,95
				26	3	4,20
				29	4	9,24
			25	20	1	2,95
			26	20	3	4,20
			29	20	4	9,24

8.3 Crosslink-Daten: Komplex II der vvRPO (Prof. Dr. Henning Urlaub)

Protein 1	Intra_Inter	Protein 2	Aminosäurerest 1	Aminosäurerest 2	Anzahl	max. Score
E11L	Inter	NPH1	56	626	1	5,82
			62	32	28	18,00
			122	32	18	16,75
		Rap94	122	452	8	10,09
				453	2	5,29
		Rpo133	56	390	12	16,47
	Intra				18	12,25
NPH1	Inter	E11L	32	62	28	18,00
				122	18	16,75
			626	56	1	5,82
		Rap94	32	16	1	10,67

				459	1	6,13
				643	1	3,29
			122	187	1	7,15
				204	1	10,92
			133	177	8	6,72
			175	145	1	2,91
				162	1	3,82
				177	13	8,86
			215	89	4	11,39
			221	89	4	12,47
			421	162	1	5,45
			522	89	4	19,00
			556	177	3	11,80
			569	89	1	4,95
				204	1	10,15
				242	2	9,28
			574	1	2	3,67
			597	452	1	9,91
			621	452	7	7,91
		Rpo133	86	845	1	3,28
			597	390	1	6,14
		Rpo147	32	70	1	3,99
			221	28	9	10,19
				37	1	4,08
			568	28	4	11,33
			569	28	14	11,51
				37	2	14,17
				50	7	12,93
				70	1	4,65
		Rpo30	107	91	1	3,94
			280	195	1	0,02
			597	85	1	7,34
		VETF_L	416	54	1	5,45
		VETF_S	416	228	1	2,88
			597	629	1	7,73
		VTF_L	265	768	8	13,66
			362	719	5	12,20
				768	3	13,03
			416	154	1	1,06
			421	768	1	6,86
			569	332	1	4,22
			597	437	1	9,35
				546	1	11,94
		VTF_S	32	95	2	10,53
			522	95	2	12,77
	Intra				458	23,57
Rap94	Inter	E11L	452	122	8	10,09
			453	122	2	5,29
		NPH1	1	574	2	3,67
			16	32	1	10,67
			89	215	4	11,39
				221	4	12,47
				522	4	19,00
				569	1	4,95
			145	175	1	2,91
			162	175	1	3,82
				421	1	5,45
			177	133	8	6,72
				175	13	8,86
				556	3	11,80

			187	122	1	7,15
			204	122	1	10,92
				569	1	10,15
			242	569	2	9,28
			452	597	1	9,91
				621	7	7,91
			459	32	1	6,13
			643	32	1	3,29
		Rpo133	268	1139	4	13,86
			300	1151	16	18,12
			302	1151	2	8,12
			303	1151	5	7,24
			452	864	1	4,86
			516	390	1	4,42
			537	123	3	9,58
			577	88	1	15,02
				297	1	2,91
				299	1	5,06
				790	67	20,34
				800	2	10,10
			605	3	3	14,27
			627	656	4	11,88
			667	109	1	9,80
			682	60	1	8,88
			683	60	1	6,91
		Rpo147	204	70	9	13,26
				75	2	3,96
				109	1	4,64
			268	6	1	7,27
				109	10	6,86
				1228	1	3,22
			316	326	1	14,91
				1271	3	9,48
			452	148	1	6,69
			627	1015	1	11,29
		Rpo18	268	43	1	5,19
			300	47	1	6,74
			333	33	2	8,45
		Rpo35	577	134	3	12,82
				174	1	11,07
			655	121	1	2,04
		VETF_L	261	362	2	11,98
			300	54	1	6,11
		VTF_L	316	84	2	12,92
			333	427	3	9,94
	Intra				204	22,53
Rpo133	Inter	E11L	390	56	12	16,47
		NPH1	390	597	1	6,14
			845	86	1	3,28
		Rap94	3	605	3	14,27
			60	682	1	8,88
				683	1	6,91
			88	577	1	15,02
			109	667	1	9,80
			123	537	3	9,58
			297	577	1	2,91
			299	577	1	5,06
			390	516	1	4,42
			656	627	4	11,88
			790	577	67	20,34

			800	577	2	10,10
			864	452	1	4,86
			1139	268	4	13,86
			1151	300	16	18,12
				302	2	8,12
				303	5	7,24
		Rpo147	53	495	1	2,44
			184	974	7	16,88
			452	758	1	6,19
				974	4	12,38
				1100	2	5,10
			455	974	4	11,67
			461	958	2	8,04
				974	1	5,03
				1228	1	7,90
			762	403	2	10,46
			776	282	1	10,41
			845	352	1	4,18
			873	282	1	8,45
				1118	1	0,03
			882	282	2	11,20
			1002	497	2	7,82
			1025	282	3	12,05
				566	1	7,30
			1036	282	2	7,67
				566	1	5,53
			1052	269	7	12,84
				282	3	8,38
			1108	65	5	10,85
			1117	2	4	7,11
			1139	1210	1	6,52
				1218	1	9,21
				1228	2	12,19
		Rpo18	1108	33	2	12,67
			1117	33	5	10,91
			1137	33	1	1,04
			1139	43	2	6,00
		Rpo19	116	148	1	3,43
			790	159	1	6,99
		Rpo22	1151	134	6	14,60
				135	1	3,99
		Rpo30	184	60	9	14,98
				80	3	11,75
			452	67	3	7,41
			461	67	2	9,64
		Rpo35	762	174	1	7,26
			790	174	1	5,57
			800	134	1	13,26
				174	9	12,42
			851	174	8	10,47
		Rpo7	979	29	3	12,34
				36	4	20,78
			1034	20	3	8,57
		VETF_L	455	192	1	6,06
			1151	34	1	3,94
		VTF_S	90	77	2	4,10
	Intra				526	19,07
Rpo147	Inter	NPH1	28	221	9	10,19
				568	4	11,33
				569	14	11,51

			37	221	1	4,08
				569	2	14,17
			50	569	7	12,93
			70	32	1	3,99
				569	1	4,65
		Rap94	6	268	1	7,27
			70	204	9	13,26
			75	204	2	3,96
			109	204	1	4,64
				268	10	6,86
			148	452	1	6,69
			326	316	1	14,91
			1015	627	1	11,29
			1228	268	1	3,22
			1271	316	3	9,48
		Rpo133	2	1117	4	7,11
			65	1108	5	10,85
			269	1052	7	12,84
			282	776	1	10,41
				873	1	8,45
				882	2	11,20
				1025	3	12,05
				1036	2	7,67
				1052	3	8,38
			352	845	1	4,18
			403	762	2	10,46
			495	53	1	2,44
			497	1002	2	7,82
			566	1025	1	7,30
				1036	1	5,53
			758	452	1	6,19
			958	461	2	8,04
			974	184	7	16,88
				452	4	12,38
				455	4	11,67
				461	1	5,03
			1100	452	2	5,10
			1118	873	1	0,03
			1210	1139	1	6,52
			1218	1139	1	9,21
			1228	461	1	7,90
				1139	2	12,19
		Rpo18	70	43	1	3,07
			282	33	3	12,63
			340	33	4	8,87
		Rpo19	549	159	1	3,74
			560	159	1	5,71
			1228	43	3	7,29
		Rpo22	6	135	1	4,29
			109	160	2	5,51
			566	53	1	8,83
			821	53	1	4,49
			1118	53	7	15,71
			1202	135	1	5,79
				141	2	10,17
			1210	135	2	7,04
			1218	160	1	4,37
			1228	134	3	8,53
				135	12	5,12
		Rpo30	608	140	2	14,23

			617	140	4	14,11
			956	60	1	4,69
			958	60	1	6,80
				67	3	13,72
			974	60	11	22,77
				67	2	21,09
				80	6	27,37
				85	2	7,53
			987	50	1	8,27
			1015	85	1	8,11
			1028	50	4	8,99
				138	2	8,34
				140	1	6,70
				191	1	2,39
			1097	60	8	7,29
				67	2	6,16
				80	1	8,40
				85	2	6,60
			1119	50	4	6,50
			1210	85	1	10,21
		Rpo35	282	174	1	8,44
		VETF_S	70	575	1	1,15
			1102	228	1	2,30
		VTF_L	1267	154	2	7,46
			1271	79	6	12,52
				84	13	11,31
				152	4	9,75
			1276	79	5	7,82
				154	2	7,96
	Intra				330	23,89
Rpo18	Inter	Rap94	33	333	2	8,45
			43	268	1	5,19
			47	300	1	6,74
		Rpo133	33	1108	2	12,67
				1117	5	10,91
				1137	1	1,04
			43	1139	2	6,00
		Rpo147	33	282	3	12,63
				340	4	8,87
			43	70	1	3,07
		Rpo30	47	191	1	1,73
		VETF_L	43	362	2	7,00
			47	394	4	7,37
				467	1	6,14
		VTF_L	33	79	3	6,80
				84	26	15,01
				91	2	9,47
				135	9	14,02
				136	2	10,81
			47	135	5	7,98
				136	30	8,39
			107	136	1	5,96
			121	184	4	13,91
				437	2	11,12
	Intra				12	6,15
Rpo19	Inter	Rpo133	148	116	1	3,43
			159	790	1	6,99
		Rpo147	43	1228	3	7,29
			159	549	1	3,74
				560	1	5,71

		Rpo22	60	160	1	1,42
	Intra				16	6,19
Rpo22	Inter	Rpo133	134	1151	6	14,60
			135	1151	1	3,99
		Rpo147	53	566	1	8,83
				821	1	4,49
				1118	7	15,71
			134	1228	3	8,53
			135	6	1	4,29
				1202	1	5,79
				1210	2	7,04
				1228	12	5,12
			141	1202	2	10,17
			160	109	2	5,51
				1218	1	4,37
		Rpo19	160	60	1	1,42
		Rpo30	53	80	1	8,16
		VETF_L	160	15	7	11,69
		VTF_L	53	768	1	10,86
	Intra				110	24,28
Rpo30	Inter	NPH1	85	597	1	7,34
			91	107	1	3,94
			195	280	1	0,02
		Rpo133	60	184	9	14,98
			67	452	3	7,41
				461	2	9,64
			80	184	3	11,75
		Rpo147	50	987	1	8,27
				1028	4	8,99
				1119	4	6,50
			60	956	1	4,69
				958	1	6,80
				974	11	22,77
				1097	8	7,29
			67	958	3	13,72
				974	2	21,09
				1097	2	6,16
			80	974	6	27,37
				1097	1	8,40
			85	974	2	7,53
				1015	1	8,11
				1097	2	6,60
				1210	1	10,21
			138	1028	2	8,34
			140	608	2	14,23
				617	4	14,11
				1028	1	6,70
			191	1028	1	2,39
		Rpo18	191	47	1	1,73
		Rpo22	80	53	1	8,16
	Intra				290	28,04
Rpo35	Inter	Rap94	121	655	1	2,04
			134	577	3	12,82
			174	577	1	11,07
		Rpo133	134	800	1	13,26
			174	762	1	7,26
				790	1	5,57
				800	9	12,42
				851	8	10,47
		Rpo147	174	282	1	8,44

		Rpo7	116	20	1	5,69
			121	20	19	9,10
	Intra				22	16,57
Rpo7	Inter	Rpo133	20	1034	3	8,57
			29	979	3	12,34
			36	979	4	20,78
		Rpo35	20	116	1	5,69
				121	19	9,10
	Intra				14	13,00
VETF_L	Inter	NPH1	54	416	1	5,45
		Rap94	54	300	1	6,11
			362	261	2	11,98
		Rpo133	34	1151	1	3,94
			192	455	1	6,06
		Rpo18	362	43	2	7,00
			394	47	4	7,37
			467	47	1	6,14
		Rpo22	15	160	7	11,69
		VETF_S	186	67	6	11,74
			192	67	4	8,03
				629	2	8,20
			513	239	1	4,74
				629	1	6,08
			647	228	6	13,38
				599	6	12,38
			664	629	6	10,15
			671	629	2	6,91
		VTF_L	393	106	4	12,90
			394	106	4	21,45
				135	1	12,43
				136	11	13,40
			467	136	3	12,92
			513	106	2	10,27
				136	1	5,49
	Intra				300	18,96
VETF_S	Inter	NPH1	228	416	1	2,88
			629	597	1	7,73
		Rpo147	228	1102	1	2,30
			575	70	1	1,15
		VETF_L	67	186	6	11,74
				192	4	8,03
			228	647	6	13,38
			239	513	1	4,74
			599	647	6	12,38
			629	192	2	8,20
				513	1	6,08
				664	6	10,15
				671	2	6,91
		VTF_S	239	62	1	3,86
	Intra				256	15,30
VTF_L	Inter	NPH1	154	416	1	1,06
			332	569	1	4,22
			437	597	1	9,35
			546	597	1	11,94
			719	362	5	12,20
			768	265	8	13,66
				362	3	13,03
				421	1	6,86
		Rap94	84	316	2	12,92
			427	333	3	9,94

		Rpo147	79	1271	6	12,52
				1276	5	7,82
			84	1271	13	11,31
			152	1271	4	9,75
			154	1267	2	7,46
				1276	2	7,96
		Rpo18	79	33	3	6,80
			84	33	26	15,01
			91	33	2	9,47
			135	33	9	14,02
				47	5	7,98
			136	33	2	10,81
				47	30	8,39
				107	1	5,96
			184	121	4	13,91
			437	121	2	11,12
		Rpo22	768	53	1	10,86
		VETF_L	106	393	4	12,90
				394	4	21,45
				513	2	10,27
			135	394	1	12,43
			136	394	11	13,40
				467	3	12,92
				513	1	5,49
		VTF_S	117	118	1	3,51
				151	1	9,99
				277	2	9,67
			136	95	1	7,56
			386	284	3	8,49
			546	118	1	6,17
				277	2	7,47
			591	118	4	4,59
			643	118	2	6,07
			812	277	9	10,25
	Intra				566	25,74
VTF_S	Inter	NPH1	95	32	2	10,53
				522	2	12,77
		Rpo133	77	90	2	4,10
		VETF_S	62	239	1	3,86
		VTF_L	95	136	1	7,56
			118	117	1	3,51
				546	1	6,17
				591	4	4,59
				643	2	6,07
			151	117	1	9,99
			277	117	2	9,67
				546	2	7,47
				812	9	10,25
			284	386	3	8,49
	Intra				122	19,70

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines <i>intracellular mature vaccinia virion (IMV)</i> Partikels	8
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des VACV	10
Abbildung 4: Modell der frühen Transkription mit mRNA Prozessierung	14
Abbildung 5: Infektion von A549 Zellen mit dem rVACV GLV-1h439	19
Abbildung 6: Quantifizierung der viralen Partikel in GLV-439 und GLV-1h68 in HeLa S3 Zellen	20
Abbildung 7: Aufreinigung einer nativen vvrPO mittels α -FLAG IP	22
Abbildung 8: Aufreinigung nativer vvrPO Komplexe mittels Saccharose Dichtegradientenzentrifugation	24
Abbildung 11: 3'-Endmarkierung einer mit der vvrPO ko-migrierenden RNA	28
Abbildung 12: Identifikationsbestätigung der ko-migrierenden RNA durch eine Northern- Blot Analyse	30
Abbildung 14: RNase T1 Verdau verursacht keine Veränderung in der Aktivität der vvrPO	32
Abbildung 15: Replikationsdefizit nach E11L <i>Knockdown (KD)</i>	34
Abbildung 16: <i>KD</i> von E11L verursacht Veränderung in der IP von HA/FLAG-RPO133	35
Abbildung 17: Dichtegradientenzentrifugation von affinitätsgereinigten nativen vvrPO Komplexen	37
Abbildung 18: Negativkontrastierung von Komplex I der vvrPO	38
Abbildung 19: Kryo-EM Analyse von Komplex I der vvrPO im Vergleich zur humanen RNA Pol II	39
Abbildung 20: Negativkontrastierung von Komplex II der vvrPO	41
Abbildung 21: Kryo-EM Analyse von Komplex II der vvrPO im Vergleich zur humanen RNA Pol II	42
Abbildung 22: Quervernetzungen von RPO35 und RAP94 mit den zur Pol II homologen Untereinheiten der vvrPO	44
Abbildung 23: Mehrstufige Reinigungsstrategie mit der resultierenden atomaren Struktur von E11	46
Abbildung 24: Model zur Formation des Präinitiationskomplexes an frühen, viralen Promotoren	50

Abbildung 25: Model einer möglichen Funktion von Komplex II als Übergangskomplex zwischen Transkriptionsinitiation und Transkriptionselongation.....	53
Abbildung 26: Strukturvorhersage der vWRPO im Vergleich zur zellulären RNA Polymerase II	58
Abbildung 27: Genetischer Hintergrund der rekombinanten Viren GLV-1h68, GLV-1h439 und GLV-1h440	76

10 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Definition
%	Prozent
α	Alpha
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
μ	Mikro
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Å	Ångström
aa	Aminosäure
AAV	Adeno-assoziierte Viren
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)- benzensulfonylfluorid
APS	Ammoniumpersulfat
AT	Österreich (engl. <i>Austria</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Bis-Tris	2-bis(2-hydroxyethyl)amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
ca.	circa
CaCl_2	Calciumchlorid
CDC	Center of Disease Control and Prevention
cDNA	komplementäre DNA (engl.: <i>complementary DNA</i>)
CDS	kodierende Sequenz (engl.: <i>coding sequence</i>)
CEV	<i>cell-associated virion</i>
Ci	Curie
CMC	Carboxymethylcellulose
CTD	Carboxy-terminale Domäne
CTP	Cytidin-5'-triphosphat

Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DE	Deutschland
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
ect.	lat. et cetera
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>EEV</i>	<i>extracellular enveloped virion</i>
EM	Elektronenmikroskopie
et al.	und andere (lat.: et alterae)
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
for	<i>forward</i>
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HA	Hämagglutinin
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
hpi	<i>hours post infection</i>
HS	Hochsalz
HSV	Herpes-simplex-Virus
<i>IEV</i>	<i>intracellular enveloped virion</i>

<i>IMV</i>	<i>intracellular mature vaccinia virion</i>
IP	Immunpräzipitation
IPTG	1-Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranosid
<i>ITR</i>	<i>inverted terminal repeat</i>
Kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
<i>KD</i>	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
Kryo-EM	Kryo-Elektronenmikroskopie
l	Liter
LARP	La-related protein
LB	Luria Bertani
M	molar
m ⁷ G	N7-Monomethylguanosin
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA	mikroRNA
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
MnCl ₂	Manganchlorid
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
N-terminal	Ammino-Terminus
Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat

Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NES	nukleäres Exportsignal
NET	NaCl/EDTA/Tris
ng	Nanogramm
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
NPH I	<i>nucleoside phosphohydrolyse I</i>
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
pCp	[5'-P ³²]Cytidin 3',5'-bisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol II	RNA Polymerase II
prä-mRNA	<i>precursor messenger-RNA</i>
PS	Phosphatidylserinreste
PSP	PreScission Protease
pTEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RAP94	<i>RNA polymerase-associated protein 94</i>

RbCl	Rubidiumchlorid
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonucleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RPO	RNA Polymerase Untereinheit
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
<i>RUC-GFP</i>	<i>Renilla</i> Luziferase- <i>Green Fluorescent Protein</i>
rVACV	rekombinanter Vaccinia-Virus
s	Sekunde
SB	<i>super broth</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein complex</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein complex</i>
SV	Säulenvolumen
SV40	Simian-Virus 40
T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
Taq	Thermo aquaticus
TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
Tris	Tris(Hydroxymethy)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
UK	<i>United Kingdom</i>

USA	<i>United States of America</i>
US	<i>United States</i>
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
VACV	Vaccinia-Virus
VETF	<i>vaccinia virus early transcription factor</i>
VITF	<i>vaccinia virus intermediate transcription factor</i>
VLTF	<i>vaccinia virus late transcription factor</i>
VTF	<i>vaccinia virus termination factor</i>
vrRPO	Vaccinia-Virus RNA Polymerase
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WB	Western-Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
wt	Wildtyp
x -	mal
z. B.	zum Beispiel

10.1 Nukleotidbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

10.2 Aminosäuren

A	Ala	Alanin	E	Glu	Glutaminsäure
C	Cys	Cystein	F	Phe	Phenylalanin
D	Asp	Asparaginsäure	G	Gly	Glycin

H	His	Histidin	Q	Gln	Glutamin
I	Ile	Isoleucin	R	Arg	Arginin
K	Lys	Lysin	S	Ser	Serin
L	Leu	Leucin	T	Thr	Threonin
M	Met	Methionin	V	Val	Valin
N	Asn	Asparagin	W	Trp	Tryptophan
P	Pro	Prolin	Y	Tyr	Tyrosin

11 Publikationen

Bedenk K, Böttcher B, Schlosser A, Urlaub H, Grimm C, Szalay A & Fischer U. The cryo-EM structure of vaccinia virus RNA polymerase reveals structural similarity to polymerase II. Manuskript in Vorbereitung

Tsoneva D, Stritzker J, **Bedenk K**, Zhang Q, Cappello J, Fischer U, Szalay A (2015). Enzyme Biomarkers for Monitoring Biological Therapies . PLoS One 10(9):e0137573

Schäffler K, **Schulz K**, Hirmer A, Wiesner J, Grimm M, Sickmann A, Fischer U (2010). A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. RNA 16(8): 1488-1499.

12 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir beim Erstellen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen:

- * Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Utz Fischer für die Überlassung des Projektes und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.
- * Herzlich möchte ich mich zudem bei Prof. Dr. Aladár A. Szalay für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit bedanken.
- * Prof. Dr. Alexander Buchberger danke ich als Prüfer des Promotionskolloquiums, sowie für seine Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit.
- * Ich danke Dr. Clemens Grimm und Prof. Dr. Bettina Boettcher für die Generierung der strukturellen Daten und deren Auswertung. Mein Dank geht an Prof. Dr. Andreas Schlosser für die massenspektrometrischen Analysen, an Prof. Dr. Henning Urlaub für die Durchführung der Quervernetzungsexperimente und an Prof. Dr. Jörg Vogel für die Hochdurchsatzsequenzierungen.
- * Besonderen Dank geht an Stefan und Katrin, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und mich stets unterstützt haben. Stefan ich werde unsere Sushi-Meetings wirklich vermissen!
- * Speziell möchte ich mich bei allen Kollegen des Lehrstuhls für Biochemie herzlich für die schöne Zeit bedanken. Mein besonderer Dank geht hier an alle Laborkollegen aus B132. Michael du warst mir stets eine Stütze und hast mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Vielen lieben Dank auch an Maritta, Katrin, Flo, Conny und Lissy für eine schöne gemeinsame Zeit im Labor.

- * Mein herzlichster Dank geht zudem an die gesamte Arbeitsgruppe Szalay. Egal ob in Würzburg oder in San Diego, sie haben mich stets wissenschaftlich unterstützt und mich freundschaftlich in Ihrer Arbeitsgruppe aufgenommen.

- * Der abschließende Dank gilt meinen Eltern Martin und Marion, meiner Schwester Katja sowie meinem Mann Stefan, ihr habt mich in allen Phasen meiner Arbeit ununterbrochen unterstützt. Ihr habt mich so oft aufgemuntert, motiviert und getröstet. Ich bin Euch allen unendlich dankbar dafür!

13 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Biochemische und strukturelle Charakterisierung der Genexpressionsmaschinerie des
Vaccinia Virus**

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Grade keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, Mai 2016

Kristina Bedenk