

Untersuchungen zur Virulenz von Orthopockenviren in Hautzellen verschiedener Mammalia

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Margarita Voskanian

Berlin, 2020

Die Arbeit wurde im Zeitraum von Mai 2015 bis November 2019 am Robert Koch-Institut unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Nitsche durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Andreas Nitsche
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am: 14.07.2020

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Virulenz von Orthopockenviren in Hautzellen verschiedener Mammalia“ selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle dem Wortlaut oder dem Sinn nach übernommenen Stellen wurden unter Angaben der Literaturstellen als solche kenntlich gemacht. Ich versichere zudem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Berlin, 19.03.2020

Margarita Voskanian

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	vii
Summary	viii
1. Einleitung	1
1.1. Orthopockenviren	1
1.2. Replikation von Orthopockenviren am Modellvirus VACV	2
1.3. Zoonotische Orthopockenviren	4
1.4. Virulenzfaktoren der OPV	7
1.5. Hautaufbau	9
1.5.1. Wundheilungsprozess	11
1.5.2. Regulation der Zellmotilität	12
1.6. Therapiemöglichkeiten bei Infektionen mit OPV	13
2. Zielsetzung	14
3. Materialien und Methode	15
3.1. Materialien	15
3.1.1. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Antikörper	15
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	16
3.1.3. Nährmedien, Lösungen	16
3.1.4. Eukaryotische Zelllinien	16
3.1.5. Viren	17
3.1.6. Molekularbiologische Kits	17
3.1.7. Geräte, Software, Datenbanken	17
3.2. Methoden	18
3.2.1. Zytologische Methoden	18
3.2.1.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen	18
3.2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	18
3.2.2. Virologische Methoden	19
3.2.2.1. Kultivierung und Aufreinigung der Viren	19
3.2.2.2. Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Titrationstest	19
3.2.2.3. Infektionskinetik mittels Echtzeitzellanalyse (RTCA)	20
3.2.2.4. Immunfluoreszenztest (IFA)	21
3.2.2.5. Proben für Infektionsversuche	21
3.2.2.6. Zellaufschluss zur Bestimmung des Virustiters	21
3.2.2.7. Extraktion viraler DNA zur Bestimmung der Genomequivalenten	22

3.2.2.8. Bestimmung der Genomequivalente mittels real-time PCR (qPCR).....	22
3.2.2.9. Elektronenmikroskopie	22
3.2.3. Proteomik	23
3.2.3.1. Probenvorbereitung zur Messung intrazellulärer und viraler Proteinexpression	23
3.2.3.2. Messung mit nLC-MS/MS	25
3.2.3.3. Datenanalyse	26
3.2.3.3.1. Datenprozessierung mittels MaxQuant	26
3.2.3.3.2. Bioinformatische Analyse mittels Perseus	27
3.2.3.3.3 Gene Ontology (GO) Term und KEGG pathway Analyse.....	28
4. Ergebnisse	29
4.1. Experimenteller Plan	29
4.2. Replikationsfähigkeit der Viren in den HaCat, BJ-, FR- und Fc3Tg-Zellen.....	29
4.3. Bestimmung der intrazellulären Virustiter	32
4.4. VACWR infizierte Katzenzellen	34
4.4.1. Immunfluoreszenztest zur Analyse viraler Penetration im Vergleich von VACWR infizierten Fc3Tg zu VACWR infizierten HaCats	34
4.4.2. Analyse des Virustiters von OPV infizierten Fc3Tg Zellen mittels qPCR.....	36
4.4.3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VACWR infizierten Fc3Tg Zellen... ..	37
4.4.4. Replikationsfähigkeit von VACWR in diversen feline Zelllinien	42
4.5 Regulation der intrazellulären Wirtszellproteine.....	43
4.5.1 Orthopockenviraler Einfluss auf die FR Zellen	43
4.5.2. Orthopockenviraler Einfluss auf die BJ Zellen.....	49
4.5.3. Orthopockenviraler Einfluss auf die Fc3Tg Zellen.....	53
4.5.4. Orthopockenviraler Einfluss auf die HaCats	56
4.5.5. Regulierte Proteine zwischen den Spezies.....	60
4.6. Virale Proteinexpression.....	66
4.6.1. Virale Proteinexpression in den HaCat Zellen.....	66
4.6.2. Virale Proteinexpression in den BJ Zellen.....	68
4.6.3. Virale Proteinexpression in den FR Zellen	69
4.6.4. Virale Proteinexpression in den Fc3Tg Zellen	70
5. Diskussion	72
5.1. Test auf Permissivität der Zellen für CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR	73
5.2. Unvollständige oder gestörte VACWR Replikation in Fc3Tg Zellen.....	75
5.3. Replikationsfähigkeit der OPV in humanen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten	81

5.3.1. Speziesspezifische Unterschiede in den HaCats.....	90
5.3.2. Stammspezifische Unterschiede in CPXV infizierten HaCats	91
5.4. Replikation von OPV in Rattenzellen	91
6. Fazit und Ausblick	93
7. Abbildungsverzeichnis	95
8. Tabellenverzeichnis.....	96
9. Abkürzungen	97
10. Literaturverzeichnis.....	99
11. Präsentationen	105
12. Danksagung	106

Zusammenfassung

Die zunehmende Anzahl an natürlichen Infektionen mit Orthopockenviren weltweit erfordert höchste Aufmerksamkeit. Während Variola Viren von Mensch-zu-Mensch übertragen wurden und deshalb die Eradikation möglich war, ist die Eindämmung der zoonotischen Vertreter der Orthopockenviren, wie die Kuhpockenviren und Vaccinia Viren, erschwert. Beide Virusspezies können eine Vielzahl an domestizierten Tieren und Kleinvieh infizieren, aber auch auf den Menschen übertragen werden. Der Verlauf von natürlichen Infektionen hängt von vielen Faktoren ab, vom Immunstatus des Patienten, von der Virusart und dem Virusstamm, vom Infektionsweg und der Virusdosis. Dennoch scheinen dermale Symptome bei Menschen durch natürliche Übertragung der Kuhpockenviren schwerwiegender und längerfristiger anzudauern als bei Infektionen mit Vaccinia Viren. Die Differenzen im Infektionsverlauf zwischen den Virusspezies könnten mit den zahlreichen viralen immunmodulatorischen Proteinen zusammenhängen, die früh mit dem Eindringen in die Zelle exprimiert werden. Mit dieser Studie sollten Hinweise erhalten werden warum diese Virusspezies auf den verschiedenen Zellpopulationen der Haut und auch auf Hautzellen unterschiedlicher Wirte verschiedene Pathogenitäten aufweisen.

Humane Keratinozyten und dermale Fibroblasten sowie Fibroblasten von Ratten und Katzen wurden mit den Kuhpockenvirus Stämmen RatHei und Brighton Red infiziert und mit dem Vaccinia Virus Stamm Western Reserve verglichen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die virale Replikation in Keratinozyten effektiver verläuft als in Fibroblasten. Bedingt wird es durch die Fähigkeit der Viren in den Zellen intrazelluläre Prozesse zu ihren Gunsten zu modulieren. Während die Viren in den Keratinozyten die Stoffwechselprozesse und die antivirale Antwort zu Beginn der Infektion modifizieren und somit einen schnellen *host shut off* und damit die Translation viraler Proteine bewirken, werden diese Prozesse erst im späteren Infektionsverlauf in den Fibroblasten beeinflusst. Identisch verläuft bei beiden Zellarten aller Wirte die Modulation des Zytoskeletts. Die Viren bewirkten in allen untersuchten Zelllinien morphologische Veränderungen. Jedoch bildeten die mit Vaccinia Viren infizierten Katzenszellen eine Ausnahme. Hier scheint die Replikation abortiv zu verlaufen, da zu keinem Zeitpunkt ersichtlich war, dass neue reife Virionen gebildet wurden. In der Arbeit wurde weiterhin festgestellt, dass insbesondere die viralen Proteine C4 und C10 wichtige Virulenzfaktoren zu sein scheinen, die potentielle Targets für antivirale Therapeutika sein könnten.

Summary

Orthopoxvirus infections are constantly increasing all over the world and need to get more attention.

Cowpox virus and Vaccinia virus are important members of the Orthopoxviruses as they owe a zoonotic potential which makes them hard to eradicate. In opposite, Variola virus that caused smallpox was only transmitted from human to human and that is why could be eradicated.

Due to their broad host range Cowpox viruses and Vaccinia viruses infect several domestic animals and flock. The course of natural infections depends on patient's state of immune response, virus species and strain but also on the route of infection and dose. However, the local infections caused by Cowpox virus seemed to be more severe than Vaccinia virus infections.

The differences in course of infections between Vaccinia virus and Cowpox virus are regulated by the virulence factors which are expressed early post infection.

In this study different human skin cells and skin cells of various hosts were infected with representative Orthopoxviruses to gain more details for the reasons of varying pathogenicity.

The results confirmed that replication of Orthopoxviruses is favoured in human keratinocytes but less in fibroblasts. Orthopoxviruses are able to modify the intracellular processes to their favour without quantitatively compromise host cells. In keratinocytes Orthopoxviruses modify metabolic processes and antiviral response at the beginning of the infection and hereinafter enable the viral protein synthesis after host shut off. These processes will be modified in fibroblasts much later in infection and that's why the virus replication is slowed down. Modifications of morphological structure of the cells are in common in all host cells but with some time extension. But Vaccinia Virus replication in cat cells seem to be abortive as during the infection only anormal virus formations were detected over a long period.

The results also confirmed the huge impact of the proteins C4 and C10 on the course of infection. Both proteins are important virulence factors which may be targets for new antivirals.

1. Einleitung

1.1. Orthopockenviren

Orthopockenviren (OPV) gehören zur Familie der *Poxviridae*, Unterfamilie *Chordopoxvirinae*. Charakteristisch für die OPV ist ihre Backstein-artige Form in der Größenordnung von ca. 360 x 270 x 250 nm (3). Ihre lineare doppelsträngige DNA ist gemeinsam mit Transkriptionsfaktoren und Enzymen für frühe Proteine von einem bikonkaven Kapsid umgeben, welches mit zwei Lateralkörpern von einer Virusmembran stabilisiert wird. Dieses als *Mature Virion (MV)* bezeichnete infektiöse Partikel kann zu einem geringen Anteil von einer weiteren Membran umhüllt vorliegen, als das *Extracellular Enveloped Virion (EEV)*.

Das Genom der OPV umfasst eine Länge von 130 kbp bis 230 kbp (2), welches für eine Vielzahl an Proteinen in unterschiedlicher zeitlicher Reihenfolge kodiert (2).

Proteine, die essentiell für die Replikation und Virusformation sind, befinden sich im zentralen Bereich des Genoms und sind konserviert (2). Die terminalen Gene an beiden Enden des Genoms sind variabel und beeinflussen die Virus-Wirt-Wechselwirkung (2).

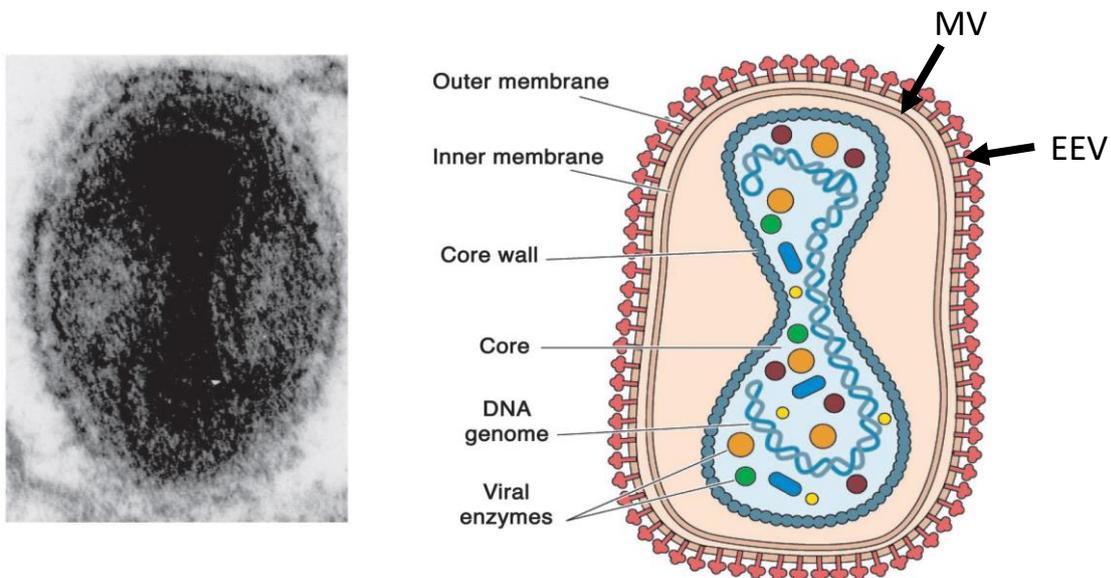


Abbildung 1.1 Aufbau des Pockenvirus (mod. nach (1))| Schematische Darstellung vom Pockenvirus. Links ist eine EM-Aufnahme vom VACV und rechts der strukturelle Aufbau vom Virus als MV und als EEV.

1.2. Replikation von Orthopockenviren am Modellvirus VACV

Während der Replikation von Vaccinia Viren (VACV) in permissiven Zellen werden zwei infektiöse Virusformen gebildet: *MV* (*Mature Virion*) und *EEV* (*Extracellular Enveloped Virus*). Diese Virionen dienen zur unterschiedlichen Verbreitung innerhalb eines Wirts und zwischen den Wirten (4). Das *IMV* verbleibt so lange in der Zelle bis diese lysiert, und ist verantwortlich für die Verbreitung von Wirt zu Wirt, da diese Virusform als stabil erachtet wird und damit eine längere Lebensdauer aufweist (4).

Das *EEV* verbleibt entweder als freies Virus und infiziert entfernte Zellen und Geweben, oder agiert als *CEV* (*Cell-associated Enveloped Virus*) und infiziert benachbarte Zellen (4). Das *EEV* sorgt damit für eine effiziente Verbreitung innerhalb des Wirts und erscheint aufgrund der äußeren Membran weniger stabil (4).

Nachdem die VACV an die Zelloberfläche adsorbieren, können sie über zwei Wege in die Zelle eindringen: entweder durch Fusion der Membran der *MVs* mit der Zellmembran, wodurch das Viruskapsid und die Lateralkörper in das Zellinnere freigesetzt werden oder durch Endozytose, genauer Makropinozytose (5). Die *EEVs* werfen vor der Aufnahme in die Zelle zunächst die äußerste Membran ab und folgen anschließend dem Aufnahmeverfahren wie die *MVs* (5). Die Fusion der Virusmembran erfolgt über den sog. *Entry/ Fusion Complex (EFC)*. Der Komplex besteht aus neun transmembranären Proteinen und zwei weiteren Membranproteinen, die mit dem *EFC* assoziieren (6).

Während das Viruskapsid in die perinukleäre Region über Mikrotubuli zu den Virusfabriken transportiert wird, werden die frühen Gene transkribiert und ins Zytoplasma zur Proteinsynthese abgegeben (6). Die frühen Gene umfassen ca. die Hälfte des Genoms und exprimieren Proteine mit verschiedenen Funktionen (7). Die frühen Proteine modulieren das angeborene Immunsystem und beeinflussen dadurch die Rekrutierung von immunologischen Zellen. Weiterhin werden auch *Host range Faktoren* exprimiert sowie Proteine für die DNA-Replikation und Transkriptionsfaktoren für intermediäre und späte Proteine.

Nach der DNA-Replikation werden die intermediären und späten Gene exprimiert und initiieren damit die Virusformation. Die *Crescents* werden aus dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) abgeleitet, welche mit dem *Scaffold Protein D13* stabilisiert werden und im weiteren Verlauf die *Immature Virions (IVs)* bilden. (6). Die *IVs* enthalten neben dem Genom auch eine Vielzahl an Proteinen, die den Reifungsprozess initiieren und abschließen. Der Großteil an *MVs* verbleibt im Zytoplasma und/ oder sammelt sich in sog. *A-Type inclusion bodies* an bis die Zelle lysiert (9). Ein kleiner Teil an *MVs* wird von einer weiteren Doppelmembran umgeben, welche vom Golgi-Apparat abgeleitet wird und bereits mit viralen Glykoproteinen besetzt ist und liegt dann als *IEV* vor (9). Die *IEVs* aktivieren die Polymerisation von Aktin zu Aktinfilamenten, um gerichtet an die Zelloberfläche transportiert zu werden (4). Durch die Fusion der äußersten Membran mit der Zellmembran werden die *EEVs* ausgeschleust. Das *EEV* infiziert entweder als *CEV* benachbarte Zellen oder als freies *EEV* entfernt liegendes Gewebe.

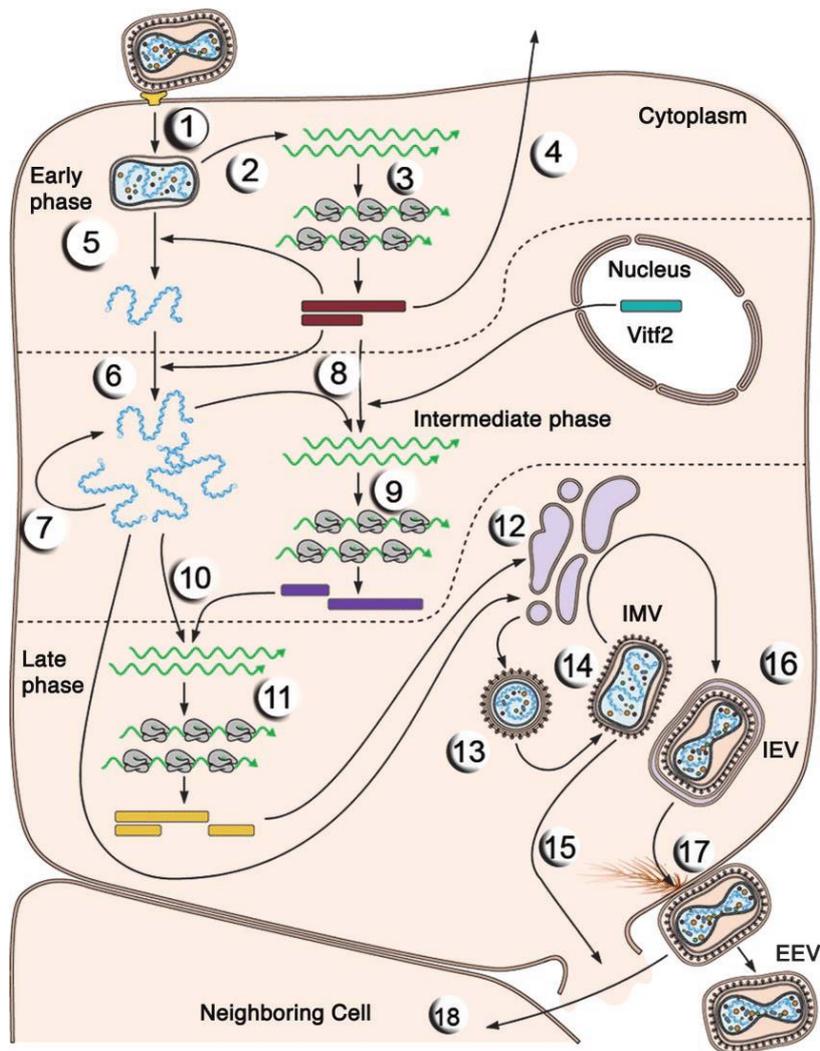


Abbildung 1.2 Replikationszyklus von VACV nach (1) | IMV – Intracellular Mature Virion, EV – Enveloped Virion, IEV – Intracellular Enveloped Virion, CEV – Cell-associated Enveloped Virus, IV – Immature Virion. ① Nach dem die EVs und MVs in die Zelle eingedrungen sind und das Viruskapsid sowie die lateralen Körper in das Zytoplasma freigesetzt haben, beginnt die Transkription der frühen Gene. ② Die Transkripte werden in das Zytoplasma abgegeben und ③ über die zelluläre Translationsmaschinerie werden die viralen Proteine synthetisiert. ④ Einige viralen Proteine werden sekretiert, um das antivirale System zu inhibieren oder die Proliferation benachbarter Zellen zu stimulieren. ⑤ Nachdem das Kapsid abgebaut wurde, wird das virale Genom freigesetzt und ⑥ die DNA-Replikation beginnt. ⑦ Neu replizierte DNA wird einerseits wieder als Vorlage zur weiteren Replikation genutzt und ⑧, ⑨ andererseits zur Expression von intermediären Proteinen verwendet, welche die Expression der späten Gene regulieren ⑩, ⑪, die für Strukturproteine und frühe Transkriptionsfaktoren kodieren. ⑫ Einige Strukturproteine bilden aus der ER-Membran sog. *Crescents*, welche das Genom, Kapsidproteine sowie die frühen Transkriptionsfaktoren einschließen und das ⑬ IV bilden. ⑭ Das IV reift zum IMV aus, welches dann entweder als solches in der Zelle verbleibt bis zur Lyse ⑮ oder durch den Golgi-Apparat von einer Doppelmembran umgeben wird ⑯ und als IEV vorliegt. Das IEV wird über Mikrotubuli an die Zelloberfläche transportiert ⑰, an der das Virus durch Fusion der äußeren Membran mit der Zellmembran als EEV freigegeben wird. Entweder bleibt das EEV an der Zellmembran als CEV haften oder es infiziert benachbarte Zellen ⑱.

1.3. Zoonotische Orthopockenviren

Das Variola Virus (VARV), welches schwerwiegende bis letale Infektionen beim Menschen verursachte (10), ist der wichtigste und gefährlichste Erreger der OPV.

Seit der Eradikation des Variola Virus werden jedoch vermehrt Infektionen mit zoonotischen OPV festgestellt. Besonders wichtig sind dabei die Erreger der Cowpox Viren (CPXV), der Affenpockenviren (MPXV) und der Vaccinia Viren (VACV) (11).

Die verstärkte Zunahme an zoonotischen Infektionen könnte durch die mangelnde Immunität gegen das VARV bedingt sein, da nach der Eradikation der Variola Viren die Impfpflicht (12) abgeschafft wurde und damit der Schutz aufgrund der immunologischen Kreuzreaktivität und -protektivität innerhalb (11) der OPV nicht mehr besteht.

Die Ausrottung des Variola Virus gelang aufgrund des engen Wirtsspektrums, da das VARV ausschließlich Menschen infizierte (10).

Infektionen mit CPXV oder VACV verlaufen in immunkompetenten Patienten i.d.R. mild und selbstlimitierend (12). Das Virus wird überwiegend über Hautverletzungen aufgenommen und verursacht über Pustel- und Ekzembildung, teilweise nekrotisierende Hautläsionen mit gestörter Wundheilung (24). Aufgrund der offenen Wunde und der fehlenden antiviralen Antwort in der Umgebung der Läsionen, könnten bakterielle Infektionen aufkommen.

Bei immunschwachen Patienten verlaufen die Infektionen dagegen schwerwiegend bis tödlich, da das Virus sich systemisch ausbreiten kann. Generalisierte Infektionen treten gehäuft bei Patienten auf, die an atopischer Dermatitis (13) leiden oder Immunsuppressiva (14) einnehmen müssen.

CPXV Infektionen sind vermehrt in Deutschland und anderen europäischen Regionen endemisch. Da CPXV ein breites Wirtsspektrum aufweisen, können sie eine Vielzahl an domestizierten Tieren (16, 17), Kleinvieh (18) als auch exotische Zootiere infizieren (15,30). Jedoch zählen Nagetiere zu den natürlichen Reservoiren der CPXV (12).

Die Virusübertragung von Tier auf Menschen erfolgt meist in direktem Kontakt mit dem Tier, z.B. durch Bisse oder Kratzer. Eine Mensch-zu-Mensch Übertragung könnte erstmals zwischen zwei Brüdern stattgefunden haben. Der ältere Bruder, welcher einen Kontakt zu Tieren negierte, entwickelte erst Symptome nach dem der jüngere Bruder bereits erkrankt war (18). Bei den Brüdern entwickelten sich große nekrotische Hautläsionen, welche erst 3 Monate später ausheilten und tiefe Vernarbungen hinterließen (Abb.1.3). Die Brüder hatten aber zum Zeitpunkt der Infektion einen Kopflausbefall, welcher während der Infektion mitbehandelt wurde. Es gibt zwar keine Angaben ob CPXV über Läuse übertragen werden, jedoch können *Suipoxviren* (Schweinpocken) über die Schweineläuse, dem *Haematopinus suis*, der als Vektor dient, übertragen werden (19).

Der Schweregrad der Infektionsverläufe ist meist abhängig von dem CPXV Stamm, dem Infektionsweg sowie der Virusdosis (40).



Abbildung 1.3 Verlauf einer CPXV Infektion nach einer potentiellen Mensch-zu -Mensch Übertragung| Therapie: desinfizierende Wundauflage, Wundausschneidungen und Amoxicillin 500 mg 3x tgl. Ausheilung nach 3 Monaten. Histologie: epidermale Ulzerationen, dermale Fibrose mit infiltrierten Lymphozyten, Granulozyten. (Abb. nach (18))

VACV wurden vermutlich erstmals durch Edward Jenner zur Immunisierung gegen Variola Viren angewandt. Später wurde das VACV während der Impfkampagne gegen das Variola Virus erfolgreich eingesetzt.

Dennoch können VACV bei einer unkontrollierten Aufnahme zu langandauernden und nekrotischen Hautläsionen führen. Als im Dezember 2018 eine Labormitarbeiterin in den USA versehentlich sich mit einem unbekanntem VACV Stamm infizierte, entwickelte sie neben Hautläsionen auch hohes Fieber, Lymphadenopathie und weitere milde Symptome (20). Die Patientin wurde mit dem in den USA neu zugelassenen Virustatikum *TPOXX* behandelt. Der Wirkstoff, Tecovirimat, inhibiert das F13 Protein, welches ein wichtiger Bestandteil der *Envelopmembran* darstellt. Die Blockade des Proteins vermeidet damit die Ausbildung und Freisetzung von *EEVs* und *CEVs* (21).

Die unspezifischen Symptome klangen bei der Patientin innerhalb weniger Tage ab. Jedoch dauert es ca. drei Monate bis die Hautläsionen ausheilten (Abb. 1.4).

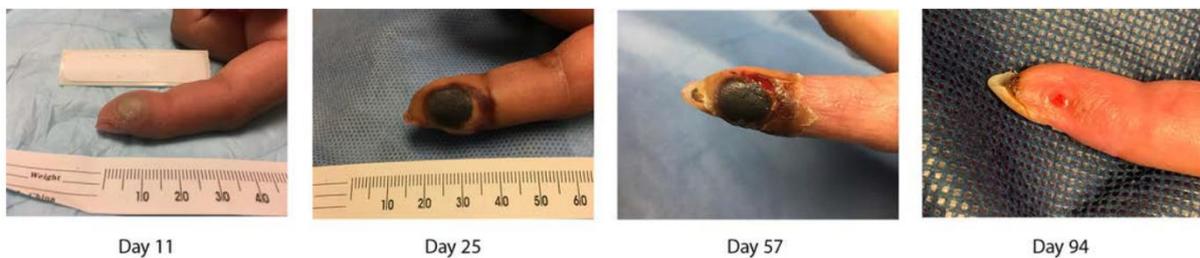


Abbildung 1.4 Verlauf einer VACV Infektion bei einem Laborunfall mit unbekanntem Stamm und Virustiter. (Abb. gemäß (20))

Auch natürliche VACV und VACV-ähnliche Infektionen, die gehäuft in ländlichen Regionen Brasiliens auftreten, verursachen lokale Hautläsionen, welche jedoch milder verlaufen und bereits nach ca. 30 Tagen abklingen (Abb. 1.5).



Abbildung 1.5 Verlauf einer natürlichen VACV Infektion, welche nach ca. 25 Tagen abgeklungen ist (Abb. nach (22))

VACV haben zwar auch ein recht breites Wirtsspektrum, jedoch lösen sie nicht in allen Wirten eine latente Infektion aus.

Während Infektionen mit CPXV in Katzen symptomlos oder über nekrotische Hautläsionen bis hin letal verlaufen können, verlaufen scheinbar VACV Infektionen in Katzen vollständig symptomlos. In einer retrospektiv durchgeführten Studie in Brasilien wurden Serumproben von Katzen auf potentielle VACV Infektionen untersucht. Die Analysen bestätigten in einigen Proben das Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern und viraler DNA (Analyse mittels PCR auf die Gene C11R und A56R) (23). Zum Zeitpunkt der Probennahme wiesen die Katzen jedoch keine Symptome auf.

Katzen scheinen zwar keine Erkrankung auszubilden, jedoch könnte das Risiko bestehen, dass sie VACV auf andere Tiere und/ oder Menschen übertragen könnten.

Zoonotische Infektionen treten aber auch gehäuft bei Patienten auf, die während des Impfprogramms der WHO gegen das Variola Virus immunisiert wurden (41).

1.4. Virulenzfaktoren der OPV

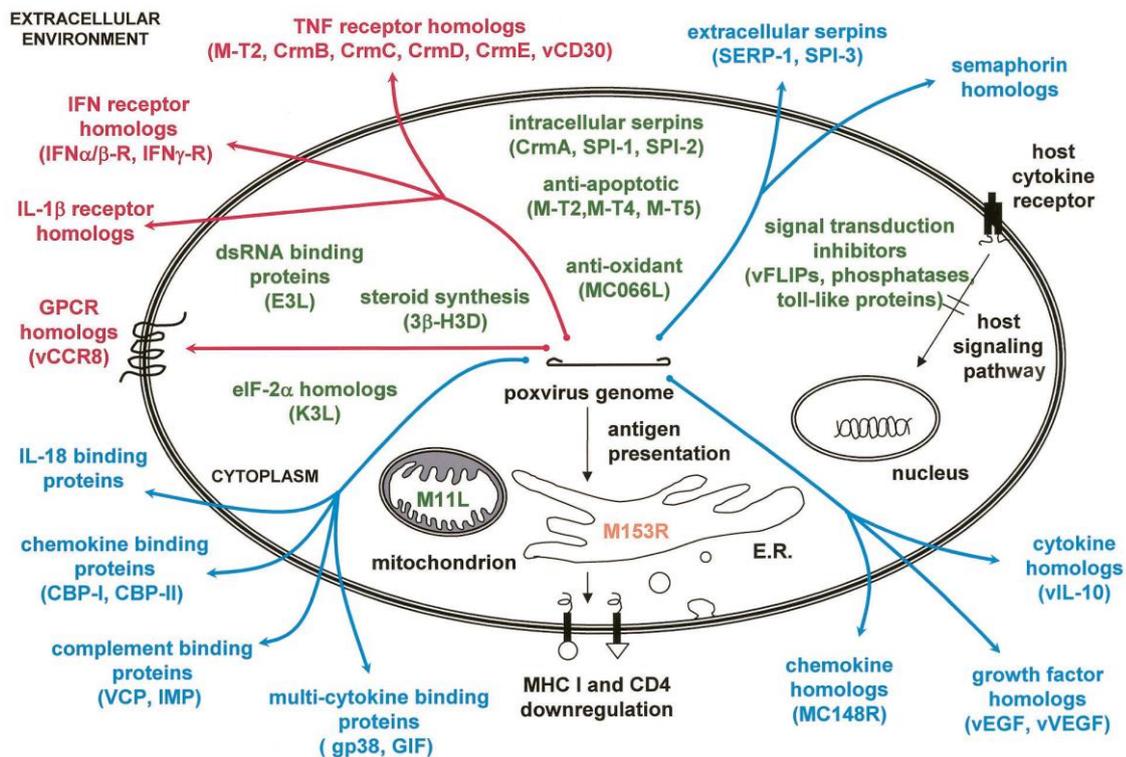


Abb. 1.6 Immunmodulatorische Strategien der Pockenviren (Abb. nach (25)) Das Pockenvirus hat sich mehrere Strategien angeeignet, um die antivirale Zellantwort zu umgehen: Virostealth (orange), Virotransduktion (grün) und Viromimicry, bestehend aus Virozeptoren (rot) und Virokinen (blau).

OPV haben ein breites Spektrum an immunmodulatorischen Strategien entwickelt, um die antivirale Antwort sowohl intra- als auch extrazellulär zu umgehen (26).

Grob werden die immunmodulatorischen Proteine der Pockenviren in drei Kategorien unterteilt (Abb.1.6):

1. *Virostealth*
2. *Viromimicry*
3. *Virotransduction*

Während *Virostealth* eher eine untergeordnete Rolle bei VACV und CPXV spielt, verursacht das Myxoma Virus schwere systemische Infektionen, in dem das Virus die *MHC I* Rezeptoren herunterreguliert und dadurch entfällt die Antigenpräsentation für die Immunzellen (27).

Die Proteine der *Viromimicry* zielen auf die extrazelluläre Immunantwort ab und inhibieren dadurch die Reaktion des Komplementsystems, der Interferone, der proinflammatorische Zytokine und Chemokine sowie Wachstumsfaktoren. Einerseits werden sog. *Virokine* sekretiert, die die Wirts-eigenen Zytokine und das Komplementsystem an der Ausführung ihrer Wirkung hemmen. Andererseits werden sog.

Virozeptoren synthetisiert, die die IFN-Rezeptoren nachahmen und die Bindung des Liganden an den Wirtsrezeptor verhindern (27).

Obwohl die viralen IFN-Rezeptoren eine nur geringe Ähnlichkeit mit den humanen Rezeptoren aufweisen, können sie dennoch die Bindung der Interferone kompetitiv hemmen.

Die *Virotransduction* konzentriert sich auf die Hemmung der intrazellulären Immunantwort (27).

Die beteiligten immunmodulatorischen Faktoren können die Induktion der Apoptose, welche über extrinsische und intrinsische Wege aktiviert werden kann, über direkten oder indirekten Weg verhindern.

Andererseits vermeiden sie auch die Aktivierung der *Interferon regulatory factor* (IRF)- und NF- κ B Signalkaskade, welche als Transkriptionsfaktoren für zahlreiche pro-inflammatorische Gene dienen.

In dieser Arbeit wurde ausschließlich auf die intrazellulär wirksamen Virulenzproteine konzentriert. In der Tabelle 1.1. sind wichtige Virulenzfaktoren der *Virotransduction*, deren Zielproteine und die damit verbundene Auswirkung dargestellt.

Tabelle 1.1 Darstellung einiger intrazellulär wirksamen Virulenzproteine

Virulenzproteine*	Zielproteine	Signalkaskaden
B2/ Poxin	<i>cGAMP</i> Aktivierung ↓	<i>cGAS-STING pathway</i> ↓
B13/Crma	Serin-Proteinase Inhibitor	Apoptose-Induktion ↓
C4	1. DNA-PK -Aktivität ↓ 2. NF- κ B – Aktivierung ↓ über Interaktion mit IKK	IRF3- und NF- κ B-Signalkaskade ↓
C10	1. DNA-PK -Aktivität ↓ 2. HIF1- α Transkriptionsfaktor ↑	IRF3- und NF- κ B-Signalkaskade ↓
E3	dsPKR – Aktivierung ↓/ dsRNA-binding protein	NF- κ B-Signalkaskade ↓; Apoptose-Induktion ↓
F1	Interaktion mit der BH3-Domäne von BAK und vermeidet damit die Bindung von BAX	Apoptose-Induktion ↓
F17	Umprogrammierung der mTOR Proteine: • <i>cGAS</i> Abbau • Metabolische Prozesse und Proteintranslation ↑	<i>cGAS-STING pathway</i> ↓
K1	NF- κ B Aktivierung ↓	NF- κ B-Signalkaskade ↓;
K3	Pseudosubstrat der dsPKR	NF- κ B-Signalkaskade ↓; Apoptose-Induktion ↓
K7	Bindung von <i>DEAD-box</i> RNA Helikase, TRAF6 und IRAK2	IRF3- und NF- κ B-Signalkaskade ↓
N1	BcL-2 like Protein	NF- κ B-Signalkaskade ↓;

*nach VACV Cop Nomenklatur

DNA-PK – dsDNA – abhängige Proteinkinase (DNA-Sensor); dsPKR – dsRNA – abhängige Proteinkinase R; HIF1- α – *Hypoxie-induced factor*; *cGAMP* - Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate; *cGAS* - *Cyclic GMP-AMP synthase*; *STING* – *Stimulator Interferon Genes*

1.5. Hautaufbau

Die Haut ist flächenmäßig das größte Organ des menschlichen Körpers. Sie dient vor allem als Schutzbarriere vor Dehydratation sowie vor äußeren Einflüssen und Verletzungen (28), sie reguliert die Körpertemperatur und ist auch der Ort der Vitamin D – Synthese.

Eine intakte Haut sorgt auch für die Wahrnehmung von Schmerz, Temperatur und Druck. Damit erfüllt sie diverse essentielle Funktionen.

Die Haut besteht aus drei Schichten, welche nochmals in Unterschichten unterteilt werden (Abb. 1.7).

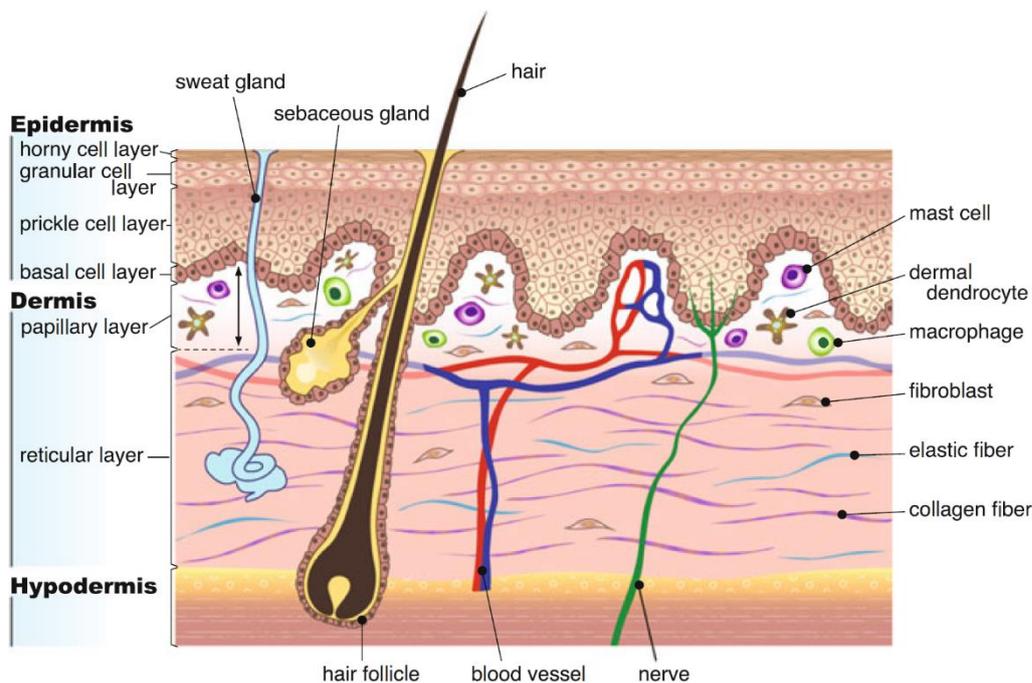


Abbildung 1.7 Schema Hautaufbau (nach 45)| Die Haut besteht aus drei Schichten: Epidermis, Dermis und Subcutis/ Hypodermis. Jede Schicht erfüllt eine wichtige Funktion und besteht aus unterschiedlichen Zellen.

Die Epidermis setzt sich aus vier Schichten zusammen. Die unterste Schicht bilden die Keratinozyten, die vertikal von unten nach oben zu Korneozyten ausdifferenzieren und damit die oberste Schicht, die Hornschicht, ausbilden. Die Proliferation und Ausdifferenzierung der Zellen folgen einem Kalziumgradienten (29).

Die Epidermis bildet aufgrund der engen Organisation der Zellen und den zahlreichen Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakten und der Hornschicht eine effiziente Schutzbarriere nach außen und innen (29). Neben den Keratinozyten sind noch Melanozyten, Merkelzellen und Langerhans-Zellen vorzufinden. Die Keratinozyten sind in der Lage Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 , und Chemokine zu produzieren und sich an der Initiation des angeborenen Immunsystems zu beteiligen und Immunzellen an den Ort des Geschehens zu locken, wie z.B. Makrophagen (42).

Die Epidermis wird durch die Basalmembran von der Dermis abgegrenzt. Die beiden Schichten sind über die sog. *Dermal-epidermal junction (DEJ)* verbunden (43). Die Produktion der Basalmembran wird gemeinsam von den Keratinozyten und papillären Fibroblasten reguliert. Die Basalmembran besteht aus

verschiedenen Elementen der Extrazellulären Matrix (EZM). Beide Zellarten synthetisieren und sekretieren Kollagen Typ IV und VII sowie Laminine (43).

Die Dermis setzt sich aus der EZM, hauptsächlich aus Kollagen und Proteoglykanen, den darin befindlichen Fibroblasten und den ortsveränderlichen hämatopoetischen Zellen zusammen.

Fibroblasten erfüllen unterschiedliche Funktionen. Sie synthetisieren und sekretieren nicht nur die Bestandteile der EZM, sondern produzieren auch bioaktive Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine und Chemokine (44). Damit regulieren sie nicht nur die Immunreaktion, sondern auch die Wundheilung (44).

Die dermalen Fibroblasten bilden jedoch eine heterogene Population, welche nach Funktion voneinander getrennt in der Dermis zu finden sind. Die Dermis ist aus der papillären und der retikulären Schicht aufgebaut. Wie in der Tabelle 1.2 dargestellt, sind die dermalen Schichten aus verschiedenen Komponenten der EZM zusammengesetzt.

Die EZM gibt der Haut ihre Elastizität und Dehnbarkeit.

Tabelle 1.2 Verteilung der EZM Moleküle in den Schichten der Dermis (nach 43)

Matrixkomponente	Papilläre Schicht	Retikuläre Schicht
Kollagen I und III	Hoher Anteil an Typ III und I	Niedriger Anteil an Typ III und I
Kollagen IV	Vorhanden in der Basalmembran	Abwesend
Kollagen VI	Vorhanden in der DEJ*	Schwach vertreten
Kollagen XII	Vorhanden	Wenig bis abwesend
Kollagen XIV	Wenig bis abwesend	Vorhanden
Kollagen XVI	Vorhanden in der DEJ-Region	Abwesend
Tenascin – C	Vorhanden in der DEJ-Region	Abwesend
Tenascin – X	Schwach vertreten in der DEJ-Region	Vorhanden
Versican	Diffus vertreten in der DEJ-Region, vorhanden in der EZM	Vorhanden
Decorin	Vorhanden	Vorhanden

*DEJ- dermal epidermal junction

Die unterste Schicht bildet die Subcutis, welche aus Adipozyten besteht. Die Subcutis verbindet die oberen Hautschichten mit dem Muskelgewebe.

Gefäße und Nervenzellen durchziehen die Haut von der Subcutis bis zur Basalmembran und versorgen so die einzelnen Schichten mit Sauerstoff und essentiellen Nährstoffen.

1.5.1. Wundheilungsprozess

Die Wundheilung verläuft in drei Phasen:

In der inflammatorischen Phase (Abb. 1.8 A) wird die Wunde erstmal durch einen Blutpfropfen vorübergehend verschlossen. Das beschädigte Gewebe und die Thrombozyten im Pfropf sekretieren pro-inflammatorische Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie TGF- β , PDGF (*Platelet-derived growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und EGF (*Epidermal growth factor*) (46) und rekrutieren Immunzellen an den Ort der Verletzung. Dabei filtrieren neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Makrophagen in die Wunde ein, die dann vor Ort ausdifferenzieren und ihre Funktionen wahrnehmen können, in dem sie entweder potentielle Keime beseitigen oder die geschädigten Zellbestandteile phagozytieren. Nachdem die Makrophagen die Zellfragmente verdaut haben, verändern sie ihre Morphology, und initiieren im Anschluss die Proliferative bzw. Reepithelialisierungs-Phase durch Stimulation der Keratinozyten, Fibroblasten und der Angiogenese.

Während der Reepithelialisierungsphase (Abb. 1.8 B) wird die Proliferation der Keratinozyten angeregt, welche zum Ort der Verletzung migrieren. Wachstumsfaktoren und Dermis-Proteine, wie Kollagen und Fibronectin aktivieren die Migration der Keratinozyten in die Wunde. In der Dermis unterstützen die Fibroblasten sowie Endothelzellen das Kapillarwachstum, die EZM Entwicklung und damit die Bildung des Granulationsgewebes (29).

Neben Kollagenfasern produzieren die dermalen Fibroblasten auch Glykosaminoglykane und Proteoglykane als Hauptbestandteile der EZM. Myofibroblasten sekretieren im Blutgerinnsel Matrix-Proteine und führen zu Kontraktionen der Wunde um die Spannkraft des Granulationsgewebes zu erhöhen. Dadurch wird der Wundverschluss unterstützt und die Bildung der Kollagenfasern aktiviert. Nach der Reepithelialisierung wird das Granulationsgewebe in Narbengewebe (Abb. 1.8 C) umgewandelt. Mit der Normalisierung der Zellzahl und der EZM-Sekretion ist der Prozess der Wundheilung abgeschlossen (29).

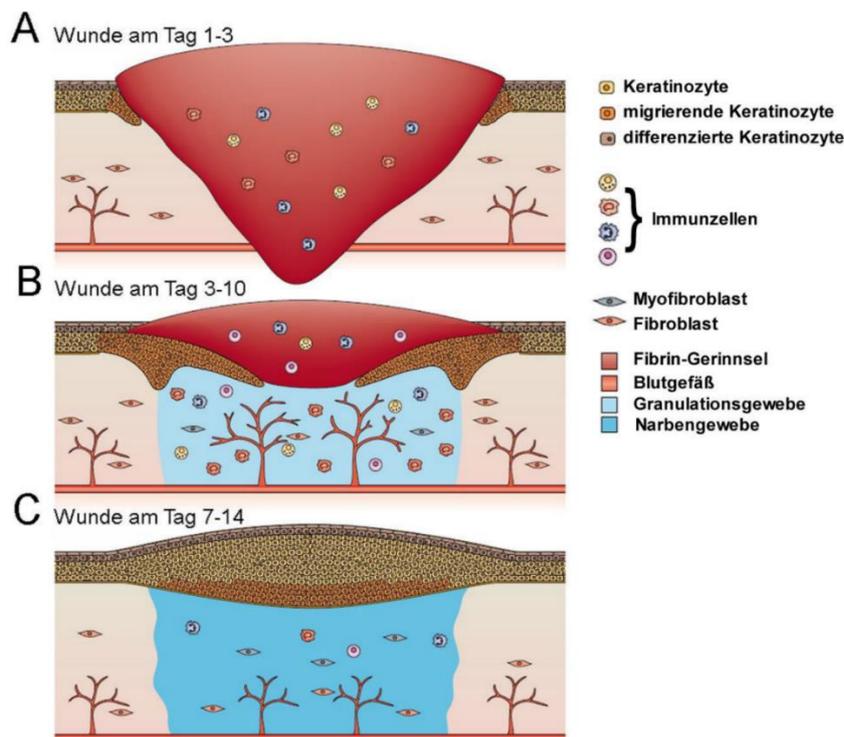


Abbildung 1.8 Wundheilungsprozess (nach 29)| Die Wundheilung erfolgt in drei Phasen: A Blutgerinnung und Beseitigung von potentiellen Störfaktoren wie Keime und Zellfragmente; B EZM Bildung, Keratinozytenproliferation und Angiogenese. C Umwandlung Granulationsgewebe in Narbengewebe und Normalisierung der Zellzahlproliferation und EZM Bildung.

1.5.2. Regulation der Zellmotilität

Die Zellmotilität ist durch Zellmigration und -projektion charakterisiert. Dabei bildet die Zelle eine Asymmetrie aus, die die Wanderung zum Zielort ermöglicht. Die Zelle bildet sog. Membranprotrusionen, wie Lamellipodien und Filopodien, in Richtung der Wanderung aus (47). Durch Ausbildung von neuen Adhäsionen an der Zellfront und Auflösung der Kontakte in der Hinterfront der Zelle, kann die Zelle migrieren. Dieser Prozess wird über die EZM und Wachstumsfaktoren reguliert (29). Während die Beschaffenheit der EZM z.B. über die Dimerisierung von Integrinen, das Zellverhalten und die Wechselwirkung des Zytoskeletts mit der Umgebung bestimmt, regulieren die epidermalen Wachstumsfaktoren über intrazelluläre Signalkaskaden das Zytoskelett, die Zell-Substrat-Kontakte sowie die Membranprotrusionen (29). Sowohl die Integrin-Dimerisierung als auch die Bindung von Wachstumsfaktoren stimulieren kleine GTP-bindende Proteine aus der Familie der Rho-GTPasen, wie Rac, Rho und Cdc42. Die GTPasen binden in ihrer aktiven Form an Effektorproteine und aktivieren so Signalkaskaden, welche das Aktin-Netzwerk sowie die Zelladhäsionen beeinflussen. Rho sorgt nicht nur für die Auflösung der Zell-Kontakte am hinteren Ende der migrierenden Zelle, sondern begünstigt auch die Zusammenlagerung von kontraktile Aktin/ Myosin Filamenten mittels der Effektoren Dia und ROCK (Rho assoziierte Kinasen). Rac und Cdc42 regulieren beide die Aktinpolymerisation über WASP- und WAVE-Proteine, welche den Aufbau des Arp2/3-Komplexes kontrollieren.

Rac ist an der Ausbildung von Lamellipodien beteiligt durch lokale Aktinpolymerisationen, während das Cdc42 lange Filopodien formt (29).

Die Translokation der Zelle wird durch die Motorproteine Myosin II reguliert. Dabei verkürzt das Protein die Aktinfasern während des Gleitens und fördert so die Kontraktilität der Zelle.

1.6. Therapiemöglichkeiten bei Infektionen mit OPV

Im Juli 2018 erteilte die FDA eine Zulassung für das Virustatikum *TPOXX*, das den Wirkstoff Tecovirimat enthält und für die Behandlung des Variola Virus indiziert ist (48).

Obwohl das Variola Virus seit über 40 Jahren eradiziert ist, besteht immer noch die Befürchtung einer erneuten Infektion. Es besteht die Vermutung, dass das Variola Virus rekonstruiert werden könnte oder aufgrund der Mutationsanfälligkeit der variablen Gene von OPV könnte ein ähnlich pathogenes Virus entstehen.

Das Tecovirimat könnte aber auch bei zoonotischen OPV Infektionen eingesetzt werden, da die Replikation der OPV identisch verläuft. Dabei hemmt das Tecovirimat die Bildung von *Enveloped Virions*, so dass keine Freisetzung von *EEVs* und *CEVs* mehr stattfinden kann.

Es ist das erste Arzneimittel, welches gegen Infektionen mit Pockenviren zugelassen ist.

Da noch keine Zulassung in der EU oder Deutschland vorliegt, könnte in besonders schweren Fällen das *TPOXX* unter Berücksichtigung des Härtefallprogramms (*Compassionate use*) Anwendung finden.

2. Zielsetzung

Natürliche Infektionen mit CPXV und VACV werden zunehmend aus geographisch unterschiedlichen Regionen berichtet.

Obwohl beide Virusspezies ein breites Wirtsspektrum aufweisen, infizieren sie jedoch teilweise unterschiedliche Wirte, welche entweder Symptome entwickeln oder nur als Überträger dienen. Während CPXV bei lokalen Infektionen meist tiefe nekrotische Wunden verursachen (18,49), welche über längere Zeit anhalten, heilen die Hautläsionen bei natürlichen Infektionen mit VACV schneller aus (50).

Beide Virusspezies unterscheiden sich auch in ihrem Bestand an immunmodulatorischen Genen.

In dieser Arbeit sollen Unterschiede und Gemeinsamkeiten in den Infektionsverläufen der CPXV und VACV auf vier verschiedenen Zelllinien untersucht werden, um mögliche Hinweise auf Pathogenitätsunterschiede zwischen den Virusspezies und ggf. auch zwischen den Virusstämmen zu erhalten. Dabei sollen

1. Untersuchungen bzgl. der Replikationsfähigkeit von VACV und CPXV in Wirtszellen verschiedener Wirte sowie in verschiedenen Zellpopulationen eines Wirts durchgeführt werden.
2. Erkenntnisse darüber gewonnen werden welche intrazellulären Prozesse durch VACV und CPXV modifiziert bzw. umprogrammiert werden.
3. mögliche Virusspezies-spezifische bzw. Virusstamm-spezifische Unterschiede identifiziert werden.
4. Zelltyp-spezifische Muster über verschiedene Spezies hinweg untersucht werden.

3. Materialien und Methode

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien, Reagenzien, Enzyme, Antikörper

Tabelle 3.1.1 Chemikalien, Reagenzien, Antikörper und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
2-Chloroacetamid (CAA)	Sigma-Aldrich
Acetonitril (ACN), LC-MS CHROMASOLV®	Sigma-Aldrich
Ameisensäure (FA), LC-MS grade	Pierce
Ammoniak	Merck
Ammoniumformiat	Sigma-Aldrich
Anti-rabbit-HRP, Ziege	Cell Signaling Technology
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth
Carboxymethylcellulose (CMC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Pierce
Essigsäure	Sigma-Aldrich
Formaldehyd	Roth
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich
Methanol (MeOH), LC-MS grade	Sigma-Aldrich
Naphthol blue black	Sigma-Aldrich
Natrium dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyde (PFA)	VWR Chemicals
Phosphorsäure	Sigma-Aldrich
Platinum Taq	Invitrogen
Sucrose BioUltra for molecular biology	Sigma-Aldrich
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma-Aldrich
Tris(2-carboxyethyl) phosphin (TCEP)	SERVA
Tris Base, Molecular Biology grade	Promega
Trypanblau Lösung, 0,4%	Invitrogen
Trypsin Gold, MS grade	Promega
TritonX-100	Sigma Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich
VACV-A27 Antikörper, Kaninchen	Acris
Wasser, LC-MS grade	Sigma-Aldrich, Pierce

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
C18 Extraction disk	Empore™ Octadecyl C ₁₈ Extraction Disk 3M
Countess™ cell counting chamber slides	Invitrogen
E-Plate® 96	ACEA Biosciences Inc.
Glass beads, 1 mm diameter	Sigma-Aldrich
ibidi® µ-Slides 8 well	ibidi
MK 360 quartz	Munktel
Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße	eppendorf
Polystyrol weiß opaque Platten, 96 well	Pierce
QMA	Whatman™ GE Healthcare life Sciences
Ultrazentrifugenröhrchen SW32	Beckman Coulter
Zellkulturflaschen, n well Platten	Nunc

3.1.3. Nährmedien, Lösungen

Tabelle 3.1.3 Nährmedien, Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Robert Koch-Institut
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	Robert Koch-Institut
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrome GmbH
Ham's Nutrient Mixture F12	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (L-Gln)	Biochrome GmbH
McCoy's 5a Medium	Sigma-Aldrich
Trypsin solution	Robert Koch-Institut
Phosphate buffered saline (PBS) ohne Mg ²⁺ and Ca ²⁺	Robert Koch-Institut
Phosphate buffered saline (PBS) mit Mg ²⁺ and Ca ²⁺	Robert Koch-Institut

3.1.4. Eukaryotische Zelllinien

Tabelle 3.1.4 Eukaryotische Zelllinien

Zellen	Zellkulturmedium	Kryokonservierungsmittel
BJ - Human skin fibroblast (ATCC® CRL-2522™)	EMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	95% Medium, 5% DMSO
HaCat - Human Keratinocytes (CLS Cell Lines Service, 300493)	DMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	90% FKS, 10% DMSO
Fc3Tg - Cat tongue fibroblast (ATCC® CCL-176™)	EMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	95% Medium, 5% DMSO
FR - Rat Spargue-Dawley skin fibroblast (ECACC 87020503)	DMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	90% FKS, 10% DMSO
AK-D – foetal cat lung normal; Epithelial (ECACC 89071903)	Ham's F12 + 10% FKS + 2 mM Gln	95% Medium, 5% DMSO
PG-4 – Cat brain Moloney sarcoma virus-transformed (ECACC 94102703)	McCoy's 5a + 10% FKS + 2 mM Gln	95% Medium, 5% DMSO
Vero – Monkey African Green kidney Vero C1008 [Vero 76, clone E6, Vero E6] (ECACC 85020206)	DMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	90% FKS, 10% DMSO
Hep2 – humane epithelial cells (ATCC® CCL-23)	DMEM + 10% FKS + 2 mM Gln	90% FKS, 10% DMSO

3.1.5. Viren

Tabelle 3.1.5 Viren

Viren	Herkunft
Cowpox Virus Brighton Red (CPXV BR)	Referenzstamm, ATCC® VR-302
Cowpoxvirus Heidelberg (CPXV RatHei)	CPXV isoliert aus einer Ratte (aus Heidelberg) im Konsiliarlabor für Pockenviren im Jahr 2009
Vaccinia Virus Western Reserve (VACWR)	Referenzstamm; ATCC® VR-1354

3.1.6. Molekularbiologische Kits

Tabelle 3.1.6 Molekularbiologische Kits

Bezeichnung	Hersteller
Nucleo Spin® Tissue	Macherey-Nagel
QIAamp® Mini Elute® Virus Spin Kit	Qiagen

3.1.7. Geräte, Software, Datenbanken

Tabelle 3.1.7 Geräte, Software, Datenbanken

Bezeichnung	Hersteller
Geräte	
ABI 7500 real-time PCR system	Applied Biosystems
Countess II FL Automated Cell Counter	Invitrogen
EASY-nanoLC	EASY nanoLC 1200 Thermo Fisher Scientific
EVOS Fluoreszenzmikroskop	Thermo Fisher Scientific
Mr. Frosty Cryo Freezing Container	Thermo Fisher Scientific
Nanodrop™ ND-1000	Peqlab
Optima XPN-100 Ultracentrifuge	Beckman Coulter
Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap™ Massenspektrometer	Thermo Fisher Scientific
Tecan Infinite® M1000 PRO & Infinite 200	Tecan
ThermoMixer	Thermo Fisher Scientific
Ultraschallgerät	Bioruptor Plus
Univapo vacuum centrifuge	UniEquip
xCELLigence™ RTCA SP	Roche Diagnostics
Zentrifuge	Eppendorf centrifuge 5417r
Software	
Cytoscape V 3.7.2	Cytoscape Consortium, Toronto
ClueGo V 2.5.5	INSERM UMRS1138 Laboratory of Integrative Cancer Immunology
MaxQuant V 1.5.2.8	Max Planck Institute of Biochemistry
Perseus V 1.6.1.1	Max Planck Institute of Biochemistry
Datenbanken	
Homo Sapiens (11.10.2018)	Uniprot
Rattus Norvegicus, (23.11.2019)	
Felis Catus (07.11.2018)	
VACV WR, CPXV RatHei, CPXV BR	Robert Koch-Institut
Gene Ontology	Cytoscape Consortium, Toronto
KEGG pathway Datenbanken	

3.2. Methoden

3.2.1. Zytologische Methoden

Alle Zellkulturexperimente inklusive infektiöse Arbeiten werden unter aseptischen Bedingungen unter der Laminar Air Flow (LAF) in BSL II Laboren durchgeführt.

Inkubationen von Zellen werden stets unter Standardbedingungen bei 37°C, 5% CO₂, 90% Feuchtigkeit durchgeführt.

3.2.1.1. Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Zellen werden in 25, 75 oder 175 cm² Zellkulturflaschen in je 4 ml, 12 ml oder 30 ml bis zur einer 90-95%igen Konfluenz kultiviert. Die adhärennten Zellen werden mit *PBS ohne* gewaschen und mit Trypsinlösung versetzt bis die Zellen sich von der Zelloberfläche bei Standardbedingungen ablösen. Die Trypsinlösung wird mit FKS-haltigem Medium neutralisiert und die Zellen anschließend 1:2 bis 1:10 gesplittet.

Die Zellzahl wird mit dem *Countess II Automated cell counter* bestimmt. 10 µl der Zellsuspension werden mit 10µl von der 0,4%igen Trypanblaulösung vermenget. 10 µl der Mischung werden auf ein *cell counting chamber slide* übertragen und gemessen.

3.2.1.2. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden in einer 175 cm² Zellkulturflasche kultiviert. Nach dem Trypsinieren und Neutralisieren werden die Zellen bei 300xg, 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend in 7 ml der passenden Konservierungslösung suspendiert (Konservierungslösungen je Zelle sind unter Materialien angegeben). Die Zellsuspension wird in Kryoröhrchen aliquotiert und im *Mr. Frosty Cryo Freezing Container* langsam auf -80°C runtergekühlt. Anschließend werden die Zellen bei -170°C gelagert.

Die Zellen werden in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und in 10 ml Medium verdünnt. Die Zellsuspension wird bei 300xg, 5 min. zentrifugiert, um das DMSO zu entfernen. Anschließend wird das Zellpellet in 4 ml Medium suspendiert und in einer 25 cm² Zellkulturflasche bei Standardbedingungen kultiviert.

3.2.2. Virologische Methoden

3.2.2.1. Kultivierung und Aufreinigung der Viren

Hep2 Zellen werden bis zu einer 90% igen Konfluenz kultiviert, mit 10 ml frischem Medium versetzt und mit einer MOI von 0,2 infiziert. Nach 1h Inkubation bei Standardbedingungen werden weitere 20 ml frisches Medium zugegeben. Nach 4 Tagen werden die noch adhärennten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und bei 500xg, 5 min. zentrifugiert. Das Zellpellet wird 2x mal mit *PBS ohne* gewaschen und in 10 ml frischem *PBS ohne* mit sterilen *glass beads* gevortext, um die Zellen aufzuschließen. Die Virussuspension wird im Anschluss über ein 36%iges Sucrosekissen in einem SW32 Zentrifugationsröhrchen aufgereinigt. Das Viruslysate wird auf 17 ml 36% Sucroslösung aufgeschichtet, mit 1mM Tris-Lösung, pH 9,0 aufgefüllt und bei 32.900xg für 80 min., 4°C zentrifugiert. Das aufgereinigte Viruspellet wird in 1ml Tris, pH 9.0 suspendiert und in einem sterilen 1,5 ml Eppendorf tube bei -80°C gelagert.

3.2.2.2. Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Titrationstest

Vero Zellen werden auf eine Zellzahl von 1×10^6 cells/ ml verdünnt. Je 200 µl der Suspension werden pro Kavität einer 24 well Platte übertragen und durch leichtes schwenken homogenisiert.

Für jede Virusprobe wird eine dekadische Verdünnungsreihe von 10^{-2} bis 10^{-7} angefertigt und jeweils 200µl in Vierfachbestimmung je Verdünnung für 4h bei Standardbedingungen inkubiert. Anschließend werden 400 µl einer 1,6% CMC-Na Lösung vorsichtig zugegeben und 4 Tage inkubiert.

Das Medium wird danach entfernt und die Zellen mit 3,7% Formaldehyd Lösung (in *PBS ohne* verdünnt) fixiert. Nach ca. 30 min. wird die Formaldehydlösung verworfen und 300 µl Naphthol Blue Black Lösung zugegeben. Nach 20 min. werden die Zellen gewaschen und unter einer Werkbank getrocknet. Anschließend werden die Plaques ausgezählt und der Mittelwert aus der Vierfachbestimmung der niedrigsten auszählbaren Verdünnungsstufe wird benutzt um den Titer in *plaque forming units (PFU)* je ml zu berechnen.

$$\text{PFU/ml} = \text{Durchschnittswert der Plaques/ (DxV)}$$

D = Verdünnungsstufe

V = Volumen der Virusverdünnung pro Kavität

3.2.2.3. Infektionskinetik mittels Echtzeitzellanalyse (RTCA)

Die Echtzeitzellanalyse wird mit dem *xCelligence System* gemessen. Das System umfasst drei Komponenten: 1. die *Single Plate Station*, 2. den *Analyzer* und 3. die Kontrolleinheit mit integrierter Software. Verwendet werden dafür speziell angefertigte 96 well E-Platten, die am Unterboden mit Elektroden besetzt sind und Widerstandsänderungen messen. Zunächst wird eine Hintergrundmessung durchgeführt, indem in jede Kavität 50 μ l Medium übertragen werden und die Zwischenräume werden mit *PBS ohne* aufgefüllt um Randeffekte zu vermeiden. Anschließend werden 8000 Zellen/ Kavität übertragen (8000 Zellen/ 100 μ l Medium) und über Nacht bei Standardbedingungen kultiviert. Der Widerstand wird als Zellindex (CI) in 15 min. Intervallen gemessen. Der Zellindex ist eine dimensionslose Größe. Bei mind. einem CI von 1 werden die Zellen mit CPXV RatHei, CPXV BR und VACWR mit je einer MOI von 0,1 und 5 jeweils in Triplikaten infiziert. Die Platte wird für 1h bei 4°C für eine synchrone Infektion gelagert. Im Anschluss wird das kalte Medium ausgetauscht und die Messung gestartet. Die Proben werden so lange gemessen bis der CI das Minimum erreicht. Parallel zu den infizierten Zellen werden auch Kontrollzellen mitgeführt. In der Abb. 3.1 ist die Echtzeitanalyse schematisch dargestellt.

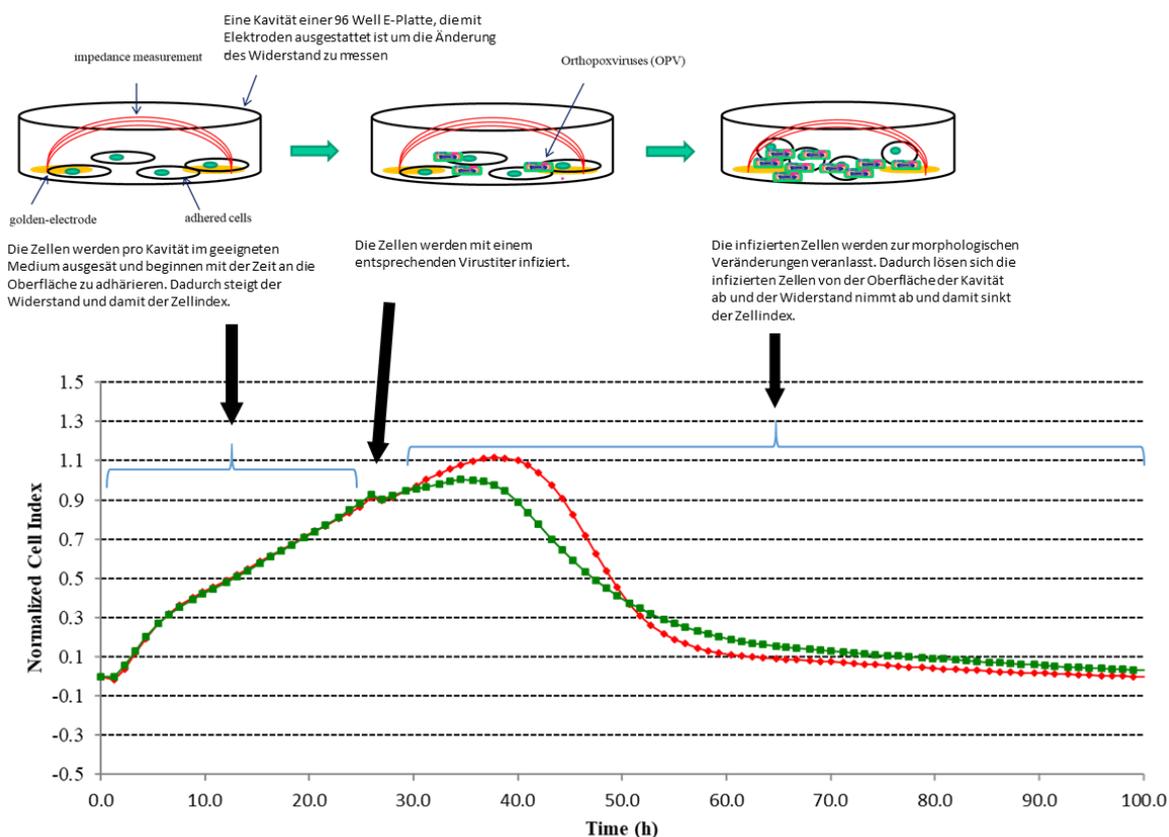


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Echtzeitanalyse Wenn die Zellen auf die Oberfläche der Kavität adhären, steigt der Widerstand und damit auch der Zellindex. Erreichen die Zellen einen Zellindex von mind. 1, können die Zellen infiziert werden. Wenn die Zellen permissiv für die Viren sind, werden morphologische Veränderungen ausgelöst, der Widerstand nimmt ab und damit sinkt auch der Zellindex.

3.2.2.4. Immunfluoreszenztest (IFA)

Die Zellen werden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/ Well in eine ibidi® μ -Slides 8 well Platte ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Jedes well enthält max. 300 μ l Medium. Die Zellen werden mit VACWR mit einer *MOI* von 5 infiziert und mit frischem Medium versetzt. Nach 3h *p.i.* und 24h *p.i.* werden die Proben mit 4%igem Paraformaldehyd für 30 min. bei Raumtemperatur (RT) fixiert (das Paraformaldehyd wird im Kühlschrank gelagert und muss vor der Anwendung für 5 min. bei 65°C im Wasserbad erwärmt werden). Im Anschluss werden die infizierten Zellen für 15 min. mit TritonX-100 Lösung behandelt, danach mit *Blockingpuffer* für 30 min. versetzt. Anschließend werden 50 μ l Primärantikörper zugegeben, welche zuvor im Verhältnis 1:100 mit *Blockingpuffer* verdünnt wurde. Nach 1h bei 37°C werden die Zellen mit 50 μ l Sekundärantikörper für 1h bei 37°C inkubiert, die im Verhältnis 1:200 mit *Blockingpuffer* verdünnt wurden. Die Zellen werden 3x mit 250 μ l PBS gewaschen. Vor der Messung mit dem EVOS Fluorezenzmikroskopen werden die Proben mit DAPI für 10 min bei RT inkubiert.

3.2.2.5. Proben für Infektionsversuche

Die Zellen werden in 25 cm² (HaCat) oder 75 cm² (BJ, FR und Fc3Tg) Zellkulturflaschen mit einer Zellzahl von ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen ausgesät und über Nacht bei Standardbedingungen inkubiert. Die Viren werden vor der Verdünnung 3x 30 sec. mit Ultraschall behandelt. Jede Zelllinie wird mit jeweils CPXV RatHei, CPXV BR und VACWR mit einer *MOI* von 5 in Triplikaten je Zeitpunkt infiziert. Die infizierten Zellen werden für 1h bei 4°C für eine synchrone Infektion inkubiert. Im Anschluss wird das kühle Medium verworfen, die Zellen mit *PBS ohne* gewaschen, mit warmem Medium versetzt und bei Standardbedingungen inkubiert.

Ab dem Zeitpunkt gilt der Infektionsbeginn. Die Proben werden je nach 1,5h, 4h, 8h und 25h *p.i.* gesammelt. Die Zellen werden mit einem Zellschaber abgelöst und bei 600xg für 5 min. zentrifugiert, 2x mit *PBS ohne* gewaschen und mit dem 2. Waschvorgang werden die infizierten Zellen im Verhältnis 50% für die Proteomikanalyse, 25% für die Bestimmung der Virustiter und 25% als Rückstellprobe in sterilen 1.5 ml Eppendorf Tubes aufgeteilt. Der Überstand wird verworfen und die Zellpellets bis zur Anwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2.6. Zellaufschluss zur Bestimmung des Virustiters

Die OPV infizierten Zellpellets werden jeweils in 100 μ l *PBS ohne* suspendiert und bei -80°C eingefroren. Anschließend werden die Zellen bei RT wieder aufgetaut. Dieser Prozess wird 3x wiederholt. Im Anschluss werden die Proben noch 3 Zyklen je 30 sec. mit Ultraschall behandelt und bei 600xg für 5 min. zentrifugiert.

3.2.2.7. Extraktion viraler DNA zur Bestimmung der Genomequivalenten

Jeweils 20 µl der OPV infizierten Fc3Tg Zellen werden jeweils ad 500 µl *PBS ohne* verdünnt. Die Extraktion der viralen DNA wird mittels Nucleo Spin® Tissue Kit von Macherey-Nagel nach der Anleitung durchgeführt. Die Elution erfolgt in 100 µl RNA-freiem Wasser.

3.2.2.8. Bestimmung der Genomequivalente mittels real-time PCR (qPCR)

Die virale Genomequivalente (GE) wird mit einer am RKI etablierten Methode bestimmt (107), die für alle OPV geeignet ist. Jede Probe wird in Zweifachbestimmung gemessen und die C_T Werte der viralen DNA werden gegen eine Standardreihe (10⁻¹ bis 10⁻⁶) berechnet (absolute Quantifizierung). Der allgemeine Ansatz pro Probe ist in der Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Amplifikation erfolgt am ABI 7500 gemäß dem Thermoprofil in der Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2 Reaktionsansatz und Thermoprofil

Volumen (25µl Ansatz)		Thermoprofil	
Bidest. H₂O	14,15	95°C	600 s
10x Taq Puffer	2,5	95°C	10s
MgCl₂ (50 mM)	2	60°C	35s *
dNTPs (2,5 mM)	2		45 x
Primer F (10µM)	0,75	* Fluoreszenzmessung	
Primer R (10µM)	0,75		
Sonde (10 µM)	0,25		
Platinum Taq	0,1		
DNA	2,5 µl		

3.2.2.9. Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopie wird im Fachgebiet „Spezielle Licht- und Elektronenmikroskopie“ (ZBS4) durchgeführt. Fc3Tg Zellen werden bis zur einer 90%igen Konfluenz in 6 well Platten kultiviert und mit VACWR mit einer MOI von 5 infiziert. Die Zellen werden für 1h bei 4°C inkubiert. Anschließend wird das kalte Medium ersetzt und die Zellen werden bei Standardbedingungen kultiviert. Nach 24h p.i. und 48h p.i. werden die Proben für die EM-Mikroskopie vorbereitet: Dazu wird das Medium entfernt und die Zellen werden mit 2,5% Glutaraldehydlösung in 0,05M HEPES Puffer, pH 7,2 bei RT für mind. 2h fixiert. Im Anschluss werden die Zellen noch nacheinander mit 1% Osmiumtetroxid in Aqua dest. für 1h, mit 0,1% Tanninsäure in 0,05M HEPES Puffer für 30 min. und mit 1% Uranylacetat in Aqua dest. für 2h behandelt. Nach stufenweiser Entwässerung in Ethanol, werden die Zellen in Epoxidharz eingebettet und bei 60°C für 48h polymerisiert. Die Proben werden mit einem Ultramikrotom ca. 60nm dünn geschnitten und mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert. Die Bilddokumentation erfolgt am Rasterelektronenmikroskop Teneo VS bei 30KV mit dem STEM-Detektor bzw. am Transmissionselektronenmikroskop Tecnai G2 Spirit bei 120 kV mit einer CCD Kamera (Megaview III, Olympus)

3.2.3. Proteomik

3.2.3.1. Probenvorbereitung zur Messung intrazellulärer und viraler Proteinexpression

Die Proben für die Proteomikanalysen werden jeweils im Verhältnis 1:5 mit dem Lysepuffer versetzt und bei 95°C für 10 min im Thermomixer erhitzt. Dabei werden die Proben bei 1000 rpm in Bewegung gehalten. Der Lysepuffer enthält 4% Natriumlaurylsulfat um die Zellen aufzuschließen sowie 10 mM TCEP, um die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken zu reduzieren und 40 mM CAA, um die Thiolgruppen zu carbamidomethylieren.

Anschließend werden die Proben je 10 Zyklen a 30 s bei 4°C mit Ultraschall behandelt mit 30 s Pause nach jedem Zyklus. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 16.000xg wird die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt. Für die Proteinquantifizierung wird der *Tryptophan Fluoreszenz Assay* angewandt.

Die Proben werden in einer 96 well Flat Bottom Platte gegen eine Tryptophan Standardreihe vermessen. Die Tryptophan Standardlösung (0,1µg/µl) wird in 200 µl 8 M Urealösung in Konzentrationen von 0,1 µg bis 0,9 µg in Dreifachbestimmung gemessen. Die Proben werden jeweils in zwei unterschiedlichen Konzentrationen in jeweils 200 µl 8 M Urealösung verdünnt und nach folgenden Parametern in einem *Infinite TecanReader* vermessen:

<i>Temperature</i>	24.5 - 25.5°C
<i>Shaking (Orbital)</i>	5s
<i>Shaking Amplitude</i>	1mm
<i>Rest</i>	2s
<i>Excitation</i>	295nm
<i>Emission</i>	350nm
<i>Exc band width</i>	5nm
<i>Em band width</i>	20nm
<i>Amplification</i>	100 manuell
<i>reads</i>	25
<i>Integration</i>	50µs
<i>Gain</i>	optimal

Die erhaltenen Messwerte werden absolut quantifiziert.

Der Proteinverdau und das Entsalzen der Proben erfolgen durch die Anwendung des sTrap Verfahrens. Je Probe wird ein sTrap verwendet. Dabei werden in eine 200 µl Pipettenspitze mit einer 14 gauge stumpfen Nadel verschiedene Filtermaterialien ausgestanzt und kombiniert. Von unten nach oben werden 4x C₁₈ plugs, 5x MK360 Quartz plugs und 6x QM-A plugs gestapelt und mit leichtem Druck zusammengepresst.

Jede Probe wird vor der Probenpräparation mit 12,15%iger Phosphorsäure im Verhältnis von 9:1 vermengt. Ggf. wird die Probe mit dem Verdünnungspuffer (4% SDS in 0,1 M Tris, pH 7,1) vor dem Ansäuern verdünnt.

Die gestopften Pipettenspitzen werden zunächst mit 120µl *sTrapping* Puffer (90% Methanol, 0,1 M Tris, pH 7,1) versetzt, und die Probe wird dann in den oberen Bereich des *sTrapping* Puffers pipettiert. Der Puffer wird trüb und die Proteine fallen aus. Die *sTrap* Pipettenspitze wird in einen 1,5 ml Eppendorf Tube überführt und bei ca. 10.000xg für 3 min. zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Durchflusses, werden die Filter mit 70 µl *sTrapping* Puffer gewaschen und erneut bei 10.000xg für 2 min zentrifugiert. Die *sTrap* Pipettenspitzen werden in ein frisches 2 ml Tube überführt und 25 µl Enzymlösung werden zugegeben (Trypsin in 0,1 M Tris, pH 8,5, Trypsin zu Protein Verhältnis 1:50). Die *sTraps* werden danach für 10 s bei 1000xg zentrifugiert und nach Verschluss der Oberseite der *sTraps* mit Parafilm für 20h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Probe wird mit 75 µl 1,3% TFA angesäuert, um das überschüssige Trypsin zu inaktivieren und andererseits werden die Peptide angesäuert, um an dem C₁₈ Material zu binden. Die Probe wird für 2 min. bei 4000xg zentrifugiert. Der Durchfluss wird verworfen und 100 µl 0,2% TFA werden zugegeben und erneut bei 4000xg für 2 min. zentrifugiert. Die *sTrap* Pipettenspitze wird in ein neues 1,5 ml Tube überführt und mit 100 µl Elutionslösung (80% ACN, 0,1% FA) versetzt und bei 4000xg für 2 min. zentrifugiert. Anschließend werden die Proben in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Die Peptide werden mit einem UV/ VIS Photometer gemessen (Nanodrop). Dafür werden die Proben jeweils in 20 µl 0,1% FA gelöst und bei 280 nm gemessen. Dafür werden 1,5 µl der Probe auf das Probehaltssystem des Nanodrops übertragen und die Messung gestartet.

Von jeder Probe einer Zelllinie werden ca. 1 µg in einem frischem 1,5 ml Tube gemischt, um die *Proteomic-Spektrenbibliothek* mittels Tandem-MS zu erstellen. Die Spektrenbibliothek wird benötigt um die Proteine über die Peptide während der Auswertung der Proben zu identifizieren.

Alle Proben werden unter Vakuum getrocknet und bei -80°C gelagert.

Die Peptide der *Proteomic-Spektrenbibliothek* werden für jede Zelllinie separat fraktioniert. Dafür werden neue 200 µl Pipettenspitzen nur mit 6 *plugs* vom C₁₈ Filtermaterial aufgefüllt und zusammengepresst. Die Zentrifugation wird bei 8000xg, 3-4 min durchgeführt. Das Filtermaterial wird mit 200 µl Methanol aktiviert und mit 0,1% TFA equilibriert. Die Proben werden in 0,1% TFA suspendiert und auf das Filtermaterial pipetiert. Die Probe wird im Anschluss gewaschen mit:

1. 200 µl 0,1% TFA
2. 200 µl 100 mM Ammoniumformiat, pH 10
3. 200 µl 20 mM Ammoniumformiat, pH 10

Danach wird die Probe fraktioniert. Die Elutionslösungen werden in folgender Reihenfolge zugegeben:

1. F1: 200 µl 5% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
2. F2: 200 µl 7,5% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
3. F3: 200 µl 10% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
4. F4: 200 µl 12,5% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
5. F5: 200 µl 15% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
6. F6: 200 µl 17,5% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
7. F7: 200 µl 20% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10
8. F8: 200 µl 50% (v/v) ACN, 20 mM Ammoniumformiat, pH 10

Die Fraktionen werden 2x unter Vakuum getrocknet. Nach dem ersten Mal werden die Fraktionen mit jeweils 100µl 50% (v/v) ACN, H₂O versetzt und erneut unter Vakuum getrocknet.

Die Proben werden bis zur Messung bei -80°C gelagert.

3.2.3.2. Messung mit nLC-MS/MS

Die Proben werden mittels nLC-Tandem-Massenspektrometrie gemessen. Die Vakuum-getrockneten Proben werden jeweils in 0,1% FA gelöst, um eine Endkonzentration von 0,2 µg/µl zu erhalten. 5 µl der Probe werden in eine 96 well Platte pipetiert. 1 µg Peptide werden für die Messung injiziert.

Die Peptide werden zunächst über eine *reverse phase* - C18 - Säule nach ihrer Hydrophobizität aufgetrennt. Die nLC - Parameter sind in der Tabelle 3.3 zusammengefasst. Hydrophilere Peptide werden zuerst eluiert und über das *Elektrospray (ESI)* Verfahren ionisiert und in dem Quadrupol-Massenfilter nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt. Die Peptide werden im Anschluss in der *HCD* Kollisionszelle fragmentiert und über die *C-Trap* in die Orbitrap überführt. Hier werden die MS1 und MS2 Spektren aufgenommen. Die Einstellungsparameter für die Tandem-MS sind in der Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.3 Einstellungsparameter der Flüssigchromatographie (nLC)

nLC Parameter		
Column	Acclaim™ PepMap™ column (20 mm x 75 µm i.d., 100 Å, C18, 3 µm)	
Eluent A	0,1% FA in H ₂ O	
Eluent B	0,1% FA in 80% ACN	
Flow rate	300 nl/min	
Gradient	0 min	4% Eluent B
	125 min.	39% Eluent B
	140 min.	80% Eluent B
	150 min.	80% Eluent B

Tabelle 3.4 Einstellungsparameter des Massenspektrometers

Tandem MS	
ESI	
<i>Spray Voltage</i>	2 kV
<i>Capillary temperature</i>	275°C
MS	
<i>Resolution</i>	70.000
<i>Scan range</i>	300 bis 1650 m/z
<i>AGC target</i>	3x10 ⁶
<i>Maximum Injection time</i>	20 ms
MS/MS	
<i>TopN</i>	10
<i>Resolution</i>	17.500
<i>Scan range</i>	200 bis 2000 m/z
<i>AGC target</i>	1x 10 ⁵
<i>Maximum Injection time</i>	50 ms
<i>Isolation window</i>	2,0 m/z
<i>Normalized Collision Energy (NCE)</i>	25%

3.2.3.3. Datenanalyse

3.2.3.3.1. Datenprozessierung mittels MaxQuant

Die Identifizierung und Label freie Quantifizierung (*LFQ*) des Wirts- und Virusproteomes wird mittels der MaxQuant Software durchgeführt (110). Die verwendeten Einstellungen werden in der Tabelle 3.5 angezeigt. Für die anderen Einstellungen wurden die *Default* Werte verwendet. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch die MS2 Spektren gegen die Bibliotheksspektren und die *LFQ* über den Vergleich der Peakflächen in den MS1 Spektren.

Tabelle 3.5 MaxQuant Einstellungen

MaxQuant Einstellungen*	
Raw Files	<p>39 Proben HaCats infiziert mit CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR, inkl. Kontrollzellen, 8 Fraktionen der Spektrenbibliothek</p> <p>39 Proben BJ infiziert mit CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR, inkl. Kontrollzellen, 8 Fraktionen der Spektrenbibliothek</p> <p>39 Proben FR infiziert mit CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR, inkl. Kontrollzellen, 8 Fraktionen der Spektrenbibliothek</p> <p>39 Proben Fc3Tg infiziert mit CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR, inkl. Kontrollzellen, 8 Fraktionen der Spektrenbibliothek</p> <p>→ Die Proben und Fraktionen wurden unter verschiedenen Gruppen geführt, um <i>LFQ</i> nur für die Proben durchzuführen</p>
Databases	<p>Homo sapiens, Rattus Norvegicus, Felis catus, CPXV BR, CPXV RatHei, VACWR</p> <p>→ Fasta files</p>
Digestion mode	Specific
Enzyme	Trypsin/P
Max. missed cleavages	2
Fixed modification	Carbamidomethyl (C)
Variable modifications	Oxidation (M), Acetylation (Protein-N-term)
FDR (Protein)	1%
FDR (Peptide)	1%
LFQ min. ratio	1
Match between runs	On
Matching time window [min]	0,7
Alignment time window [min]	20

*Restliche Einstellungen: Default

3.2.3.3.2. Bioinformatische Analyse mittels Perseus

Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit dem Perseus- Programm (108, 109).

1. Das Proteom der Wirtszellen

Die LFQ Intensitäten der *proteingroup.txt* werden in das Programm geladen und die *contaminants*, *reverse* und *only identified by site* Peptide werden zunächst entfernt.

Die Proteine werden annotiert und alle Nicht-Wirtsproteine entfernt. Die \log_2 transformierten Daten werden auf $2/3$ *valid values* gefiltert und die fehlenden Werte werden aus der Normalverteilung ersetzt und bilden die niedrigsten gemessenen Daten ab (*width: 0,3* und *down shift: 1,8*). Die Daten werden durch Subtraktion des Medians normalisiert. Im Anschluss wird ein ANOVA Multiple T-test mit einer *Permutation based FDR* von 1% durchgeführt. Die

signifikant regulierten Proteine werden gefiltert und die Z-score normalisierten Werte werden in einer *Euclidean Heatmap* geclustert.

2. Homologe Wirtszellproteine

Die homologen Proteine aller untersuchten Wirtszellen werden über die Genbezeichnungen im Perseus kombiniert. *Reverse*, *contaminants* und *only identified by site* Peptide werden entfernt und die \log_2 transformierten Daten werden auf $\frac{1}{2}$ *valid values* gefiltert und die fehlenden Werten werden durch Imputation ersetzt. Nach der Normalisierung der Proben durch Subtraktion, werden die Daten durch ANOVA mit einer *Permutation based FDR* von 1% auf signifikant unterschiedlich regulierte Proteine untersucht.

Die signifikant unterschiedlich regulierten Proteine werden gefiltert und die Z-score normalisierten Daten werden via *Euclidean Heatmap* geclustert.

3. Virale Proteine

Die LFQ Intensitäten der viralen Proteine aus der *peptide.txt* werden in das Programm geladen und *Reverse* und *contaminants* werden entfernt. Die Peptide werden über das Wirtzellproteome annotiert. Alle Peptide des Wirtzellproteomes werden entfernt und die viralen Peptide werden weiterverarbeitet. Die 2^x retransformierten Peptidwerte werden auf *valid values* filteriert: mind. 3 in mind. einer Gruppe nach dem die Triplikate je Zeitpunkt zu einer Gruppe annotiert werden. Die summierten Peptidintensitäten werden weiter zur Quantifizierung verwendet. Die fertig präparierten viralen Proteine werden als .txt Datei gespeichert und in Perseus geöffnet.

Die \log_2 transformierten Daten werden durch Subtraktion normalisiert. Diese Werte werden durch Z-score normalisiert und in einer *Euclidean Heatmap* geclustert.

3.2.3.3.3 Gene Ontology (GO) Term und KEGG pathway Analyse

Die *GO Terms* und *KEGG pathways* der signifikant regulierten Wirtszellproteine werden über die App *ClueGo* im *Cytoscape* ausgewertet. Die Proteine werden zunächst in der *Euclidean Heatmap* in Cluster unterteilt. Die Proteine einzelner Cluster werden im *ClueGo* gegen das Wirtzellproteom analysiert. Es werden nur *GO terms* und *KEGG pathways* mit einem *p-Value* $\leq 0,05$ verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Experimenteller Plan

Aufgrund des breiten Wirtsspektrums und des unterschiedlichen Pathogenitätsverlaufs von CPXV und VACV, wurden *in vitro* Studien auf vier verschiedenen Zelllinien aus unterschiedlichen Wirten durchgeführt.

Da das Virus über die verletzte oder geschädigte Haut des Wirts aufgenommen werden kann, sind die häufigsten Symptome bei Ausbruch von Infektionen Hautläsionen mit gestörter Wundheilung, die über Schmierinfektionen auch auf andere Hautareale übertragen werden können (106). Deshalb wurden *in vitro* Studien auf Hautzellen durchgeführt. HaCats und BJ-Zellen sind Vertreter der verschiedenen Hautschichten bei humanen Infektionen: HaCats als humane Keratinozyten und BJ als humane Fibroblasten. FR Zellen sind Hautfibroblasten der Wistar-Ratten. Als Katzenzelllinie wurden aufgrund des Mangels an kommerziellen Hautzelllinien Zungenfibroblasten Fc3Tg gewählt.

Da Infektionen durch CPXV auf Zungen von Katzen (31) bereits dokumentiert wurden und es hierbei auch um Fibroblasten handelt, wurden diese Zellen zum Vergleich mitgenommen.

Infiziert wurden die Zellen mit CPXV BR, einem Isolat aus einem Menschen und gilt als Referenzmodell, mit CPXV RatHei, einem Rattenisolat, und mit dem VACV- Stamm Western Reserve, welcher als laboradaptierter Modellstamm gilt (32).

Dabei sollen Unterschiede auf intrazellulärer Basis zwischen den CPXV Stämmen detektiert werden als auch Unterschiede zwischen den Virusspezies innerhalb einer Zelllinie als auch zwischen den Zelllinien untersucht werden.

4.2. Replikationsfähigkeit der Viren in den HaCat, BJ-, FR- und Fc3Tg-Zellen

Die Replikationsfähigkeit der Viren in den ausgewählten Zellen wurde mittels der Echtzeit - Zellenanalyse (*Real Time Cell Analysis*) via xCELLigence Messgerät ermittelt. Das Gerät misst den elektrischen Widerstand, welcher durch die Adhärenz der Zellen auf die Oberfläche der Kavität steigt und bei morphologischen Veränderungen der Zellen sich verändert. Je höher der Zellindex (*Cell Index* -CI), umso mehr Zellen sind adhären oder die Zellen sind stärker adhären.

Die Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen MOIs in Triplikaten infiziert und gegen Kontrollzellen, sog. *Mock* infizierten Zellen verglichen, um die morphologischen Veränderungen der Zellen auf die Infektion zurückführen zu können. Bei einer MOI von 0.1 wurden Infektionen unter natürlichen Bedingungen simuliert, wenn die Wirtszellen von einer geringen Virusdosis infiziert werden.

Die hohe MOI von 5 wurde nur zu experimentellen Zwecken verwendet. Zur besseren Vergleichbarkeit der Verläufe einer Zelllinie während der Infektionen, wurden die Zellindizes zum Zeitpunkt der Infektion normalisiert (schwarzer Pfeil).

Alle morphologischen Veränderungen der Zellen in den Bildern A, B, C, D unter der Abbildung 4.1.1 und 4.1.2 wurden durch die viralen Infektionen verursacht, da die Kontrollzellen weitergewachsen sind, selbst zu dem Zeitpunkt als die infizierten Zellen das CI-Minimum erreicht haben. In HaCats (Abb. 4.1.1

B) und FR Zellen (Abb. 4.1.1 A) hat das VACWR schneller morphologische Veränderungen initiiert und vollendet als die CPXV Stämme. Die Unterschiede zwischen den CPXV Stämmen in den FR Zellen waren marginal, dagegen in HaCats hat das CPXV RatHei eine raschere Veränderung induziert als das CPXV BR

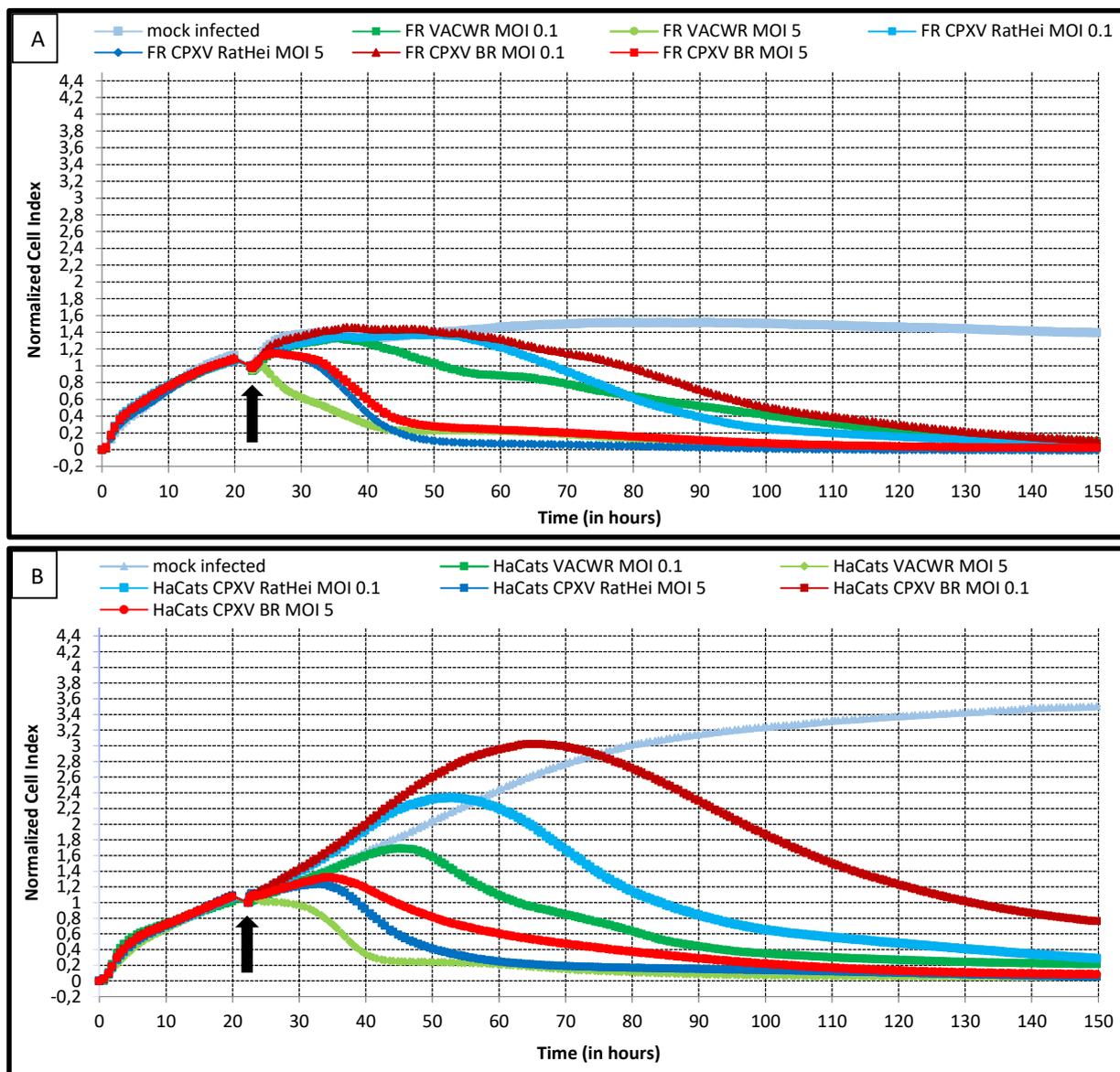


Abbildung 4.1.1 RTCA via xCelligence für infizierte FR Zellen und HaCats FR Zellen (A) und HaCats (B) wurden mit ausgewählten OPV infiziert (VACWR, CPXV RatHei, CPXV BR) um deren Replikationsfähigkeit zu untersuchen. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen MOIs von 0,1 und 5 jeweils in Triplikaten infiziert und gegen Kontrollzellen verglichen. Der Zeitpunkt der Infektion ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert.

In den humanen Fibroblasten BJ (Abb. 4.1.2 C) waren die Infektionsverläufe nahezu identisch, nur bei der niedrigen MOI von 0,1 unterlagen die CPXV RatHei infizierten Zellen einer schnelleren Veränderung. Obwohl der anfängliche Infektionsverlauf der Katzenfibroblasten Fc3Tg (Abb. 4.1.2 D) dem der humanen Fibroblasten ähnelte, zeigten sich zum späteren Zeitpunkt nach der Infektion gravierende Unterschiede zwischen den VACWR infizierten Zellen und den mit CPXV Stämmen infizierten Zellen. Die CPXV infizierten Zellen veränderten sich weiter bis das CI-Minimum erreicht wurde. Dagegen zeigten die VACWR infizierten Katzenzellen eine Stagnation bzw. eine stark

verlangsamte Modifikation, die bei etwa 110h *p.i.* bei beiden *MOIs* wieder allmählich einzusetzen schien.

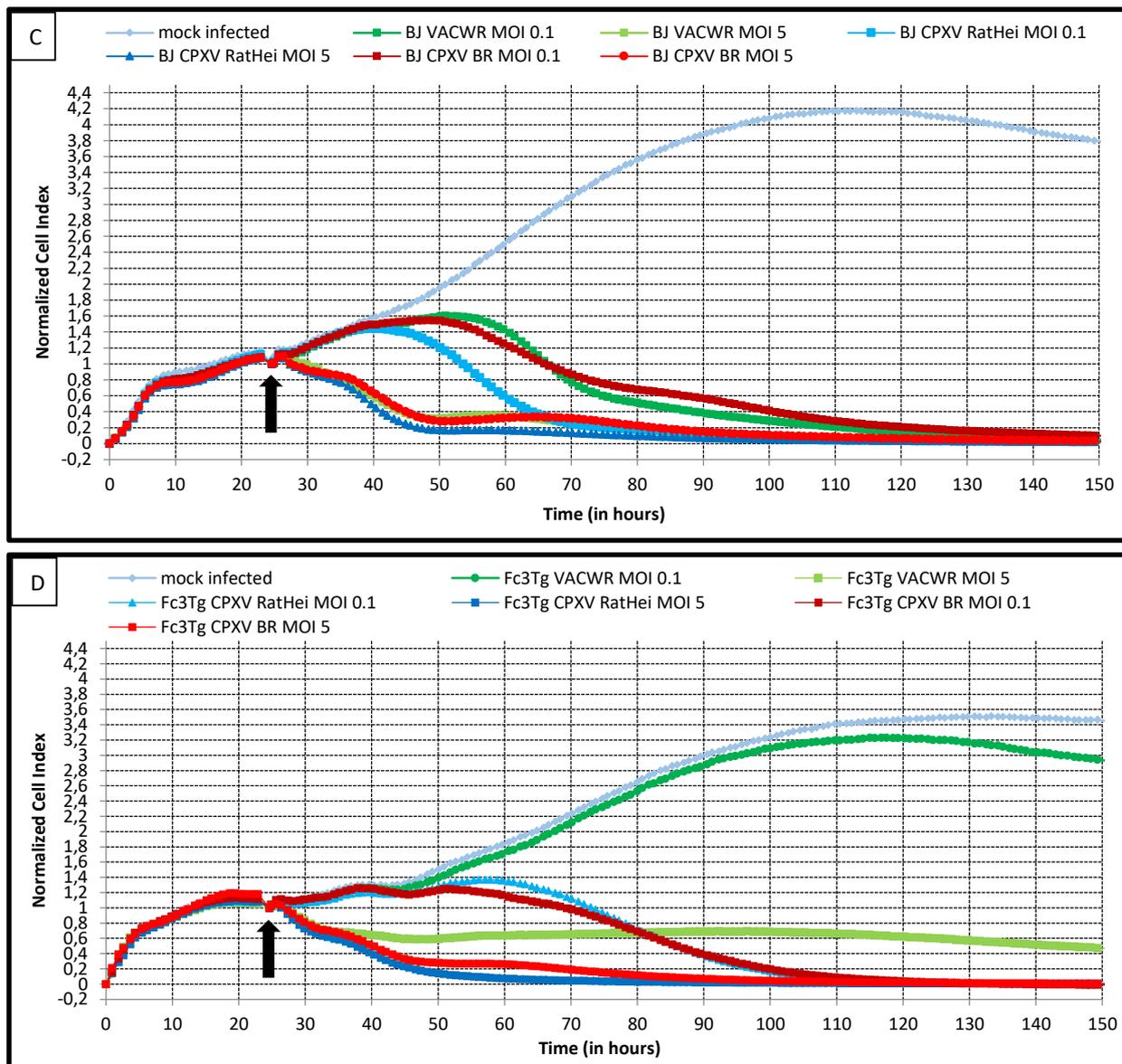


Abbildung 4.1.2 RTCA via xCelligence für infizierte BJ – und Fc3Tg Zellen | BJ – (C) und Fc3Tg Zellen (D) wurden mit ausgewählten OPV infiziert (VACWR, CPXV RatHei, CPXV BR) um deren Replikationsfähigkeit zu untersuchen. Die Zellen wurden mit zwei verschiedenen *MOIs* von 0,1 und 5 jeweils in Triplikaten infiziert und gegen Kontrollzellen verglichen. Der Zeitpunkt der Infektion ist jeweils mit einem schwarzen Pfeil markiert.

Mit Ausnahme der VACWR infizierten Katzenzellen zeigen alle anderen Infektionsverläufe das Phänomen des Cytopathischen Effekts (CPE), welcher charakteristisch für orthopockenvirale Infektionen ist. Basierend auf den Ergebnissen der Echtzeit-Zellanalyse mit einer *MOI* von 5 wurden Probenahmezeitpunkte für weitere Untersuchungen definiert. Es wurden vier Zeitpunkte bestimmt: 1,5h, 4h, 8h und 25h *p.i.* 1,5h und 4h symbolisieren den frühen sowie mittleren Infektionsverlauf.

8h *p.i.* steht für den späten Zeitpunkt als auch interessant für die Untersuchungen der VACWR infizierten Katzenzellen, da diese bei ca. 8h *p.i.* die morphologischen Veränderungen einstellten.

25h *p.i.* symbolisieren das CI-Minimum der infizierten Zellen bei einer *MOI* von 5.

4.3. Bestimmung der intrazellulären Virustiter

Der intrazelluläre Virustiter (*Plaque forming unit, PFU*) wurde mittels Plaque-Titrationstest (PQT) bestimmt. Jedes Virus je Zelle je Zeitpunkt wurde in biologischen Triplikaten bestimmt und jede Verdünnungsreihe in technischer Vierfachbestimmung. Die Anzahl der infektiösen Partikel wurde logarithmisch als *PFU/ml* gegen die *Zeit post infection* aufgetragen. Die Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und die Proben zur Bestimmung der Anzahl der infektiösen Partikel wurden zu 1,5h, 4h, 8h und 25h *p.i.* gezogen, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den vorherigen und nachfolgenden Analysenergebnissen zu gewährleisten.

In Abb. 4.2.1 und 4.2.2 sind die Ergebnisse der Virustiter dargestellt. In HaCats (A) und FR (C) Zellen repliziert VACWR nahezu identisch. Bereits nach 4h *p.i.* wurde ein Wachstum um eine Logstufe in HaCats registriert: von ca. $4,8 \times 10^4$ stieg der Titer auf ca. $5,8 \times 10^5$ *PFU/ml* an. In FR Zellen veränderte sich der Titer 4h *p.i.* nur minimal. Nach 8h *p.i.* stieg der Virustiter um 3 Logstufen vergleichsweise zu 4h *p.i.* in beiden Zellen an. Nach 25h *p.i.* stiegen die Titer nochmal um ca. 1,5 Logstufen an. Dagegen zeigten die CPXV Stämme ein verzögertes Wachstum vergleichsweise zu VACWR an. Erst nach 8h *p.i.* wurden höhere Virustiter um ca. 2 Logstufen beobachtet. Im weiteren Verlauf glichen sich die Virustiter beider CPXV Stämme in HaCats mit VACWR an. In FR Zellen dagegen wuchsen die CPXV BR abweichend vom CPXV RatHei und zeigten nach 25h *p.i.* einen um 2 Logstufen geringeren Virustiter vergleichsweise zu CPXV RatHei und VACWR an. Das Wachstum der OPV in den BJ (B) und Fc3Tg (D) Zellen zeigte in den ersten 8h *p.i.* keine Veränderungen im Titer. Nach 25h *p.i.* wurde ein Anstieg in den BJ Zellen um mind. 3 Logstufen bei CPXV BR und max. 5 Logstufen bei CPXV RatHei registriert. VACWR lag mit einem Virustiter von ca. 6×10^8 *PFU/ml* zwischen den beiden CPXV Stämmen. In den Fc3Tg Zellen dagegen stieg der Titer bei den CPXV BR um 2 Logstufen an. Der Virustiter für CPXV RatHei lag um eine Logstufe unter der vom CPXV BR. VACWR zeigte auch nach 25h *p.i.* keine Veränderung in der Anzahl der infektiösen Partikel.

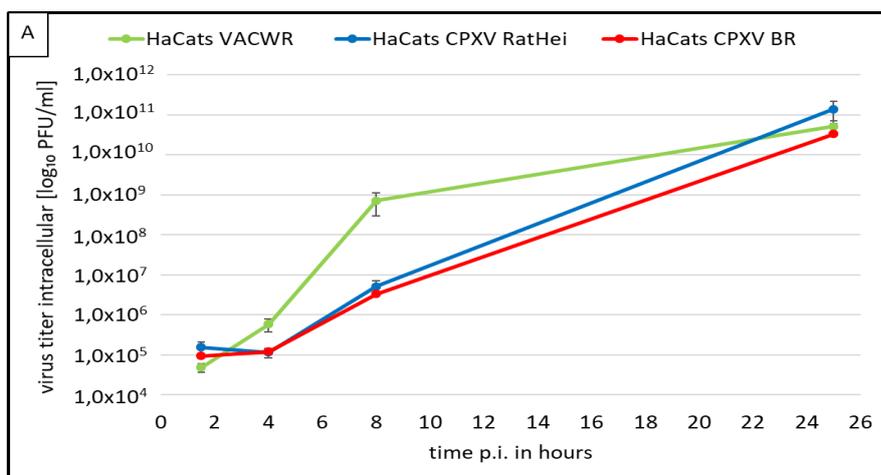


Abbildung 4.2.1 Virustiter intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in HaCats

Die Wachstumskinetik der Viren in den Zellen wurde über 25h *p.i.* mittels PQT bestimmt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und die Ergebnisse logarithmisch gegen die *Zeit p.i.* aufgetragen. In den HaCats (A) weist das VACWR zu 4h und 8h *p.i.* vergleichsweise zu den beiden CPXV-Stämmen einen höheren Titer auf. Die Virustiter der CPXV-Stämme sind über den Infektionsverlauf ähnlich und gleichen sich zu 25h *p.i.* mit dem von VACWR an.

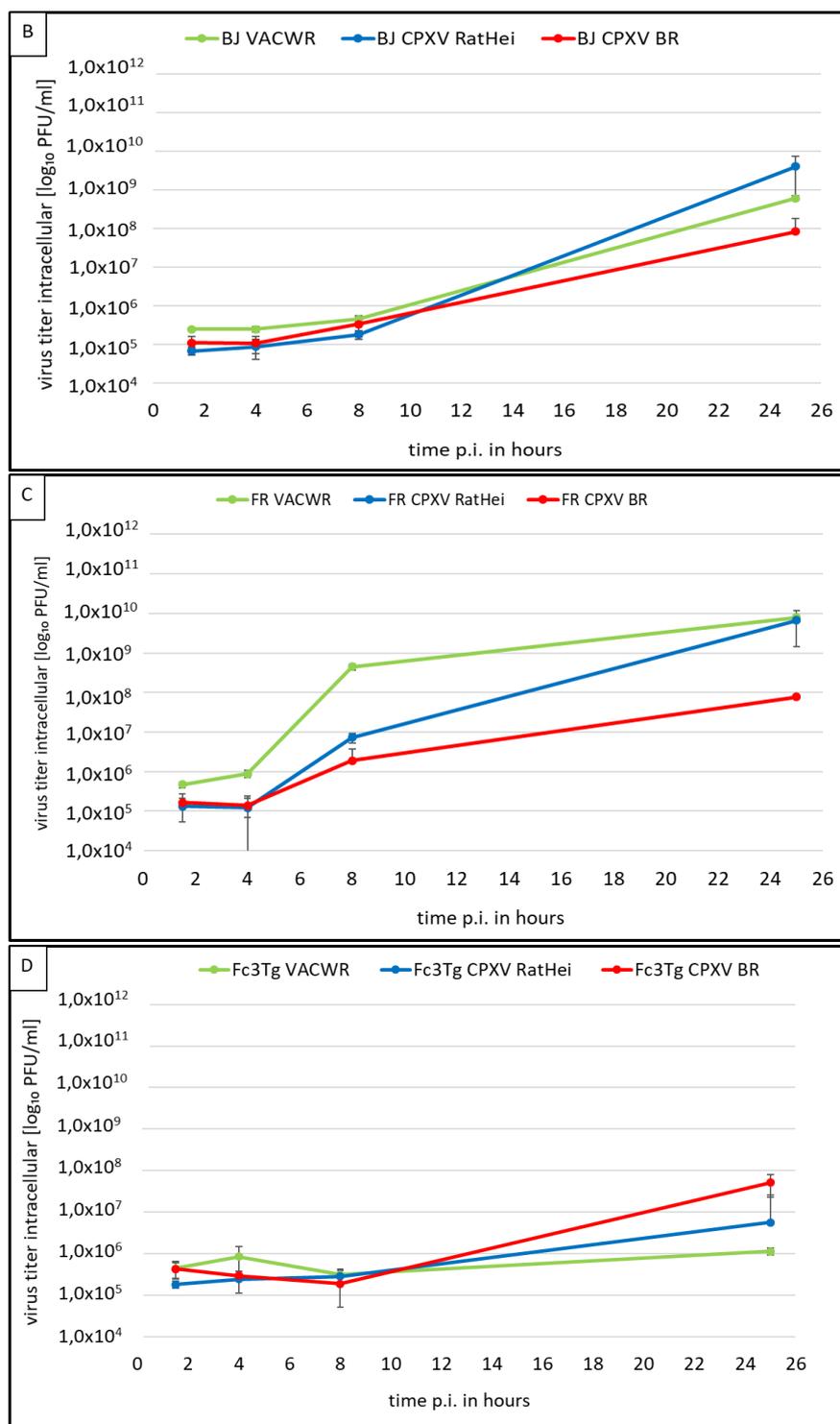


Abbildung 4.2.2 Virustiter intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in FR-, BJ- und Fc3Tg Zellen Die Wachstumskinetik der Viren in den Zellen wurde über 25h *p.i.* mittels PQT bestimmt. Die Zellen wurden mit einer MOI von 5 infiziert und die Ergebnisse logarithmisch gegen die Zeit *p.i.* aufgetragen. Das Wachstum der infektiösen Partikel in den FR Zellen (C) verläuft ähnlich wie bei den HaCats: VACWR repliziert in beiden Zellen nahezu identisch und weist zu 4h und 8h *p.i.* vergleichsweise zu den beiden CPXV Stämmen einen höheren Titer auf. Die Virustiter der CPXV Stämme divergieren in den FR Zellen: das CPXV RatHei hat zu 25h *p.i.* um 2 Logstufen höheren Titer als CPXV BR. In den BJ (B) und Fc3Tg (D) Zellen wird in den ersten 8h *p.i.* keine Veränderung im Virustiter detektiert. Jedoch nach 25h *p.i.* steigt die Anzahl der infektiösen Partikel in den BJ Zellen um 3-5 Logstufen an. In den Fc3Tg Zellen wird nach 25h *p.i.* ein Anstieg um 2 Logstufen bei CPXV BR beobachtet. Bei CPXV RatHei wird ein Anstieg um eine Logstufe beobachtet, welcher innerhalb der Standardabweichung von CPXV BR liegt. Das VACWR zeigt innerhalb des Untersuchungszeitraums keine Veränderungen im Virustiter.

Verglichen zwischen den Zelllinien war die Replikation der OPV in den Keratinozyten begünstigt.

Die gemessenen Virustiter in den HaCats weisen eine höhere Anzahl an infektiösen Partikeln auf als in den Fibroblasten. Auch ein unterschiedliches Wachstum ist in den Fibroblasten aus verschiedenen Wirten zu sehen. Um die Unterschiede in der Replikation der OPV in den verschiedenen Zellen zu verstehen, wurden Untersuchungen auf molekularbiologischer Ebene durchgeführt.

Da aber die Ergebnisse sowohl von der Echtzeitanalyse als auch des Plaque-Titrationstests bei den VACWR infizierten Katzenzellen von den anderen OPV infizierten Zellen stark abwichen, wurde zunächst analysiert ob die VACV Replikation in den Katzenzellen verglichen zu den anderen Zelllinien nur zeitlich verzögert oder abortiv abläuft.

4.4. VACWR infizierte Katzenzellen

4.4.1. Immunfluoreszenztest zur Analyse viraler Penetration im Vergleich von VACWR infizierten Fc3Tg zu VACWR infizierten HaCats

Eine indirekte Immunfluoreszenzanalyse (IFA) wurde zur Bestimmung der Permissivität der Katzenzellen für VACWR durchgeführt. Humane Keratinozyten wurden als Vergleichszellen mitgeführt, da die Replikationsfähigkeit von Vaccinia Viren in Hautzellen bereits bekannt ist sowie durch den Anstieg des Virustiters in den HaCats um ca. 6 Logstufen über den Infektionsverlauf (Abb. 4.2.1 A) bestätigt wird. Für beide Zellen wurden neben je zwei Probenzügen auch Kontrollzellen mitgeführt, um potentiell unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers detektieren zu können. Die Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert und Proben wurden zu 3h *p.i.* sowie 24h *p.i.* gezogen. Eingesetzt wurde als Primärantikörper ein polyklonaler Antikörper gegen das Protein A27L. Das Protein A27L wird während der viralen Replikation spät exprimiert. Es ist ein multifunktionales Protein, welches unter anderem für die Penetration in die Zellen als auch für die Virusverbreitung als EEV und CEV verantwortlich ist (33).

Mit der Auswahl der Probezeitpunkte wurde einerseits die Penetration der Viren in die Zellen untersucht (3h *p.i.*) und andererseits die Virusvermehrung über 24h *p.i.* bestätigt. Nach 3h *p.i.* ist in beiden Zelllinien nur punktuell Leuchten zu vernehmen (Abb. 4.3 B und E). In den Katzenzellen ist die Leuchtintensität stärker wahrzunehmen (Abb. 4.3 B).

Zwischen den beiden Zelllinien sind gravierende Unterschiede nach 24h *p.i.* sichtbar: Während die Fc3Tg Zellen (Abb. 4.3 C) noch fast vollständig intakt sind und nur eine geringe morphologische Veränderung aufweisen (Pfeil), sind die HaCats fast vollständig durchinfiziert und sind durch den cytopathischen Effekt charakterisiert (Abb. 4.3 F).

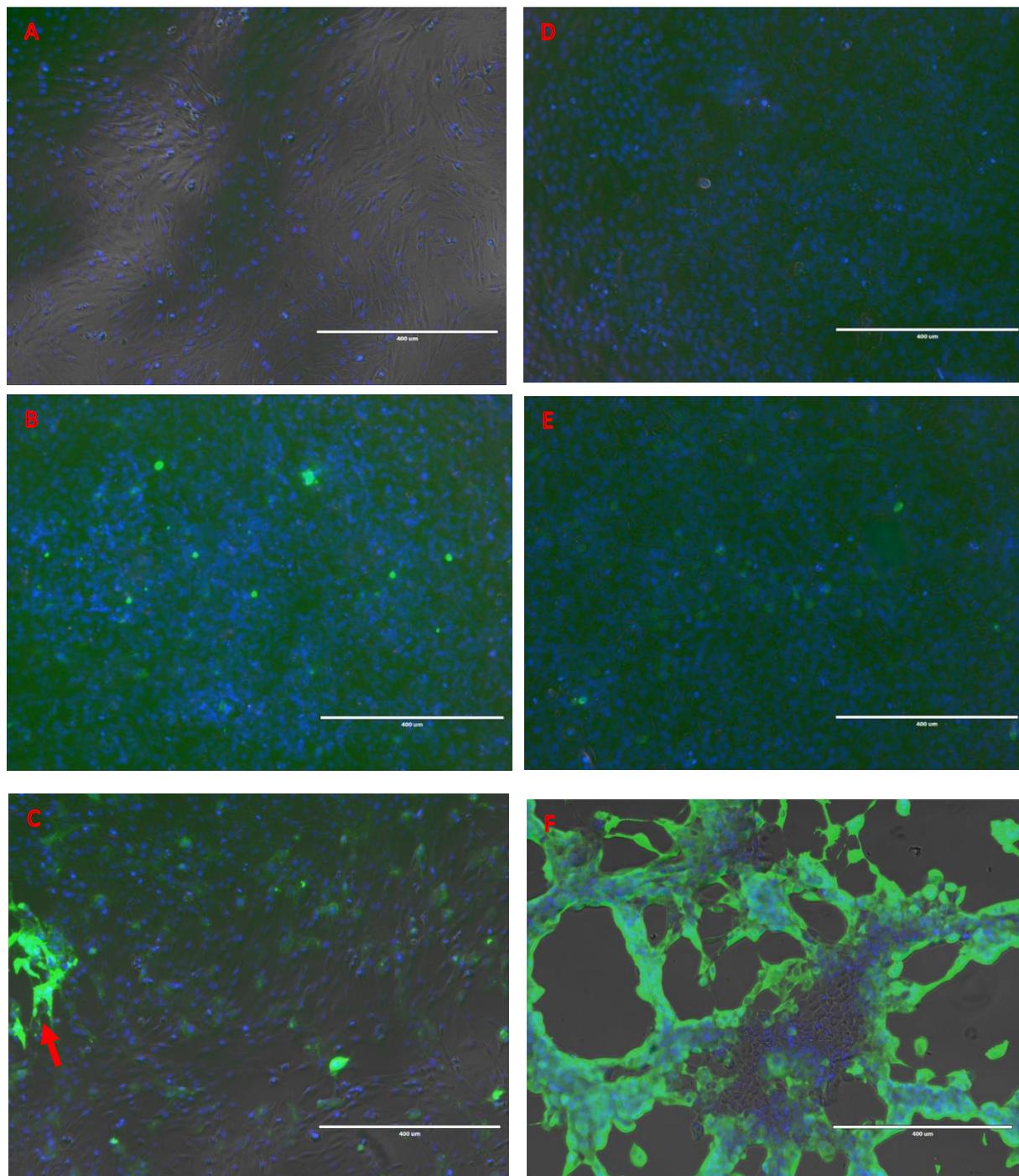


Abbildung 4.3 Immunfluoreszenztest zur Analyse der Permissivität von Katzenzellen für VACWR im Vergleich zu VACWR infizierten HaCats Fc3Tg Zellen (A,B,C) sowie HaCats (D,E,F) wurden mit VACWR mit einer *MOI* von 5 infiziert. Proben wurden zu 3h *p.i.* und 24h *p.i.* gezogen und miteinander sowie gegen Kontrollzellen (A und D) verglichen. Nach 3h *p.i.* sind kaum Unterschiede zwischen Fc3Tg Zellen (B) und HaCats (E) zu sehen.

Nach 24h *p.i.* sind jedoch gravierende Unterschiede sichtbar. Während bei HaCats (F) die Infektion so weit fortgeschritten ist, dass kaum noch intakte Zellen vorliegen, weisen die VACWR infizierten Fc3Tg Zellen (C) nur eine minimale morphologische Veränderung (Pfeil) auf. (Balken: 400 µm)

4.4.2. Analyse des Virustiters von OPV infizierten Fc3Tg Zellen mittels qPCR

Bei der Bestimmung des Virustiters mittels Plaque-Titrationstest (PQT) werden nur infektiöse Partikel erfasst. Da im Falle von VACWR infizierten Fc3Tg Zellen keine signifikante Änderung des Titers über den Infektionsverlauf mittels Plaque-Titrationstest (Abb.4.2 D) festgestellt werden konnte, jedoch mittels IFA (Abb. 4.3 C) nach 24h *p.i.* mehr Zellen ein intensiveres Leuchten aufweisen, wurde nachfolgend eine Titerbestimmung auf Genomebene durchgeführt.

Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten zwischen den Ergebnissen vom PQT und qPCR, wurden die Proben für die Bestimmung der Genomäquivalenten (GE) aus den gleichen Grundgesamtheiten von infizierten Zellen wie für den PQT bezogen. Zur Bestimmung der Genomequivalenten wurden die Ergebnisse mit einer Standardreihe verglichen. Basierend auf den qPCR Ergebnissen ist nicht nur eine virale DNA-Replikation bei den CPXV Stämmen vermerkbar, sondern auch bei VACWR (Abb. 4.4). Die Unterschiede zwischen den Kinetiken der DNA-Replikation werden erst bei 8h *p.i.* sichtbar. Hierbei weisen beide CPXV Stämme einen ähnlichen Titer auf und VACWR hat um ca. eine Logstufe geringeren Titer. Nach 25h *p.i.* wird ein Anstieg der GE um ca. jeweils eine Logstufe gemessen.

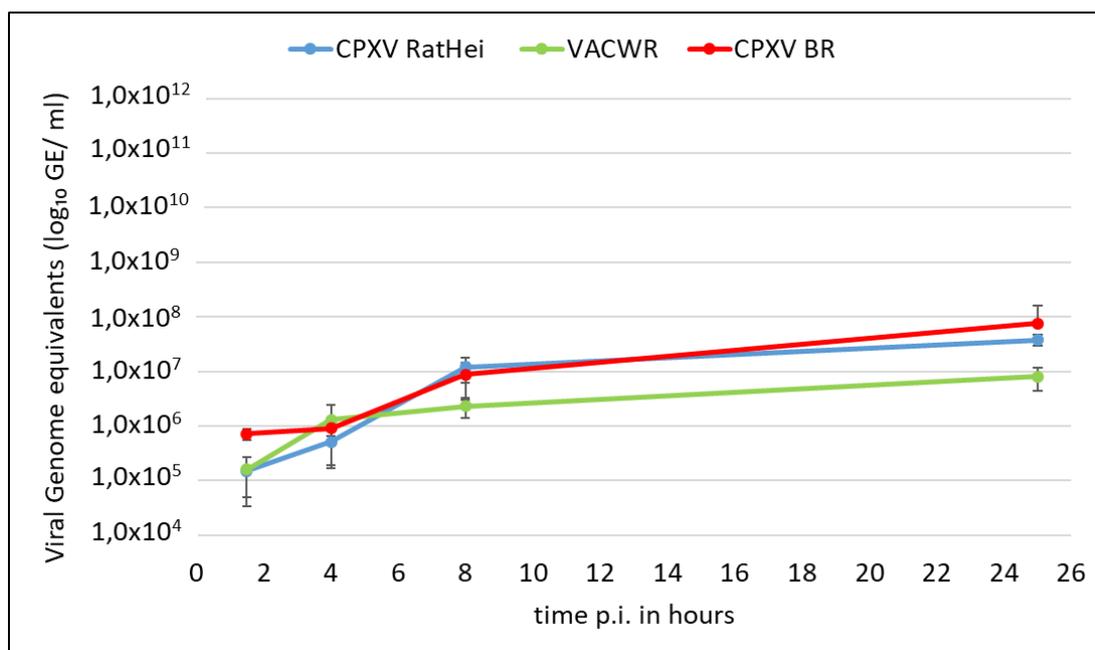


Abbildung 4.4 Virustiter via GE intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in Fc3Tg Zellen
Die Genomequivalente der Viren in den Fc3Tg Zellen wurde über 25h *p.i.* mittels quantitativer PCR bestimmt. Die Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert und die Ergebnisse logarithmisch gegen die Zeit *p.i.* aufgetragen. Die DNA-Replikation der OPV verhält sich über den Infektionsverlauf nahezu identisch. Die GE bei VACWR liegt um eine Logstufe unterhalb der GE beider CPXV Stämme.

4.4.3. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von VACWR infizierten Fc3Tg Zellen

Die Elektronenmikroskopischen (EM) Aufnahmen wurden zu zwei Zeitpunkten *p.i.* angefertigt. Die Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert. 24h *p.i.* wurden gewählt, da zu diesem Zeitpunkt der Virustiter gemäß PQT keinen Anstieg an infektiösen Partikeln aufwies und 48h *p.i.* als späterer Zeitpunkt mit potentieller Annahme, dass die Viren reifen könnten, da ein Anstieg in der Genomäquivalenten nach 25h *p.i.* gemessen wurde. Die Abb. 4.5 A bis H zeigen Aufnahmen zu 24h *p.i.* Auf den ersten Blick scheinen sehr viele unreife Virionen in den Zellen vorzuliegen, die einer normalen Virusformation unterliegen könnten (Vergleich mit Bildaufnahmen in 36). Jedoch sehen viele unreife Virionen abnormal aus. In den Aufnahmen sind DNA-Kristalloide (A - D) zu sehen, Akkumulation von abnormalen *IVs* aufgrund fehlender Kernformation (B, C), abnormale *MVs* (C) (36,37). Unter G scheinen noch intakte *MVs* (extrazellulär) vorhanden zu sein, die über die Zellmembran in die Zelle einzudringen versuchen, vermutlich über Endozytose oder es sind Virionen, die aus der Zelle ausgeschleust wurden. Da aber die Zelle keine *Crescents* und *IVs* aufweist, spricht der Vorgang unter G mehr für die Virusaufnahme in die Zelle. Unter E und H sind Virionen sichtbar, die jedoch leere Kapside zu besitzen scheinen (34, 35). Unter F ist ein freies Kapsid sichtbar.

Abb. I bis N zeigen EM-Aufnahmen zu 48h *p.i.* Nach 48h *p.i.* sind immer noch sehr viele unreife Virionen (*IVs*) (K) vorhanden. Partiiell scheinen die Zellen einer Apoptose oder Nekrose (I) zu unterliegen, wodurch die unreifen und DNA-leeren Virionen freigesetzt werden. Unter J befinden sich DNA-leere Virionen in der Zelle. In L scheinen reife Virionen vorhanden zu sein (38), die intrazellulär der Zellmembran anliegen. Dies könnten Viren sein, die in die Zelle eingedrungen sind oder Virionen, die nach der Reifung an die Oberfläche transportiert wurden. Da aber auch hier keine weiteren *Crescents* oder *IVs* sichtbar sind, vergleichbar zu G, spricht dieser Vorgang ebenfalls für eine Virusaufnahme in die Zelle.

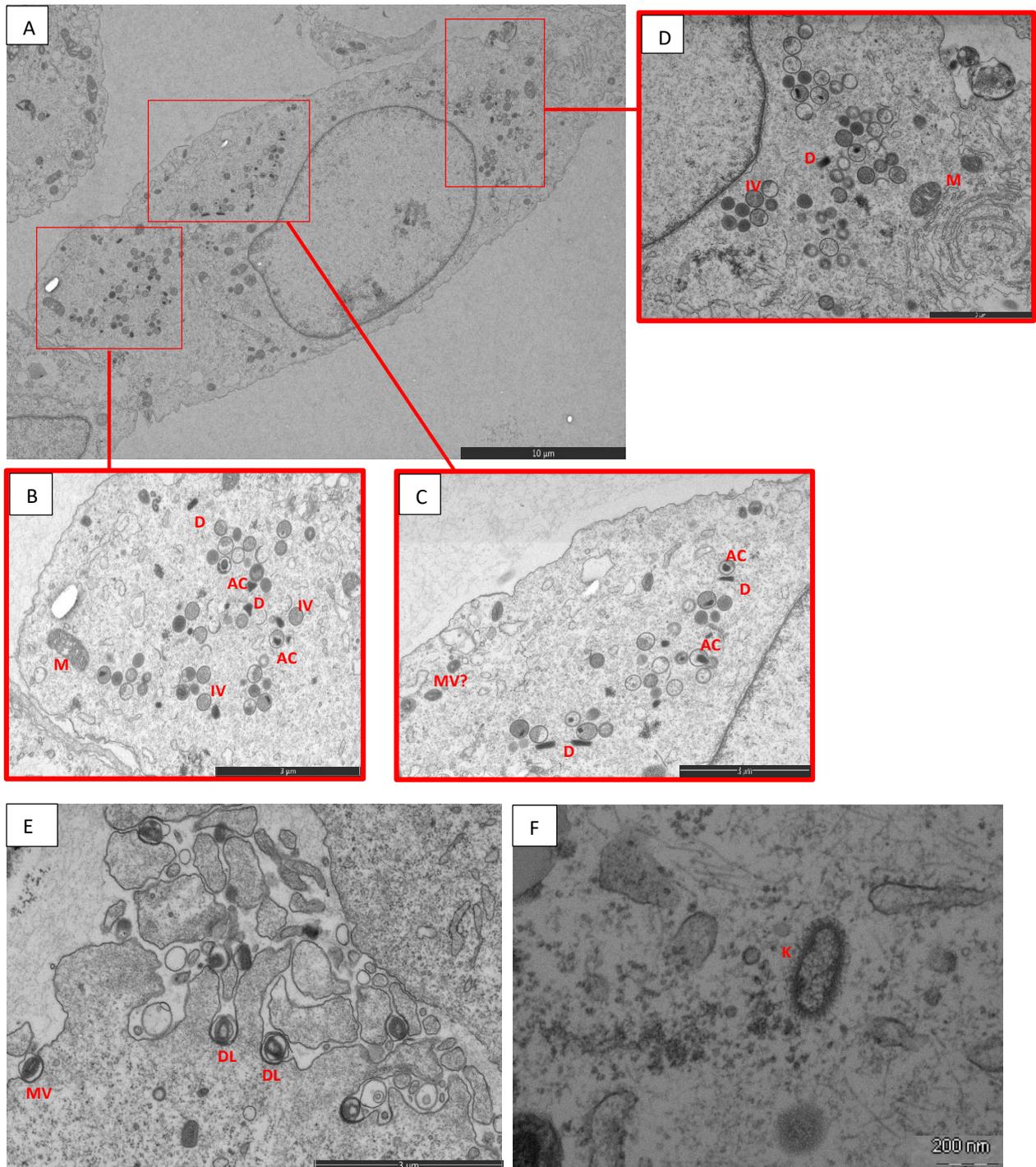


Abbildung 4.5.1 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 24 *p.i.*, A - F / Fc3Tg Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert. Proben für die EM-Aufnahmen wurden zu 24h *p.i.* und 48h *p.i.* gezogen. Abb. A bis F zeigen die Aufnahmen zu 24h *p.i.*

24h *p.i.* sind sehr viele unreife Virionen sichtbar: *Crescents*, *Immature Virion (IV)*. Jedoch auch viele abnormale unreife Virionen aufgrund von fehlender Kapsidformation oder Virionen mit DNA-leere Kapside scheinen vorhanden zu sein.

M – Mitochondrien, **D** – DNA-Kristalloide, **AC** – abnormale Partikel aufgrund fehlender Kapsidformation (Bestätigung mit I7ΔMutanten (33,35)), **DL** – DNA-leere Kapside, **K** – freies Kapsid, **IV** – *Immature Virion*, **MV** – *Mature Virion* (**MV?** – unklar ob *MV* oder *DL*)

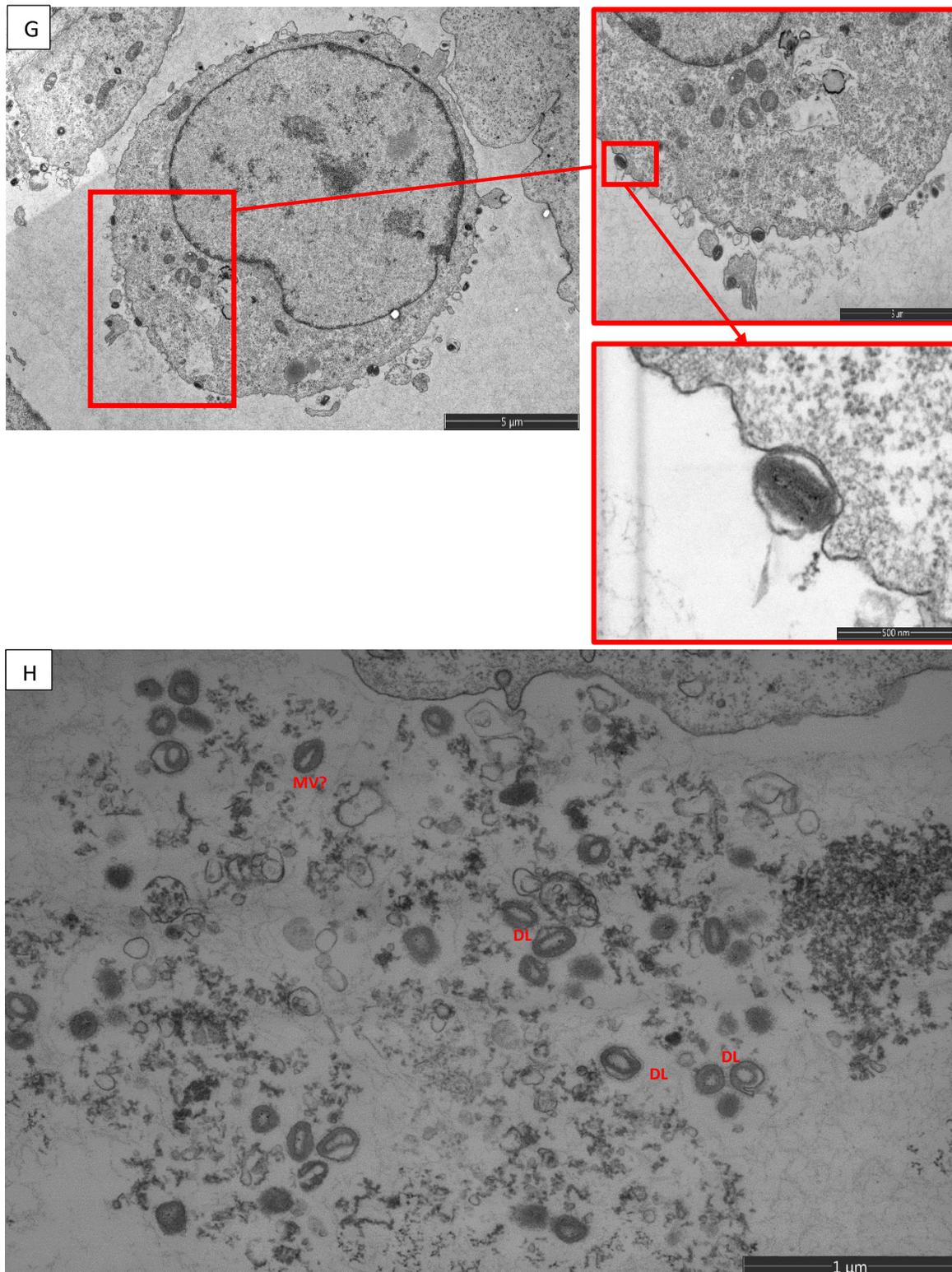


Abbildung 4.5.2 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 24h p.i., G, H | Fc3Tg Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert. Proben für die EM-Aufnahmen wurden zu 24h p.i. und 48h p.i. gezogen. Abb. G und H zeigen die Aufnahmen zu 24h p.i.

In Abb. G sind reife Viren extrazellulär an der Zelloberfläche vorhanden, die ein Eindringen in die Zelle via Endozytose suggerieren. In Abb. H sind viele Virionen mit scheinbar DNA-leeren Kapsiden vorhanden.

DL – DNA-leere Kapside, **MV** – *Mature Virion* (**MV?** – unklar ob *MV* oder *DL*)

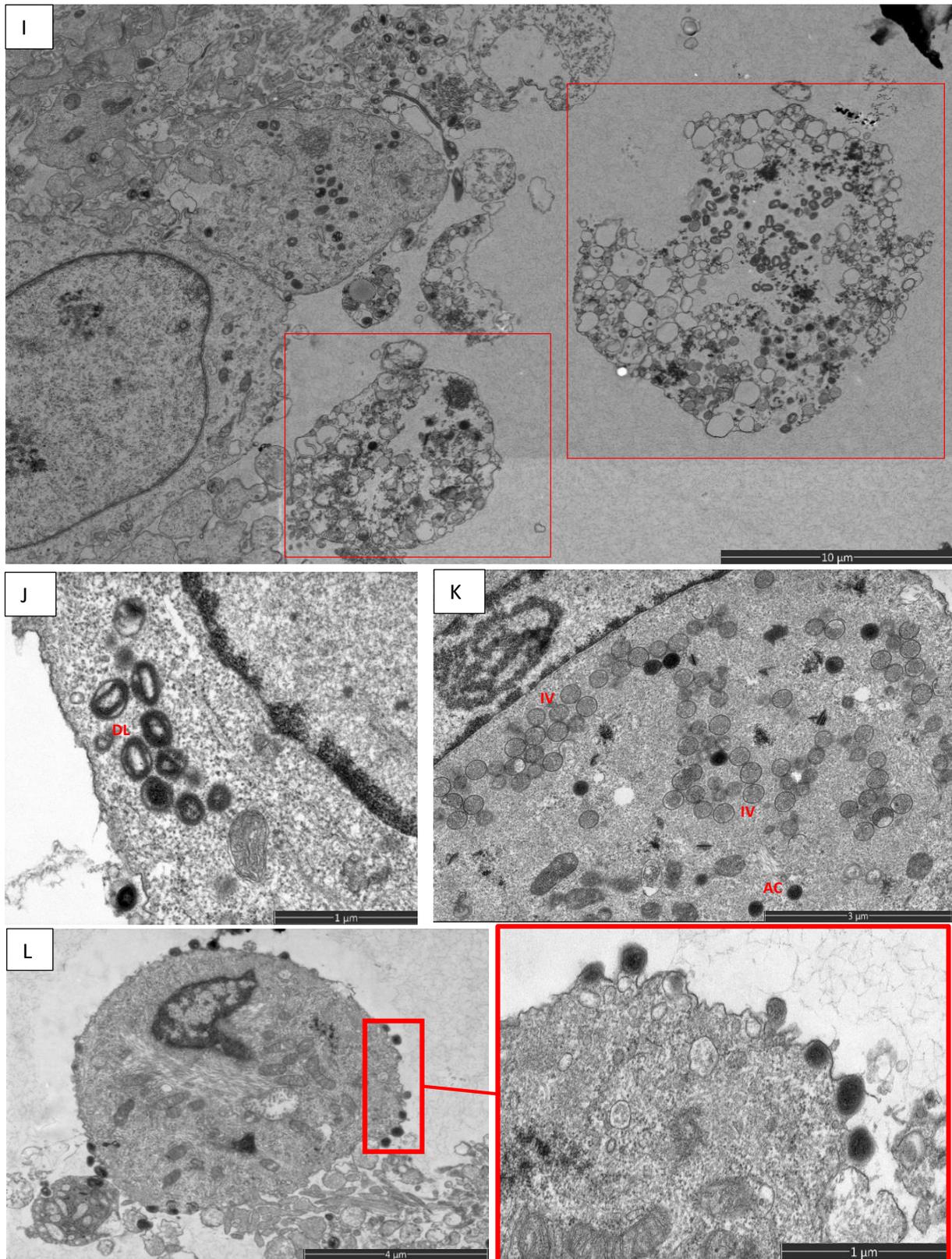


Abbildung 4.5.3 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 48h p.i., I - L | Fc3Tg Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert. Proben für die EM-Aufnahmen wurden zu 24h p.i. und 48h p.i. gezogen. Abb. I bis L zeigen die Aufnahmen zu 48h p.i.

Teilweise scheinen die Zellen dem Zelltod zu unterliegen (I) und teilweise sind noch intakte Zellen mit unreifen Viren (K) vorhanden oder Viren mit DNA-leeren Kapsiden (J). In Abb. L sind reife Viren intrazellulär an der Zelloberfläche vorhanden, die entweder in die Zelle eingedrungen sind oder aus der Zelle ausgeschleust werden sollen.

DL – DNA-leere Kapside, **IV** – *Immature Virion*, **AC** – abnormale Partikel

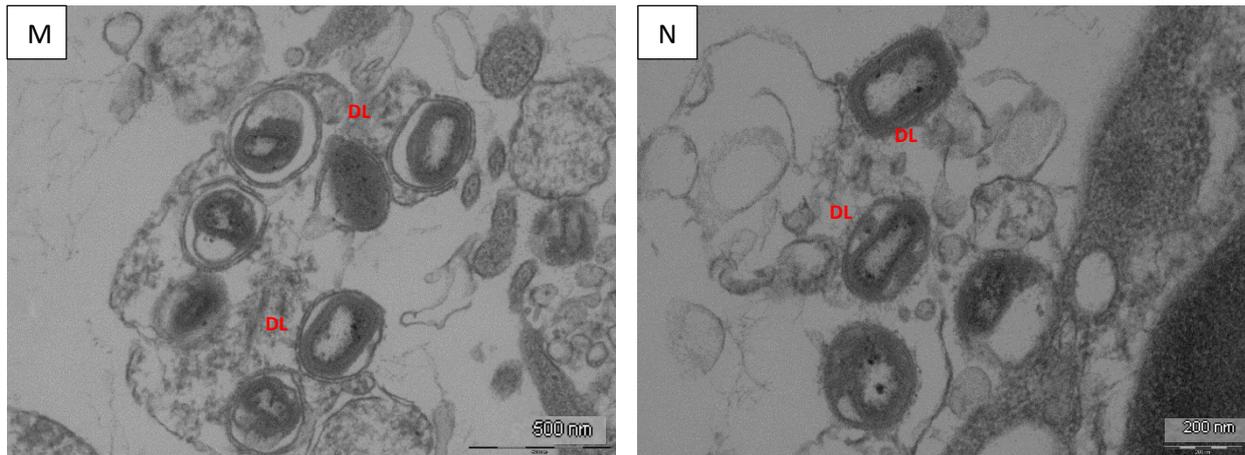


Abbildung 4.5.4 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 48h *p.i.*, M, N | Fc3Tg Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 infiziert. Proben für die EM-Aufnahmen wurden zu 24h *p.i.* und 48h *p.i.* gezogen. Abb. M und N zeigen die Aufnahmen zu 48h *p.i.*

In beiden Bildern sind Viren zu sehen, die scheinbar DNA-leere Kapside besitzen und auch nicht die charakteristische bikonkave Kapsidform aufweisen.

DL – DNA-leere Kapside

Zusammenfassung:

Weder zu 24h *p.i.* noch 48h *p.i.* sind neue reife Virionen sichtbar. Die Replikation scheint im Replikationsstatus der *IVs* stehengeblieben zu sein. Es sind aber auch viele atypische Virionen zu sehen. Laut Literatur werden stets zum geringen Anteil atypische Virionen während der Replikation von VACV formiert (116). Jedoch scheint in diesem Fall die Replikation abzubrechen.

4.4.4. Replikationsfähigkeit von VACWR in diversen feline Zelllinien

Die Replikationsfähigkeit der VACWR in feline Zellen aus unterschiedlichen Geweben und Organen wurde mittels der Echtzeit - Zellanlyse (*Real Time Cell Analysis*) ermittelt. Dabei wurde untersucht, ob das Replikationsvermögen der VACWR Gewebe- bzw. Organ-abhängig erfolgt. Dazu wurden Epithelzellen aus der Lunge (AK-D) und Astrozyten der Glia (PG-4) mit einer *MOI* von 5 in Triplikaten infiziert und gegen Kontrollzellen, sog. *Mock* infizierten Zellen, verglichen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Verläufe der Zelllinien während der Infektion wurden die Zellindices (CI) zum Zeitpunkt der Infektion normalisiert (schwarzer Pfeil).

Die infizierten Epithelzellen der Lunge sind parallel zu den Kontrollzellen weitergewachsen (Abb. 4.6). Jedoch wiesen die infizierten Lungenzellen einen geringeren CI über den Infektionsverlauf auf als die Kontrollzellen. Sowohl die infizierten Lungenzellen als auch die Kontrollzellen zeigten zum Ende der Untersuchung morphologische Veränderungen, wodurch der CI abzufallen anfang. Diese morphologischen Veränderungen sind unabhängig von der Infektion eingetreten. Dagegen zeigten die infizierten Astrozyten (Abb. 4.6) zunächst ein ähnliches Verhalten wie die infizierten feline Fibroblasten Fc3Tg (Abb. 4.1.2 D): der CI sank direkt nach der Infektion ab und stagnierte kurzzeitig. Anschließend stieg aber der CI der infizierten PG-4 Zellen im Gegensatz zu den infizierten Fc3Tg Zellen (Abb. 4.1.2 D) wieder an (Abb. 4.6).

Einen ungewöhnlichen Verlauf zeigten die PG-4 Zellen. Während die infizierten Astrozyten bis 200h auf einen CI von 1 wieder angestiegen sind, sind die Kontrollzellen nach 200h auf einen CI unter 1 gefallen (roter Kreis).

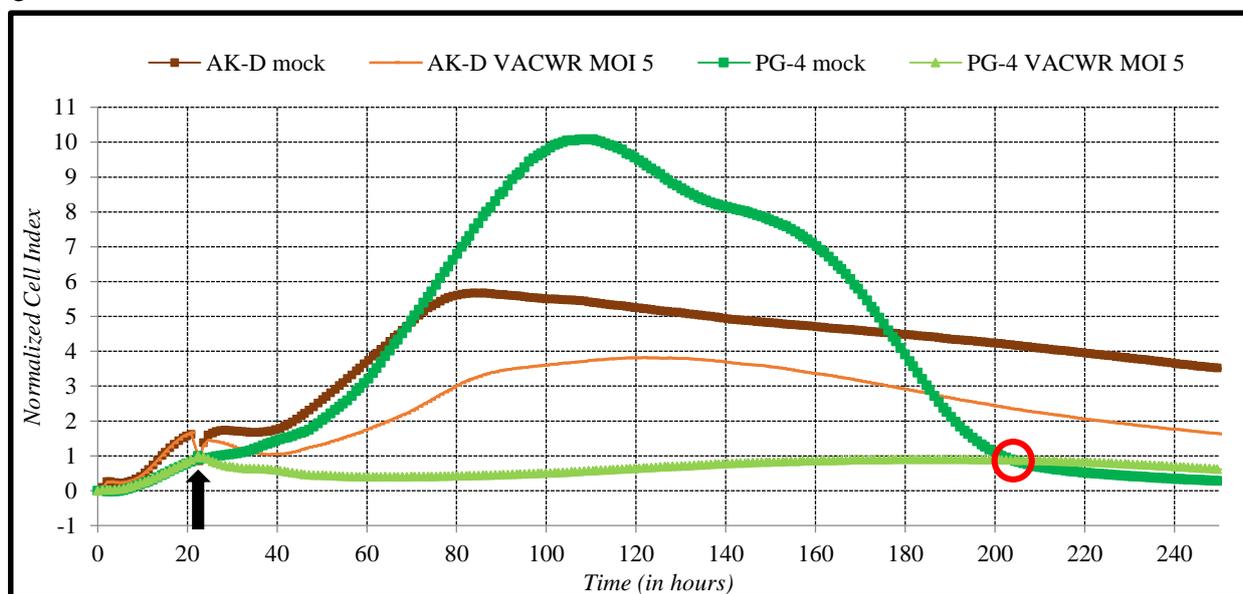


Abbildung 4.6 RTCA von VACWR infizierten feline Zellen | Feline Zelllinien aus verschiedenen Geweben (Epithelzellen und Astrozyten) und Organen (Lunge und Gehirn) (AK-D und PG-4), wurden mit VACWR infiziert, um deren Replikationsfähigkeit in den genannten Zellen zu untersuchen. Die Zellen wurden mit einer *MOI* von 5 jeweils in Triplikaten infiziert und gegen Kontrollzellen verglichen. Der Zeitpunkt der Infektion ist mit einem schwarzen Pfeil markiert. Während die infizierten Lungenzellen ein ähnliches Verhalten aufwiesen wie die Kontrollzellen, zeigten die PG-4 Zellen ein ungewöhnliches Verhalten. Der CI der *mock* infizierten PG-4 Zellen fiel unterhalb des CIs der VACWR infizierten PG-4 Zellen (roter Kreis).

Zusammenfassung:

Die Unfähigkeit der VACWR in feline Zellen zu replizieren, scheint nicht Gewebe- und Organspezifisch zu sein, sondern beruht vermutlich auf einer erschwerten Penetration in die feline Zellen. Diese Vermutung entsteht, da AK-D Zellen nur einen minimalen Abfall des CIs nach der Infektion aufwiesen. Der CI der AK-D Zellen stieg jedoch wieder schnell an. Die infizierten AK-D und PG-4 Zellen zeigen nur eine minimale bis keine Reaktion auf die Viren.

4.5 Regulation der intrazellulären Wirtszellproteine

Um zu verstehen welcher intrazellulären Mechanismen sich die Viren bedienen um die Anzahl der infektiösen Partikel zu erhöhen, wurden Analysen auf Proteombasis mittels Tandem-Massenspektrometrie durchgeführt. Die Proben wurden mittels *LFQ* relativ quantifiziert. Für jeden Zeitpunkt je Virus und Zelle wurden biologische Triplikate beprobt und gemessen. Die Ergebnisse der Infektionszeitpunkte wurden den Kontrollzellen (*Mock* infizierten Zellen) gegenübergestellt, welche auch in biologischen Triplikaten gezogen wurden.

Es werden signifikant unterschiedlich regulierten Proteine (*FDR 1%*) innerhalb einer Zelle über die Infektionszeit dargestellt.

4.5.1 Orthopockenviraler Einfluss auf die FR Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten FR Zellen 6670 Wirtszellproteine identifiziert von denen 2842 Proteine zur Quantifizierung weiterverwendet wurden. Aus dieser Anzahl wurden mittels *ANOVA* mit einer *FDR von 1%* 671 Proteine als signifikant reguliert über den Infektionszeitraum bewertet.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine werden in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 4.7) und in drei Cluster unterteilt.

Die Proteine der drei Cluster wurden separat mittels der *Cytoscape*, der App *ClueGo* auf die zugehörigen *GO Terms* und *KEGG pathways* analysiert ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse der *KEGG pathways* und *GO* Annotation sind in den Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 dargestellt.

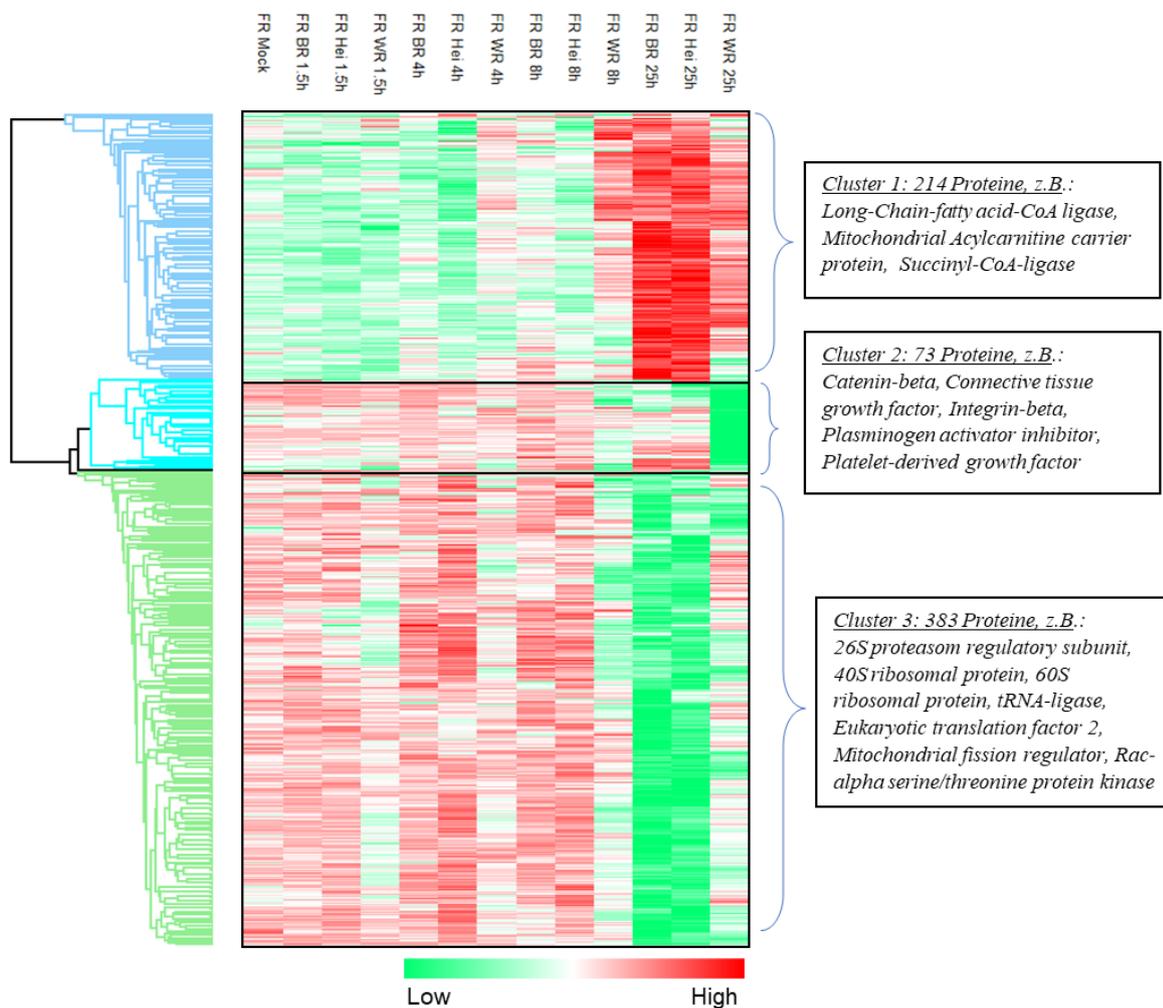


Abbildung 4.7 Intrazellulär regulierte Proteine in FR Zellen über 25h p.i. infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR In der *Heatmap* sind alle signifikant ($FDR 1\%$) unterschiedlich regulierten intrazellulären Proteine der FR Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Proteine sind in drei Cluster unterteilt gemäß gravierenden Unterschieden in den Expressionsintensitäten.

Cluster 1 zeigt die Proteine, welche über den Infektionsverlauf verglichen mit den Kontrollzellen überexprimiert werden. Im Cluster 2 sind Proteine zu finden, die bei VACWR nach 25h p.i. verglichen mit Kontrollzellen und CPXV infizierten Zellen unterexprimiert werden. Cluster 3 beinhaltet Proteine, die in den Kontrollzellen überexprimiert sind und mit dem Infektionsverlauf herunterreguliert werden. Es sind unterschiedliche Expressionsmuster zwischen VACWR infizierten Zellen und mit CPXV Stämmen infizierten Zellen vorzufinden.

Tabelle 4.1| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 1

KEGG ID/ GO ID	KEGG pathway/ GO Terms	Term pValue¹	No. Genes²	Key Terms
KEGG:00020	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	6.83E-24	16.00	<i>Metabolism</i>
KEGG:00071	<i>Fatty acid degradation</i>	9.23E-10	9.00	
KEGG:00190	<i>Oxidative phosphorylation</i>	2.18E-10	14.00	
GO:0006635	<i>fatty acid beta-oxidation</i>	6.66E-07	8.00	
KEGG:00620	<i>Pyruvate metabolism</i>	4.56E-09	8.00	
KEGG:00280	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	4.74E-09	9.00	
KEGG:00640	<i>Propanoate metabolism</i>	2.69E-08	7.00	
KEGG:00310	<i>Lysine degradation</i>	1.58E-07	8.00	
KEGG:00380	<i>Tryptophan metabolism</i>	5.13E-07	7.00	
KEGG:00330	<i>Arginine and proline metabolism</i>	1.80E-04	5.00	
KEGG:00650	<i>Butanoate metabolism</i>	1.73E-04	4.00	
KEGG:00510	<i>N-Glycan biosynthesis</i>	9.01E-07	7.00	
KEGG:04141	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	3.46E-16	20.00	<i>Quality control/ protein processing</i>
GO:0035966	<i>response to topologically incorrect protein</i>	4.20E-05	9.00	
GO:0003756	<i>protein disulfide isomerase activity</i>	7.84E-07	5.00	
GO:0070972	<i>protein localization to endoplasmic reticulum</i>	3.52E-05	6.00	
GO:0045047	<i>protein targeting to ER</i>	2.60E-04	4.00	
GO:0006620	<i>posttranslational protein targeting to endoplasmic reticulum membrane</i>	2.11E-04	3.00	
GO:0031204	<i>posttranslational protein targeting to membrane, translocation</i>	2.01E-05	3.00	
KEGG:04216	<i>Ferroptosis</i>	6.96E-09	8.00	<i>Cell death</i>

¹ p value ≤0,05; ² Anzahl der zu diesem GO Term oder KEGG pathway gehörenden Proteine

Im Cluster 1 sind Wirtszellproteine zusammengefasst, die über den Infektionsverlauf hochreguliert werden. Die regulierten Proteine im Cluster 1 beziehen sich hauptsächlich auf diverse Prozesse, die die virale Replikation begünstigen sollen, wie metabolische Prozesse, verstärkt zur Energiegewinnung, Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum, N-Glykansynthese und Export von neu synthetisierten Proteinen. Jedoch auch Proteine, die zum Ende des Infektionsverlaufs den Prozess des programmierten Zelltods initiieren, hier durch Ferroptose.

Tabelle 4.2| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 2

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:04512</i>	<i>ECM-receptor interaction</i>	<i>4.68E-12</i>	<i>9.00</i>	<i>Cell morphology</i>
<i>KEGG:04510</i>	<i>Focal adhesion</i>	<i>1.62E-11</i>	<i>11.00</i>	
<i>GO:0062023</i>	<i>collagen-containing extracellular matrix</i>	<i>2.69E-18</i>	<i>16.00</i>	
<i>GO:0030198</i>	<i>extracellular matrix organization</i>	<i>1.67E-17</i>	<i>17.00</i>	
<i>GO:0098644</i>	<i>complex of collagen trimers</i>	<i>1.89E-11</i>	<i>6.00</i>	
<i>GO:0050839</i>	<i>cell adhesion molecule binding</i>	<i>1.45E-10</i>	<i>11.00</i>	
<i>GO:0005178</i>	<i>integrin binding</i>	<i>6.45E-09</i>	<i>8.00</i>	
<i>GO:0010810</i>	<i>regulation of cell-substrate adhesion</i>	<i>1.62E-09</i>	<i>10.00</i>	
<i>GO:0030177</i>	<i>positive regulation of Wnt signaling pathway</i>	<i>5.19E-06</i>	<i>6.00</i>	
<i>GO:2000050</i>	<i>regulation of non-canonical Wnt signaling pathway</i>	<i>6.02E-05</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0090263</i>	<i>positive regulation of canonical Wnt signaling pathway</i>	<i>2.33E-05</i>	<i>5.00</i>	<i>Wound healing</i>
<i>GO:1901343</i>	<i>negative regulation of vasculature development</i>	<i>2.94E-06</i>	<i>6.00</i>	
<i>GO:0071774</i>	<i>response to fibroblast growth factor</i>	<i>2.16E-06</i>	<i>6.00</i>	
<i>GO:1900048</i>	<i>positive regulation of hemostasis</i>	<i>8.40E-05</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0050820</i>	<i>positive regulation of coagulation</i>	<i>1.24E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0036120</i>	<i>cellular response to platelet-derived growth factor stimulus</i>	<i>1.36E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0090303</i>	<i>positive regulation of wound healing</i>	<i>1.02E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0030858</i>	<i>positive regulation of epithelial cell differentiation</i>	<i>1.02E-03</i>	<i>3.00</i>	<i>Response to ROS</i>
<i>GO:0036296</i>	<i>response to increased oxygen levels</i>	<i>9.74E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0055093</i>	<i>response to hyperoxia</i>	<i>6.68E-04</i>	<i>3.00</i>	

¹ *p value* ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Die Proteine des 2. Clusters sind anfänglich der Infektion überexprimiert und werden mit fortschreitender Infektion herunterreguliert. Jedoch werden diese Proteine bei VACWR infizierten Zellen nach 25h *p.i.* stärker herunterreguliert als bei den mit CPXV Stämmen infizierten Zellen. Cluster 2 fasst Proteine zusammen, die einen Einfluss auf die Morphologie der Zellen nehmen, wie Zytoskelett-bezogenen Proteine oder extrazelluläre Rezeptoren, welche mit der Extrazellulär Matrix (EZM) interagieren oder Proteine der EZM sind. Aber auch Proteine, die Bestandteil des Wundheilungsprozesses sind, werden herunterreguliert.

Proteine, die benötigt werden, um den oxidativen Stress via Peroxide zu minimieren aufgrund von gesteigertem Sauerstoffbedarf der infizierten Zellen, werden herunterreguliert.

Tabelle 4.3| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 3

KEGG ID/ GO ID	KEGG pathway/ GO Terms	Term pValue¹	No. Genes²	Key Terms
KEGG:04530	<i>Tight junction</i>	6.30E-08	8.00	<i>Cell morphology</i>
KEGG:04510	<i>Focal adhesion</i>	6.36E-06	9.00	
KEGG:04810	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	2.67E-06	14.00	
GO:0009988	<i>cell-cell recognition</i>	4.44E-06	9.00	
GO:0008064	<i>regulation of actin polymerization or depolymerization</i>	2.32E-06	15.00	
KEGG:04520	<i>Adherens junction</i>	4.20E-05	12.00	
GO:0097581	<i>lamellipodium organization</i>	3.62E-05	9.00	
KEGG:00010	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	2.12E-07	17.00	<i>Metabolism and protein translation machinery</i>
KEGG:00030	<i>Pentose phosphate pathway</i>	1.84E-07	9.00	
KEGG:00270	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	7.14E-06	9.00	
KEGG:00520	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	2.30E-06	8.00	
GO:0006188	<i>IMP biosynthetic process</i>	4.84E-05	4.00	
KEGG:00970	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	3.95E-05	12.00	
GO:0006541	<i>glutamine metabolic process</i>	6.33E-05	5.00	
GO:0000302	<i>response to reactive oxygen species</i>	6.41E-05	17.00	<i>Protein stability</i>
KEGG:03050	<i>Proteasome</i>	1.19E-17	19.00	
GO:0031647	<i>regulation of protein stability</i>	1.04E-08	23.00	
GO:0006511	<i>ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	3.55E-06	29.00	
GO:0010499	<i>proteasomal ubiquitin-independent protein catabolic process</i>	5.09E-05	5.00	
KEGG:04144	<i>Endocytosis</i>	1.35E-05	17.00	<i>Protein transport</i>
GO:0030904	<i>retromer complex</i>	8.65E-08	7.00	
GO:0016197	<i>endosomal transport</i>	4.42E-05	14.00	
GO:0045022	<i>early endosome to late endosome transport</i>	7.01E-05	6.00	
GO:0006888	<i>endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport</i>	4.97E-07	13.00	
GO:0030660	<i>Golgi-associated vesicle membrane</i>	6.65E-09	12.00	
KEGG:05203	<i>Viral carcinogenesis</i>	2.30E-06	8.00	<i>Virus replication</i>
GO:0019081	<i>viral translation</i>	7.34E-06	5.00	

¹ p value ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem GO Term oder KEGG pathway gehörenden Proteine

Die Proteine im Cluster 3 sind anfänglich der Infektion, gemessen an den Kontrollzellen, überexprimiert und werden mit der fortschreitenden Infektion herunterreguliert. Die Veränderung einzelner Proteine dieses Clusters sind bereits ab 1,5h nach der Infektion bei VACWR infizierten FR Zellen sichtbar im Gegensatz zu den mit CPXV Stämmen infizierten Zellen. Nach 8h *p.i.* sind die Proteine dieses Clusters bei CPXV infizierten Zellen noch vergleichbar wie in den Kontrollzellen exprimiert. Bei VACWR infizierten Zellen ist die Veränderung der Proteinexpression stärker wahrnehmbar. Nach 25h *p.i.* jedoch sind diese Proteine bei den mit CPXV Stämmen infizierten Zellen vollständig herunterreguliert während bei den VACWR infizierten Zellen immer noch Proteine hochreguliert vorliegen. Dabei handelt es sich um Proteine, die für die Translation viraler Proteine notwendig sind sowie zum Proteasom gehören. Proteinklassen, die in diesem Cluster herunterreguliert werden, beziehen sich auf die Regulation des Zytoskeletts, die morphologische Veränderungen aufgrund von Ausbildung von Zellprojektionen und den Verlust von Zell-Zell-Kontakten verursachen. Weiterhin werden auch Proteine reguliert, die den Proteintransport von der Translationsmaschinerie zum benötigten Ort begünstigen. Metabolische Prozesse, wie z.B. die Glykolyse, welche für die Virusreplikation entbehrlich ist (39), werden ebenfalls herunterreguliert.

4.5.2. Orthopockenviraler Einfluss auf die BJ Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten BJ Zellen 7103 Wirtsproteine identifiziert von denen 4469 Proteine zur Quantifizierung weiterverwendet wurden. Aus dieser Anzahl wurden mittels ANOVA mit einem FDR von 1% 715 Proteine als signifikant reguliert über den Infektionszeitraum bewertet.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 4.8) und in zwei Cluster unterteilt.

Die Proteine der zwei Cluster wurden separat mittels *Cytoscape*, der App *ClueGo* auf die zugehörigen GO Terms und *KEGG pathways* analysiert ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse der *KEGG pathways* und GO Annotation sind in den Tabellen 4.4 und 4.5 dargestellt.

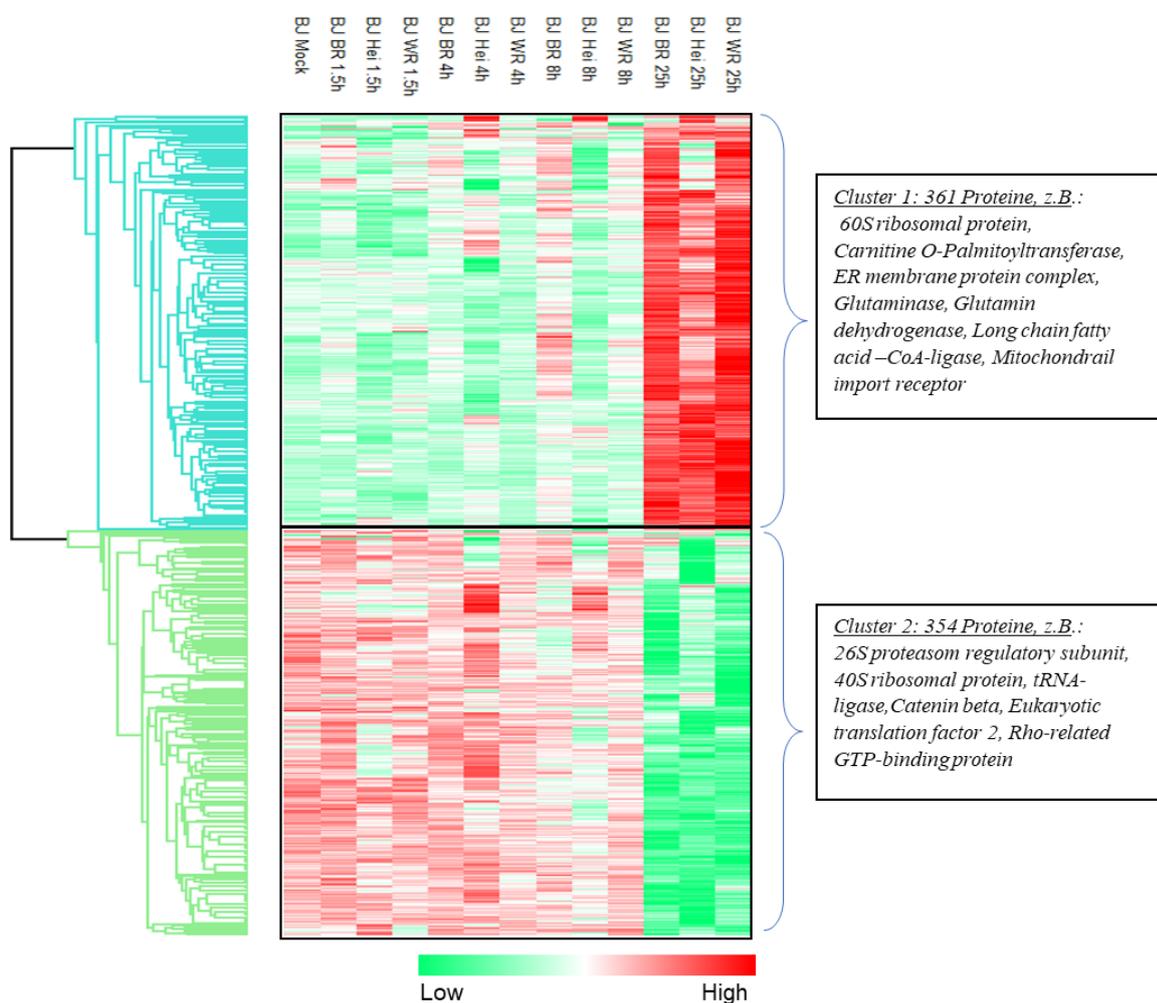


Abbildung 4.8 Intrazellulär regulierte Proteine in BJ Zellen über 25h p.i. infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR| In der *Heatmap* sind alle signifikant (FDR 1%) unterschiedlich regulierten intrazellulären Proteine der BJ Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Proteine wurden in zwei Cluster gemäß den gravierenden Unterschieden in den Expressionsintensitäten unterteilt.

Cluster 1 zeigt die Proteine, welche über den Infektionsverlauf verglichen mit den Kontrollzellen überexprimiert werden. Cluster 2 beinhaltet Proteine, die in den Kontrollzellen überexprimiert waren und mit dem Infektionsverlauf herunterreguliert werden.

Tabelle 4.4| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den BJ Zellen zugehörig dem Cluster 1

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:00020</i>	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	<i>1.04E-20</i>	<i>16.00</i>	<i>Metabolism</i>
<i>KEGG:00071</i>	<i>Fatty acid degradation</i>	<i>2.12E-14</i>	<i>14.00</i>	
<i>KEGG:00190</i>	<i>Oxidative phosphorylation</i>	<i>3.23E-11</i>	<i>18.00</i>	
<i>KEGG:00620</i>	<i>Pyruvate metabolism</i>	<i>6.03E-11</i>	<i>11.00</i>	
<i>KEGG:00062</i>	<i>Fatty acid elongation</i>	<i>1.36E-05</i>	<i>6.00</i>	
<i>KEGG:00010</i>	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	<i>3.53E-06</i>	<i>9.00</i>	
<i>KEGG:00280</i>	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	<i>8.32E-14</i>	<i>14.00</i>	
<i>KEGG:00310</i>	<i>Lysine degradation</i>	<i>5.17E-10</i>	<i>12.00</i>	
<i>KEGG:00640</i>	<i>Propanoate metabolism</i>	<i>7.48E-08</i>	<i>8.00</i>	
<i>KEGG:00380</i>	<i>Tryptophan metabolism</i>	<i>4.82E-07</i>	<i>8.00</i>	
<i>KEGG:00410</i>	<i>beta-Alanine metabolism</i>	<i>1.06E-06</i>	<i>7.00</i>	
<i>GO:0006520</i>	<i>cellular amino acid metabolic process</i>	<i>8.79E-06</i>	<i>23.00</i>	
<i>KEGG:00510</i>	<i>N-Glycan biosynthesis</i>	<i>1.42E-08</i>	<i>10.00</i>	
<i>KEGG:03040</i>	<i>Spliceosome</i>	<i>3.21E-05</i>	<i>11.00</i>	
<i>GO:0009117</i>	<i>nucleotide metabolic process</i>	<i>1.56E-07</i>	<i>34.00</i>	
<i>GO:0051031</i>	<i>tRNA transport</i>	<i>1.49E-06</i>	<i>8.00</i>	
<i>GO:0022613</i>	<i>ribonucleoprotein complex biogenesis</i>	<i>5.03E-06</i>	<i>26.00</i>	
<i>GO:0051028</i>	<i>mRNA transport</i>	<i>6.92E-05</i>	<i>14.00</i>	
<i>GO:0030684</i>	<i>preribosome</i>	<i>3.27E-05</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0016072</i>	<i>rRNA metabolic process</i>	<i>3.02E-05</i>	<i>16.00</i>	<i>Quality control/ protein processing</i>
<i>GO:0042254</i>	<i>ribosome biogenesis</i>	<i>2.39E-05</i>	<i>19.00</i>	
<i>KEGG:04141</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>2.42E-12</i>	<i>21.00</i>	
<i>GO:0034975</i>	<i>protein folding in endoplasmic reticulum</i>	<i>3.11E-05</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0034976</i>	<i>response to endoplasmic reticulum stress</i>	<i>3.83E-10</i>	<i>28.00</i>	
<i>GO:0034663</i>	<i>endoplasmic reticulum chaperone complex</i>	<i>4.02E-09</i>	<i>8.00</i>	
<i>GO:0035966</i>	<i>response to topologically incorrect protein</i>	<i>5.08E-07</i>	<i>19.00</i>	<i>Cell death</i>
<i>GO:0006986</i>	<i>response to unfolded protein</i>	<i>3.12E-07</i>	<i>18.00</i>	
<i>KEGG:04217</i>	<i>Necroptosis</i>	<i>4.15E-08</i>	<i>16.00</i>	<i>Virus replication</i>
<i>GO:0046794</i>	<i>transport of virus</i>	<i>5.73E-06</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0019080</i>	<i>viral gene expression</i>	<i>6.02E-05</i>	<i>15.00</i>	

¹ *p value* ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Im Cluster 1 sind Wirtszellproteine zusammengefasst, die über den Infektionsverlauf hochreguliert werden. Die regulierten Proteine im Cluster 1 beziehen sich hauptsächlich auf diverse metabolische Prozesse wie Energiegewinnung oder Synthese von diversen Bausteinen (Aminosäuren, Nukleotiden) für die Replikation der OPV, posttranslationale Modifikationen, Proteinprozessierung im Endoplasmatischen Retikulum sowie auf den Prozess des programmierten Zelltods, Nekroptose.

Tabelle 4.5| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den BJ Zellen zugehörig dem Cluster 2

KEGG ID/ GO ID	KEGG pathway/ GO Terms	Term pValue¹	No. Genes²	Key Terms
KEGG:04510	<i>Focal adhesion</i>	1.47E-13	24.00	Cell morphology
KEGG:04810	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	1.64E-09	20.00	
GO:0016055	<i>Wnt signaling pathway</i>	3.56E-08	33.00	
KEGG:04670	<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	4.98E-06	11.00	
KEGG:04520	<i>Adherens junction</i>	5.00E-06	9.00	
KEGG:00030	<i>Pentose phosphate pathway</i>	1.62E-09	9.00	Metabolism
KEGG:05230	<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	2.05E-07	10.00	
KEGG:00010	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	3.08E-06	9.00	
KEGG:00520	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	2.05E-05	7.00	
KEGG:04066	<i>HIF-1 signaling pathway</i>	7.24E-05	9.00	
KEGG:00500	<i>Starch and sucrose metabolism</i>	3.71E-05	6.00	
KEGG:00270	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	1.78E-05	7.00	Protein translation
KEGG:00970	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	2.11E-08	11.00	
GO:0006417	<i>regulation of translation</i>	4.81E-16	41.00	
GO:0006413	<i>translational initiation</i>	1.77E-15	28.00	
GO:0005850	<i>eukaryotic translation initiation factor 2 complex</i>	9.15E-08	5.00	
GO:0005852	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 complex</i>	3.31E-08	7.00	
GO:0061157	<i>mRNA destabilization</i>	3.39E-06	7.00	
GO:0003729	<i>mRNA binding</i>	2.69E-05	19.00	Transport
KEGG:04144	<i>Endocytosis</i>	2.65E-13	26.00	
GO:0016192	<i>vesicle-mediated transport</i>	2.07E-18	109.00	
GO:0060627	<i>regulation of vesicle-mediated transport</i>	1.12E-11	41.00	
GO:0005768	<i>endosome</i>	7.21E-08	48.00	Protein translation machinery/ protein stability
KEGG:03013	<i>RNA transport</i>	2.64E-07	15.00	
GO:0071826	<i>ribonucleoprotein complex subunit organization</i>	2.17E-09	22.00	
GO:0030968	<i>endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>	9.28E-06	13.00	
GO:0035967	<i>cellular response to topologically incorrect protein</i>	4.77E-05	14.00	
GO:0034620	<i>cellular response to unfolded protein</i>	4.08E-05	13.00	
GO:0005840	<i>ribosome</i>	1.40E-05	17.00	

GO:0071560	<i>cellular response to transforming growth factor beta stimulus</i>	5.78E-08	20.00	Signal regulated kinases and responses
GO:0000165	<i>MAPK cascade</i>	1.32E-08	51.00	
GO:0007265	<i>Ras protein signal transduction</i>	9.17E-07	27.00	
GO:0043547	<i>positive regulation of GTPase activity</i>	5.45E-07	27.00	
GO:0007266	<i>Rho protein signal transduction</i>	6.05E-07	16.00	
GO:0071357	<i>cellular response to type I interferon</i>	2.87E-05	10.00	
GO:0032872	<i>regulation of stress-activated MAPK cascade</i>	7.67E-06	19.00	
GO:0043406	<i>positive regulation of MAP kinase activity</i>	3.77E-06	21.00	
GO:0071902	<i>positive regulation of protein serine/threonine kinase activity</i>	1.29E-06	25.00	
GO:0071900	<i>regulation of protein serine/threonine kinase activity</i>	1.49E-05	30.00	
GO:1901184	<i>regulation of ERBB signaling pathway</i>	3.29E-06	12.00	Protein stability
GO:0032435	<i>negative regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	9.69E-06	7.00	
GO:0042058	<i>regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway</i>	1.53E-06	12.00	
GO:0032434	<i>regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	2.61E-05	12.00	

¹ *p value* ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Im Cluster 2 sind Wirtszellproteine zusammengefasst, die über den Infektionsverlauf herunterreguliert werden. Unterexprimiert werden diese Proteine erst zu 25h *p.i.* in allen OPV infizierten BJ Zellen gemessen.

Die regulierten Proteine im Cluster 2 beziehen sich auf morphologische Veränderungen der Zelle aufgrund des Einflusses auf das Zytoskelett, metabolische Prozesse, Proteinprozessierungen sowie zellwachstumsfördernde Signalkaskaden wie *MAPK*, *EGF* als auch Regulation der Proteinstabilität.

4.5.3. Orthopockenviraler Einfluss auf die Fc3Tg Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten Fc3Tg Zellen 7152 Wirtsproteine identifiziert von denen 4229 Proteine zur Quantifizierung weiterverwendet wurden. Aus dieser Anzahl wurden mittels ANOVA mit einer FDR von 1% 381 Proteine als signifikant reguliert über den Infektionszeitraum bewertet.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 4.9) und in zwei Cluster unterteilt.

Die Proteine der zwei Cluster wurden separat mittels *Cytoscape*, der App *ClueGo* auf die zugehörigen *GO Terms* und *KEGG pathways* analysiert ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse der *KEGG pathways* und *GO* Annotation sind in den Tabellen 4.6 und 4.7 dargestellt.

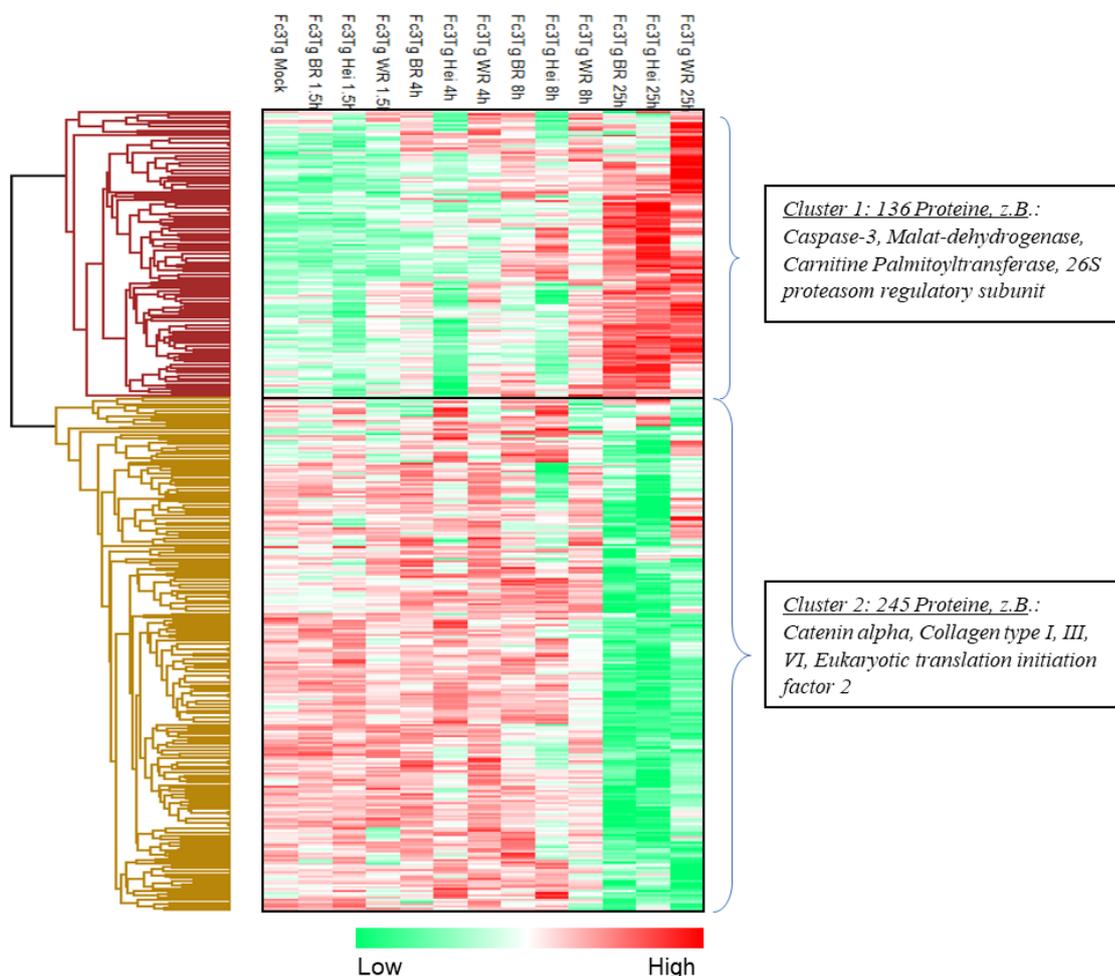


Abbildung 4.9 Intrazellulär regulierte Proteine in Fc3Tg Zellen über 25h p.i. infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR In der *Heatmap* sind alle signifikant (FDR 1%) unterschiedlich regulierten intrazellulären Proteine der Fc3Tg Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Proteine wurden in zwei Cluster gemäß auftretenden Unterschieden in den Expressionsintensitäten unterteilt.

Cluster 1 zeigt die Proteine, welche über den Infektionsverlauf verglichen mit den Kontrollzellen überexprimiert werden. Die Veränderung der Proteinexpression in diesem Cluster verläuft je Virusart unterschiedlich über den Infektionsverlauf. Cluster 2 beinhaltet Proteine, die in den Kontrollzellen überexprimiert waren und mit dem Infektionsverlauf herunterreguliert werden. Jedoch zeigt sich auch in diesem Cluster ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen den CPXV Stämmen und auch zwischen den Virusarten.

Tabelle 4.6| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den Fc3Tg Zellen zugehörig dem Cluster 1

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:04920</i>	<i>Adipocytokine signaling pathway</i>	<i>1.85E-03</i>	<i>3.00</i>	<i>Metabolism</i>
<i>GO:0006119</i>	<i>oxidative phosphorylation</i>	<i>9.89E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0045333</i>	<i>cellular respiration</i>	<i>3.47E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0009063</i>	<i>cellular amino acid catabolic process</i>	<i>2.00E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0043648</i>	<i>dicarboxylic acid metabolic process</i>	<i>1.09E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0051082</i>	<i>unfolded protein binding</i>	<i>6.03E-06</i>	<i>5.00</i>	<i>Protein stability</i>
<i>GO:0050821</i>	<i>protein stabilization</i>	<i>4.81E-05</i>	<i>5.00</i>	<i>Exosomes</i>
<i>GO:1903561</i>	<i>extracellular vesicle</i>	<i>1.32E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0070062</i>	<i>extracellular exosome</i>	<i>1.04E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0016667</i>	<i>oxidoreductase activity, acting on a sulfur group of donors</i>	<i>5.01E-04</i>	<i>3.00</i>	<i>Signal transduction, cell death</i>
<i>GO:0032482</i>	<i>Rab protein signal transduction</i>	<i>8.47E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>KEGG:04216</i>	<i>Ferroptosis</i>	<i>4.69E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0097472</i>	<i>cyclin-dependent protein kinase activity</i>	<i>2.21E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:1905368</i>	<i>peptidase complex</i>	<i>1.57E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:1904029</i>	<i>regulation of cyclin-dependent protein kinase activity</i>	<i>1.50E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0070585</i>	<i>protein localization to mitochondrion</i>	<i>1.26E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0072655</i>	<i>establishment of protein localization to mitochondrion</i>	<i>1.09E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0003725</i>	<i>double-stranded RNA binding</i>	<i>1.09E-03</i>	<i>3.00</i>	

¹ *p value* ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Im Cluster 1 sind Wirtszellproteine zusammengefasst, die im Infektionsverlauf hochreguliert werden. Die regulierten Proteine im Cluster 1 beziehen sich hauptsächlich auf metabolische Prozesse wie Energiegewinnung, Einfluss auf den Fettstoffwechsel, Regulation der Proteinstabilität sowie Prozessierung der Proteine und auf den Prozess des programmierten Zelltods durch Ferroptose. Aber auch Proteine, die in die Gruppe der dsRNA *binding* gehören, werden überexprimiert.

Tabelle 4.7| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den Fc3Tg Zellen zugehörig dem Cluster 2

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:04670</i>	<i>Leukocyte transendothelial migration</i>	<i>1.12E-04</i>	<i>5.00</i>	<i>Cell morphology</i>
<i>KEGG:04520</i>	<i>Adherens junction</i>	<i>3.36E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0097517</i>	<i>contractile actin filament bundle</i>	<i>9.83E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0007044</i>	<i>cell-substrate junction assembly</i>	<i>9.21E-05</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:1903391</i>	<i>regulation of adherens junction organization</i>	<i>9.23E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0030177</i>	<i>positive regulation of Wnt signaling pathway</i>	<i>6.33E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0010812</i>	<i>negative regulation of cell-substrate adhesion</i>	<i>4.85E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0007043</i>	<i>cell-cell junction assembly</i>	<i>3.60E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0051291</i>	<i>protein heterooligomerization</i>	<i>3.45E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0016342</i>	<i>catenin complex</i>	<i>1.49E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0007229</i>	<i>integrin-mediated signaling pathway</i>	<i>3.23E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0032432</i>	<i>actin filament bundle</i>	<i>1.32E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0042641</i>	<i>actomyosin</i>	<i>1.39E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0048027</i>	<i>mRNA 5'-UTR binding</i>	<i>6.38E-05</i>	<i>3.00</i>	<i>Protein translation</i>
<i>GO:0045727</i>	<i>positive regulation of translation</i>	<i>3.49E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0002181</i>	<i>cytoplasmic translation</i>	<i>2.85E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0019838</i>	<i>growth factor binding</i>	<i>7.70E-04</i>	<i>4.00</i>	<i>Modification processes</i>
<i>GO:0003725</i>	<i>double-stranded RNA binding</i>	<i>1.13E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0044272</i>	<i>sulfur compound biosynthetic process</i>	<i>2.62E-03</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0018208</i>	<i>peptidyl-proline modification</i>	<i>1.18E-03</i>	<i>3.00</i>	

¹ *p value* ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Die Proteine des Clusters 2 sind anfänglich der Infektion, gemessen an den Kontrollzellen, überexprimiert und werden mit fortschreitender Infektion herunterreguliert. Die Veränderung des Expressionsmusters verläuft abhängig von der verwendeten Virusart unterschiedlich. Nach 25h *p.i.* sind diese Proteine bei den mit CPXV Stämmen infizierten Zellen fast vollständig herunterreguliert, während bei den VACWR infizierten Zellen immer noch Proteine hochreguliert vorliegen. Proteine dieses Clusters regulieren die Zellmorphologie sowie verstärkt die Proteintranslation. Bei VACWR infizierten Fc3Tg sind die Translationsproteine jedoch noch überexprimiert. Aber auch hier kommen Vertreter des *GO Terms* dsRNA binding vor.

4.5.4. Orthopockenviraler Einfluss auf die HaCats

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten HaCats 7402 Wirtsproteine identifiziert von denen 5127 Proteine zur Quantifizierung weiterverwendet wurden. Aus dieser Anzahl wurden mittels ANOVA mit einer *FDR* von 1% 2400 Proteine als signifikant reguliert über den Infektionszeitraum bewertet.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 4.10) und in zwei Cluster unterteilt.

Die Proteine der zwei Cluster wurden separat mittels *Cytoscape*, der App *ClueGo* auf die zugehörigen *GO Terms* und *KEGG pathways* analysiert ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse der *KEGG pathways* und *GO* Annotation sind in den Tabellen 4.8 und 4.9 dargestellt.

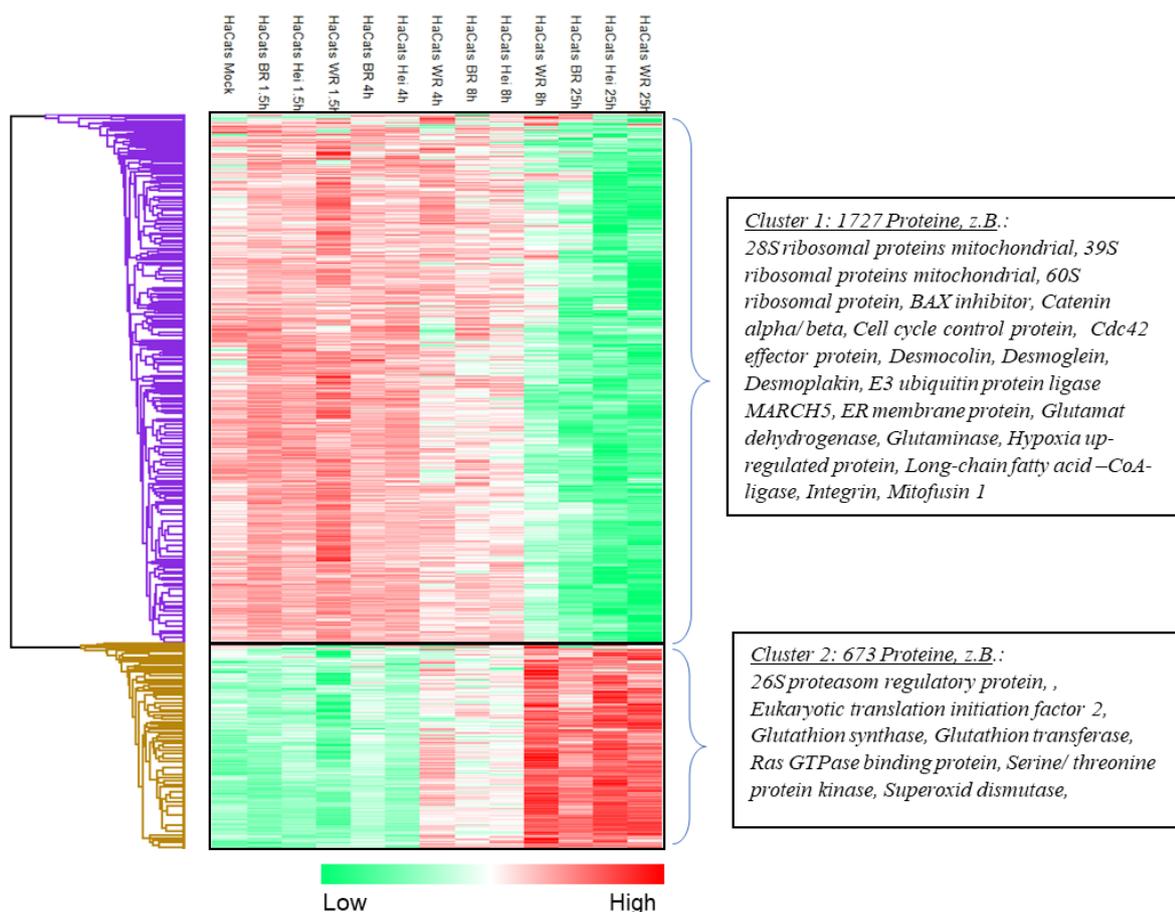


Abbildung 4.10 Intrazellulär regulierte Proteine in HaCat Zellen über 25h p.i. infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR In der *Heatmap* sind alle signifikant (*FDR* 1%) unterschiedlich regulierten intrazellulären Proteine der HaCat Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Proteine wurden in zwei Cluster gemäß auftretenden Unterschieden in den Expressionsintensitäten unterteilt.

Cluster 1 zeigt die Proteine, welche über den Infektionsverlauf verglichen mit den Kontrollzellen unterexprimiert werden. Hervorzuheben sind die beschleunigten Veränderungen in VACWR infizierten Zellen, bei denen bereits nach 8h p.i. die Proteine dieses Clusters fast vollständig herunterreguliert sind.

Cluster 2 beinhaltet Proteine, die in den Kontrollzellen unterexprimiert waren und mit dem Infektionsverlauf hochreguliert werden. Auch in diesem Cluster zeigen sich Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den Virusarten: bereits nach 4h p.i. sind diese Proteine bei VACWR infizierten Zellen hochreguliert. Nach 8h p.i. entspricht die Expressionsintensität der Expression 25h p.i. mit CPXV Stämmen infizierten Zellen.

Tabelle 4.8| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den HaCats zugehörig dem Cluster 1

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:00190</i>	<i>Oxidative phosphorylation</i>	<i>7.67E-28</i>	<i>60.00</i>	<i>Metabolism</i>
<i>KEGG:00020</i>	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	<i>3.19E-13</i>	<i>19.00</i>	
<i>KEGG:00071</i>	<i>Fatty acid degradation</i>	<i>1.20E-07</i>	<i>17.00</i>	
<i>KEGG:00100</i>	<i>Steroid biosynthesis</i>	<i>1.32E-07</i>	<i>11.00</i>	
<i>KEGG:04979</i>	<i>Cholesterol metabolism</i>	<i>5.18E-06</i>	<i>16.00</i>	
<i>KEGG:01040</i>	<i>Biosynthesis of unsaturated fatty acids</i>	<i>1.15E-05</i>	<i>11.00</i>	
<i>KEGG:00280</i>	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	<i>1.93E-09</i>	<i>20.00</i>	
<i>KEGG:00310</i>	<i>Lysine degradation</i>	<i>1.29E-05</i>	<i>17.00</i>	
<i>KEGG:00510</i>	<i>N-Glycan biosynthesis</i>	<i>1.27E-07</i>	<i>18.00</i>	
<i>KEGG:04141</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>1.64E-13</i>	<i>48.00</i>	<i>Quality control/ protein processing</i>
<i>GO:0034976</i>	<i>response to endoplasmic reticulum stress</i>	<i>3.30E-09</i>	<i>69.00</i>	
<i>GO:0036503</i>	<i>ERAD pathway</i>	<i>3.15E-06</i>	<i>28.00</i>	
<i>GO:0030433</i>	<i>ubiquitin-dependent ERAD pathway</i>	<i>1.09E-06</i>	<i>23.00</i>	
<i>GO:1903513</i>	<i>endoplasmic reticulum to cytosol transport</i>	<i>1.26E-05</i>	<i>12.00</i>	<i>Protein translation machinery</i>
<i>KEGG:03008</i>	<i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i>	<i>1.47E-13</i>	<i>37.00</i>	
<i>KEGG:03010</i>	<i>Ribosome</i>	<i>1.21E-06</i>	<i>34.00</i>	
<i>GO:0016072</i>	<i>rRNA metabolic process</i>	<i>9.13E-47</i>	<i>117.00</i>	
<i>GO:0042273</i>	<i>ribosomal large subunit biogenesis</i>	<i>4.29E-19</i>	<i>38.00</i>	
<i>GO:0071426</i>	<i>ribonucleoprotein complex export from nucleus</i>	<i>1.17E-10</i>	<i>45.00</i>	
<i>GO:0000959</i>	<i>mitochondrial RNA metabolic process</i>	<i>1.07E-12</i>	<i>23.00</i>	
<i>GO:0000964</i>	<i>mitochondrial RNA 5'-end processing</i>	<i>6.26E-06</i>	<i>5.00</i>	
<i>GO:0090646</i>	<i>mitochondrial tRNA processing</i>	<i>3.97E-06</i>	<i>8.00</i>	
<i>KEGG:03040</i>	<i>Spliceosome</i>	<i>2.84E-18</i>	<i>49.00</i>	
<i>GO:0071427</i>	<i>mRNA-containing ribonucleoprotein complex export from nucleus</i>	<i>4.24E-11</i>	<i>42.00</i>	<i>Processing of transcripts</i>
<i>GO:0006406</i>	<i>mRNA export from nucleus</i>	<i>4.24E-11</i>	<i>42.00</i>	
<i>GO:0051028</i>	<i>mRNA transport</i>	<i>5.99E-09</i>	<i>49.00</i>	
<i>GO:0031124</i>	<i>mRNA 3'-end processing</i>	<i>5.81E-06</i>	<i>31.00</i>	
<i>GO:0034660</i>	<i>ncRNA metabolic process</i>	<i>2.25E-35</i>	<i>165.00</i>	
<i>GO:0048199</i>	<i>vesicle targeting, to, from or within Golgi</i>	<i>8.67E-07</i>	<i>24.00</i>	<i>Protein transport</i>
<i>GO:0048194</i>	<i>Golgi vesicle budding</i>	<i>2.23E-07</i>	<i>26.00</i>	
<i>GO:0048193</i>	<i>Golgi vesicle transport</i>	<i>3.62E-06</i>	<i>71.00</i>	
<i>GO:0090114</i>	<i>COPII-coated vesicle budding</i>	<i>1.37E-06</i>	<i>23.00</i>	
<i>GO:0006888</i>	<i>endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport</i>	<i>1.51E-05</i>	<i>44.00</i>	
<i>GO:0004672</i>	<i>protein kinase activity</i>	<i>2.16E-06</i>	<i>91.00</i>	<i>Signal regulated kinases</i>
<i>GO:0033674</i>	<i>positive regulation of kinase activity</i>	<i>1.79E-05</i>	<i>39.00</i>	
<i>GO:0000165</i>	<i>MAPK cascade</i>	<i>1.60E-05</i>	<i>72.00</i>	
<i>GO:0004674</i>	<i>protein serine/threonine kinase activity</i>	<i>1.07E-05</i>	<i>61.00</i>	
<i>GO:0019058</i>	<i>viral life cycle</i>	<i>9.97E-14</i>	<i>88.00</i>	<i>Virus replication</i>
<i>GO:0019080</i>	<i>viral gene expression</i>	<i>6.44E-07</i>	<i>48.00</i>	

¹ p value ≤ 0,05; ² Anzahl der zu diesem GO Term oder KEGG pathway gehörenden Proteine

Im Cluster 1 sind die Wirtszellproteine zusammengefasst, die im Infektionsverlauf herunterreguliert werden. Diese Proteine sind bereits nach 8h *p.i.* in VACWR infizierten HaCats nahezu vollständig herunterreguliert. Bei den CPXV Stämmen sind diese Proteine erst nach 25h *p.i.* herunterreguliert. Die regulierten Proteine im Cluster 1 beziehen sich auf metabolische Prozesse wie Energiegewinnung, Einfluss auf den Fettstoffwechsel, Proteintranslation, posttranslationale Modifikationen, Prozessierung der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum sowie zellwachstumsfördernde Signalkaskaden.

Tabelle 4.9| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den HaCats zugehörig dem Cluster 2

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>No. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:00030</i>	<i>Pentose phosphate pathway</i>	<i>5.76E-19</i>	<i>18.00</i>	<i>Metabolism</i>
<i>KEGG:00010</i>	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	<i>2.00E-13</i>	<i>20.00</i>	
<i>KEGG:00051</i>	<i>Fructose and mannose metabolism</i>	<i>2.70E-12</i>	<i>14.00</i>	
<i>KEGG:00480</i>	<i>Glutathione metabolism</i>	<i>8.81E-09</i>	<i>14.00</i>	
<i>KEGG:05230</i>	<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	<i>6.83E-08</i>	<i>14.00</i>	
<i>GO:0006541</i>	<i>glutamine metabolic process</i>	<i>2.91E-05</i>	<i>8.00</i>	
<i>KEGG:00270</i>	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	<i>5.67E-11</i>	<i>15.00</i>	
<i>KEGG:00230</i>	<i>Purine metabolism</i>	<i>1.05E-12</i>	<i>26.00</i>	<i>Nucleotides metabolism and DNA replication</i>
<i>KEGG:00240</i>	<i>Pyrimidine metabolism</i>	<i>9.78E-08</i>	<i>13.00</i>	
<i>KEGG:00520</i>	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	<i>7.13E-06</i>	<i>10.00</i>	
<i>GO:0071897</i>	<i>DNA biosynthetic process</i>	<i>5.07E-07</i>	<i>29.00</i>	
<i>GO:0051054</i>	<i>positive regulation of DNA metabolic process</i>	<i>1.75E-06</i>	<i>30.00</i>	
<i>GO:0061418</i>	<i>regulation of transcription from RNA polymerase II promoter in response to hypoxia</i>	<i>1.68E-21</i>	<i>32.00</i>	
<i>GO:0043620</i>	<i>regulation of DNA-templated transcription in response to stress</i>	<i>2.22E-19</i>	<i>37.00</i>	
<i>GO:0045898</i>	<i>regulation of RNA polymerase II transcriptional preinitiation complex assembly</i>	<i>1.84E-06</i>	<i>7.00</i>	<i>Cell-cell-contact and cytoskeleton reorganization</i>
<i>KEGG:04540</i>	<i>Gap junction</i>	<i>3.33E-06</i>	<i>14.00</i>	
<i>GO:0007010</i>	<i>cytoskeleton organization</i>	<i>2.30E-11</i>	<i>112.00</i>	
<i>GO:0030036</i>	<i>actin cytoskeleton organization</i>	<i>6.69E-07</i>	<i>60.00</i>	
<i>GO:0000226</i>	<i>microtubule cytoskeleton organization</i>	<i>1.57E-07</i>	<i>53.00</i>	
<i>GO:0031111</i>	<i>negative regulation of microtubule polymerization or depolymerization</i>	<i>5.83E-06</i>	<i>10.00</i>	
<i>GO:0051258</i>	<i>protein polymerization</i>	<i>1.03E-05</i>	<i>31.00</i>	

KEGG:03050	<i>Proteasome</i>	2.87E-38	33.00	Protein stability
GO:0031146	<i>SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	9.83E-22	33.00	
GO:0031145	<i>anaphase-promoting complex-dependent catabolic process</i>	5.10E-22	33.00	
GO:0016579	<i>protein deubiquitination</i>	1.06E-16	50.00	
GO:0043161	<i>proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	6.63E-14	56.00	
GO:0016567	<i>protein ubiquitination</i>	8.06E-12	82.00	
GO:0006511	<i>ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	4.33E-12	67.00	
GO:0032446	<i>protein modification by small protein conjugation</i>	2.35E-11	86.00	
GO:1901800	<i>positive regulation of proteasomal protein catabolic process</i>	1.97E-05	17.00	
KEGG:00970	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	1.34E-10	17.00	Protein translation
GO:0008135	<i>translation factor activity, RNA binding</i>	2.95E-22	34.00	
GO:0043488	<i>regulation of mRNA stability</i>	2.06E-21	46.00	
GO:0003743	<i>translation initiation factor activity</i>	7.20E-20	25.00	
GO:0061013	<i>regulation of mRNA catabolic process</i>	6.92E-19	46.00	
GO:0002181	<i>cytoplasmic translation</i>	5.02E-12	25.00	
GO:0006413	<i>translational initiation</i>	1.78E-10	32.00	
GO:0061077	<i>chaperone-mediated protein folding</i>	8.47E-08	16.00	
GO:0044183	<i>protein folding chaperone</i>	6.43E-06	8.00	
GO:0075525	<i>viral translational termination-reinitiation</i>	2.46E-05	4.00	(Programmed) Cell death
GO:0019081	<i>viral translation</i>	1.21E-05	7.00	
GO:0044839	<i>cell cycle G2/M phase transition</i>	6.06E-24	61.00	
GO:0044772	<i>mitotic cell cycle phase transition</i>	8.20E-21	84.00	
GO:0043069	<i>negative regulation of programmed cell death</i>	7.75E-08	80.00	
GO:0097190	<i>apoptotic signaling pathway</i>	1.65E-07	59.00	
GO:0043068	<i>positive regulation of programmed cell death</i>	8.76E-07	61.00	
GO:0097193	<i>intrinsic apoptotic signaling pathway</i>	2.36E-05	32.00	
GO:0070498	<i>interleukin-1-mediated signaling pathway</i>	1.71E-25	38.00	
GO:0033209	<i>tumor necrosis factor-mediated signaling pathway</i>	4.44E-22	46.00	Antiviral response
GO:0050852	<i>T cell receptor signaling pathway</i>	2.33E-21	51.00	
GO:0002223	<i>stimulatory C-type lectin receptor signaling pathway</i>	1.40E-21	37.00	
GO:0071356	<i>cellular response to tumor necrosis factor</i>	9.43E-20	57.00	
GO:0071347	<i>cellular response to interleukin-1</i>	1.77E-18	42.00	
GO:1902531	<i>regulation of intracellular signal transduction</i>	9.72E-06	123.00	
GO:0032872	<i>regulation of stress-activated MAPK cascade</i>	3.10E-06	30.00	

¹ p value $\leq 0,05$; ² Anzahl der zu diesem GO Term oder KEGG pathway gehörenden Proteine

Die Proteine des Clusters 2 sind anfänglich der Infektion, gemessen an den Kontrollzellen, unterexprimiert und werden mit der fortschreitenden Infektion hochreguliert. Die Veränderung des Proteinmusters wird vom VACWR dominiert. Bereits nach 4h *p.i.* sind diese Proteine bei VACWR infizierten Zellen überexprimiert und nach 8h *p.i.* noch stärker hochreguliert verglichen mit den CPXV Stämmen infizierten Zellen. Proteine dieses Clusters haben einen Einfluss auf diverse metabolische Prozesse, Proteintranslation sowie Proteinprozessierungen, Regulation der Proteinstabilität, Zellwachstum sowie auf die Zellmorphologie.

4.5.5. Regulierte Proteine zwischen den Spezies

Die Expression homologer Proteine in den infizierten Wirtszellen wurden ebenfalls verglichen.

Es werden von 4477 identifizierten und quantifizierbaren Proteinen 1829 Proteine (*ANOVA, FDR 1%*) signifikant unterschiedlich reguliert zwischen den Wirtszellen über den Infektionszeitraum.

Die signifikant unterschiedlich exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abb. 4.11) und in drei Cluster unterteilt.

Die Proteine der drei Cluster wurden separat mittels *Cytoscape*, der App *ClueGo* auf die zugehörigen *GO Terms* und *KEGG pathways* analysiert ($p \leq 0.05$). Die Ergebnisse der *KEGG pathways* und *GO* Annotation sind in den Tabellen 4.10, 4.11 und 4.12 dargestellt.

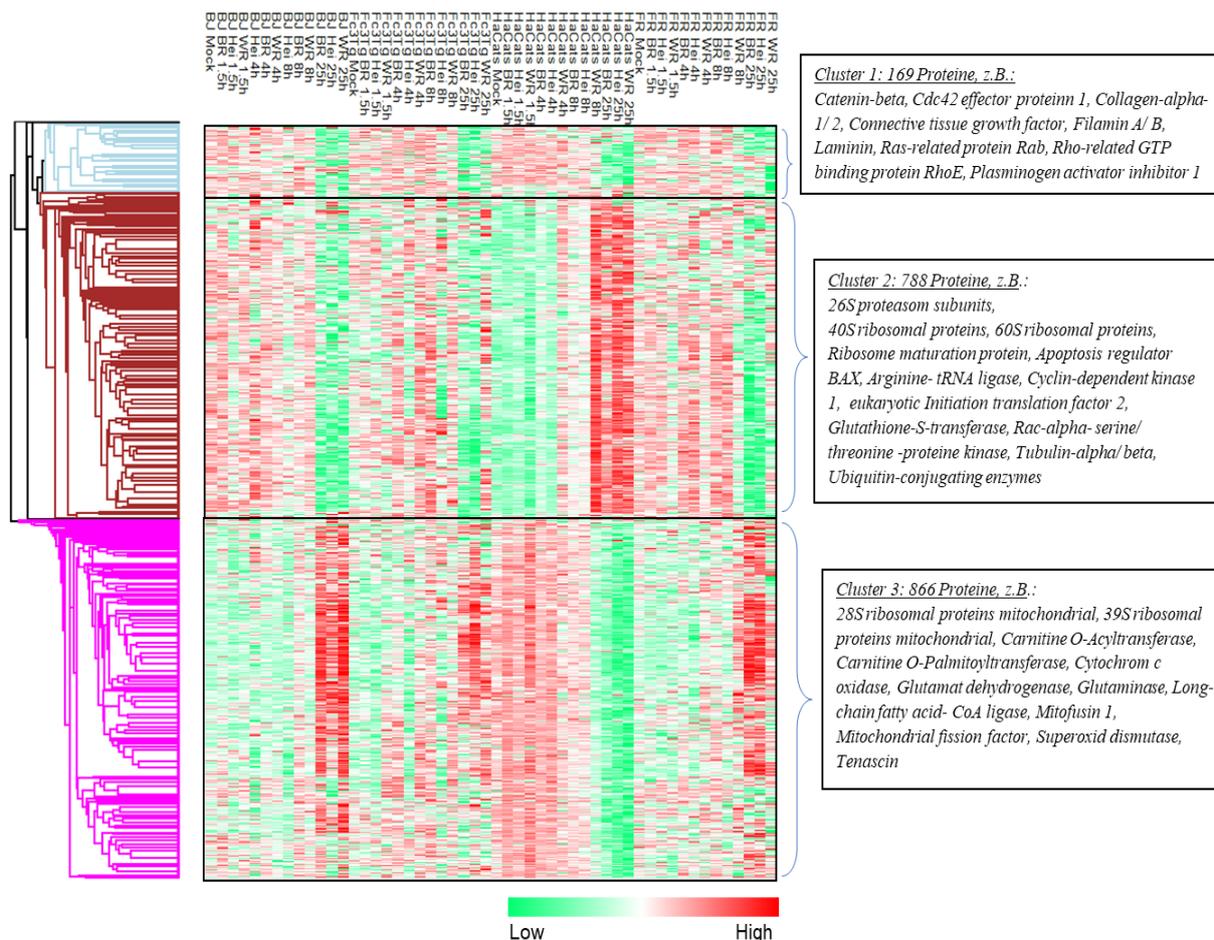


Abbildung 4.11 Intrazellulär regulierte homologe Proteine in BJ, HaCat, FR und Fc3Tg Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR| In der Heatmap sind alle signifikant ($FDR 1\%$) unterschiedlich regulierten intrazellulären Proteine innerhalb aller Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Proteine sind in drei Cluster gemäß auftretenden Unterschieden in den Expressionsintensitäten unterteilt.

Cluster 1 zeigt die Proteine, welche über den Infektionsverlauf verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen unterexprimiert werden. Die Regulation dieser Proteine verläuft in allen Zellen nahezu identisch. In Cluster 2 sind Expressionsunterschiede zwischen den Zellen zu erkennen. Während in den Fibroblasten diese Proteine unterexprimiert werden, werden diese in den HaCats hochreguliert. In Cluster 3 sind ebenfalls Expressionsdifferenzen zwischen den Fibroblasten und den Keratinozyten zu erkennen. In den HaCats werden diese Proteine über den Infektionsverlauf unterexprimiert, während in allen Fibroblasten diese überexprimiert werden.

Tabelle 4.10| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 1

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>Nr. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:04510</i>	<i>Focal adhesion</i>	<i>7.87E-11</i>	<i>15.00</i>	<i>Cell morphology</i>
<i>KEGG:04512</i>	<i>ECM-receptor interaction</i>	<i>2.06E-08</i>	<i>9.00</i>	
<i>KEGG:04520</i>	<i>Adherens junction</i>	<i>1.86E-06</i>	<i>7.00</i>	
<i>KEGG:05146</i>	<i>Amoebiasis</i>	<i>1.28E-05</i>	<i>7.00</i>	
<i>GO:0034329</i>	<i>cell junction assembly</i>	<i>1.61E-14</i>	<i>22.00</i>	
<i>GO:0034330</i>	<i>cell junction organization</i>	<i>1.62E-13</i>	<i>23.00</i>	
<i>GO:0031532</i>	<i>actin cytoskeleton reorganization</i>	<i>2.07E-06</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0008360</i>	<i>regulation of cell shape</i>	<i>4.13E-05</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0001952</i>	<i>regulation of cell-matrix adhesion</i>	<i>7.97E-05</i>	<i>8.00</i>	
<i>GO:0045216</i>	<i>cell-cell junction organization</i>	<i>6.00E-05</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0090109</i>	<i>regulation of cell-substrate junction assembly</i>	<i>1.19E-05</i>	<i>7.00</i>	<i>Wound healing</i>
<i>GO:0048407</i>	<i>platelet-derived growth factor binding</i>	<i>1.13E-10</i>	<i>6.00</i>	
<i>GO:0030020</i>	<i>extracellular matrix structural constituent conferring tensile strength</i>	<i>1.15E-09</i>	<i>8.00</i>	
<i>GO:2001238</i>	<i>positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway</i>	<i>3.75E-04</i>	<i>5.00</i>	
<i>GO:0005006</i>	<i>epidermal growth factor-activated receptor activity</i>	<i>3.28E-04</i>	<i>4.00</i>	
<i>GO:0038063</i>	<i>collagen-activated tyrosine kinase receptor signaling pathway</i>	<i>2.19E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:2001241</i>	<i>positive regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway in absence of ligand</i>	<i>2.19E-04</i>	<i>3.00</i>	
<i>GO:0061045</i>	<i>negative regulation of wound healing</i>	<i>1.52E-04</i>	<i>6.00</i>	

¹ p value $\leq 0,05$; ² Anzahl der zu diesem GO Term oder KEGG pathway gehörenden Proteine

Im Cluster 1 befinden sich Proteine, welche im Infektionsverlauf in allen vier Zelllinien, verglichen gegenüber den jeweiligen Kontrollzellen unterexprimiert werden.

Dieses Proteincluster bezieht sich auf Proteine, die Einfluss auf die Zellmorphologie haben. Sie beeinflussen die Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, die Zellmotilität als auch den Wundheilungsprozess.

Tabelle 4.11| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 2

KEGG ID/ GO ID	KEGG pathway/ GO Terms	Term pValue¹	Nr. Genes²	Key Terms
KEGG:00230	<i>Purine metabolism</i>	6.16E-12	27.00	Metabolism
KEGG:00030	<i>Pentose phosphate pathway</i>	4.57E-12	14.00	
KEGG:00051	<i>Fructose and mannose metabolism</i>	6.52E-08	11.00	
KEGG:00010	<i>Glycolysis / Gluconeogenesis</i>	1.91E-08	16.00	
KEGG:00480	<i>Glutathione metabolism</i>	3.32E-06	12.00	
KEGG:05230	<i>Central carbon metabolism in cancer</i>	2.97E-06	13.00	
KEGG:00620	<i>Pyruvate metabolism</i>	3.00E-05	9.00	
GO:0071456	<i>cellular response to hypoxia</i>	5.14E-16	46.00	
KEGG:00270	<i>Cysteine and methionine metabolism</i>	1.72E-14	19.00	
KEGG:00520	<i>Amino sugar and nucleotide sugar metabolism</i>	6.53E-11	16.00	
KEGG:04810	<i>Regulation of actin cytoskeleton</i>	3.70E-08	29.00	Cell morphology
KEGG:04540	<i>Gap junction</i>	8.48E-07	16.00	
GO:0030832	<i>regulation of actin filament length</i>	5.27E-11	36.00	
GO:0008154	<i>actin polymerization or depolymerization</i>	2.07E-11	40.00	
GO:0070507	<i>regulation of microtubule cytoskeleton organization</i>	5.65E-07	31.00	
GO:0051016	<i>barbed-end actin filament capping</i>	1.99E-06	8.00	
GO:1902850	<i>microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis</i>	1.73E-05	21.00	
KEGG:03050	<i>Proteasome</i>	5.76E-36	33.00	Protein stability
KEGG:04120	<i>Ubiquitin mediated proteolysis</i>	5.81E-06	19.00	
GO:0031146	<i>SCF-dependent proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	3.60E-23	37.00	
GO:0043161	<i>proteasome-mediated ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	1.56E-17	69.00	
GO:0006511	<i>ubiquitin-dependent protein catabolic process</i>	1.78E-16	85.00	
KEGG:04110	<i>Cell cycle</i>	5.31E-06	18.00	Cell death/ Cell growth
GO:0044772	<i>mitotic cell cycle phase transition</i>	6.54E-23	98.00	
GO:0044839	<i>cell cycle G2/M phase transition</i>	2.13E-19	60.00	
GO:0044843	<i>cell cycle G1/S phase transition</i>	1.06E-05	35.00	
KEGG:04217	<i>Necroptosis</i>	1.01E-07	24.00	
GO:0043067	<i>regulation of programmed cell death</i>	5.96E-11	147.00	
GO:0043068	<i>positive regulation of programmed cell death</i>	9.27E-07	70.00	
GO:0097190	<i>apoptotic signaling pathway</i>	1.53E-06	64.00	

KEGG:03010	<i>Ribosome</i>	3.31E-08	24.00	Protein Translation machinery
KEGG:00970	<i>Aminoacyl-tRNA biosynthesis</i>	1.98E-05	12.00	
GO:0006412	<i>translation</i>	2.43E-28	110.00	
GO:0006413	<i>translational initiation</i>	5.75E-24	53.00	
GO:0043488	<i>regulation of mRNA stability</i>	7.50E-28	57.00	
GO:0061013	<i>regulation of mRNA catabolic process</i>	2.05E-25	58.00	
GO:0019080	<i>viral gene expression</i>	1.32E-07	31.00	
GO:0038061	<i>NIK/NF-kappaB signaling</i>	8.30E-21	48.00	Antiviral response
GO:0002446	<i>neutrophil mediated immunity</i>	1.96E-20	87.00	
GO:0070555	<i>response to interleukin-1</i>	2.33E-17	48.00	
GO:0038095	<i>Fc-epsilon receptor signaling pathway</i>	1.16E-16	41.00	
GO:0002263	<i>cell activation involved in immune response</i>	1.01E-16	98.00	
GO:0002443	<i>leukocyte mediated immunity</i>	5.96E-14	105.00	
GO:0002682	<i>regulation of immune system process</i>	7.66E-10	149.00	
GO:0045321	<i>leukocyte activation</i>	6.56E-10	126.00	
GO:0045087	<i>innate immune response</i>	9.42E-07	92.00	
GO:0071349	<i>cellular response to interleukin-12</i>	1.64E-07	15.00	
GO:0035722	<i>interleukin-12-mediated signaling pathway</i>	1.08E-07	15.00	

¹ p value $\leq 0,05$; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Im Cluster 2 befinden sich Proteine, die zwischen den Wirtsarten unterschiedlich reguliert sind. Während in den Fibroblasten diese Proteine anfänglich überexprimiert sind und im Infektionsverlauf herunterreguliert werden, werden diese Proteine in den Keratinozyten hochreguliert. Ausnahmen bilden die VACWR infizierten FR Zellen und VACWR infizierten Fc3Tg Zelle: diese Proteine bleiben 25h *p.i.* noch überwiegend überexprimiert.

Proteine dieses Clusters gehören der Translationsmaschinerie, dem Proteasomsystem sowie neben einigen weiteren Stoffwechselprozessen, der immuninduzierenden Antwort. Daneben werden auch Proteine reguliert, die die Polymerisation von Aktinfilament induzieren.

Tabelle 4.12| GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 3

<i>KEGG ID/ GO ID</i>	<i>KEGG pathway/ GO Terms</i>	<i>Term pValue¹</i>	<i>Nr. Genes²</i>	<i>Key Terms</i>
<i>KEGG:00190</i>	<i>Oxidative phosphorylation</i>	<i>1.13E-23</i>	<i>41.00</i>	<i>Metabolism</i>
<i>KEGG:00020</i>	<i>Citrate cycle (TCA cycle)</i>	<i>1.51E-20</i>	<i>20.00</i>	
<i>KEGG:00071</i>	<i>Fatty acid degradation</i>	<i>1.39E-13</i>	<i>18.00</i>	
<i>KEGG:00620</i>	<i>Pyruvate metabolism</i>	<i>7.30E-08</i>	<i>12.00</i>	
<i>KEGG:00100</i>	<i>Steroid biosynthesis</i>	<i>7.35E-07</i>	<i>8.00</i>	
<i>KEGG:00062</i>	<i>Fatty acid elongation</i>	<i>4.08E-06</i>	<i>9.00</i>	
<i>GO:0033540</i>	<i>fatty acid beta-oxidation using acyl-CoA oxidase</i>	<i>1.59E-05</i>	<i>7.00</i>	
<i>GO:0003857</i>	<i>3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity</i>	<i>1.89E-05</i>	<i>5.00</i>	
<i>KEGG:00640</i>	<i>Propanoate metabolism</i>	<i>7.05E-08</i>	<i>11.00</i>	
<i>KEGG:00280</i>	<i>Valine, leucine and isoleucine degradation</i>	<i>5.97E-14</i>	<i>19.00</i>	
<i>KEGG:00310</i>	<i>Lysine degradation</i>	<i>1.51E-06</i>	<i>13.00</i>	
<i>KEGG:00510</i>	<i>N-Glycan biosynthesis</i>	<i>1.83E-09</i>	<i>15.00</i>	
<i>KEGG:03040</i>	<i>Spliceosome</i>	<i>1.16E-19</i>	<i>37.00</i>	
<i>KEGG:03008</i>	<i>Ribosome biogenesis in eukaryotes</i>	<i>3.34E-08</i>	<i>20.00</i>	
<i>KEGG:04141</i>	<i>Protein processing in endoplasmic reticulum</i>	<i>1.78E-22</i>	<i>44.00</i>	<i>Quality control/ Protein processing</i>
<i>GO:0034976</i>	<i>response to endoplasmic reticulum stress</i>	<i>4.71E-17</i>	<i>59.00</i>	
<i>GO:0030433</i>	<i>ubiquitin-dependent ERAD pathway</i>	<i>7.24E-10</i>	<i>21.00</i>	
<i>GO:0034620</i>	<i>cellular response to unfolded protein</i>	<i>3.19E-08</i>	<i>28.00</i>	
<i>GO:0030970</i>	<i>retrograde protein transport, ER to cytosol</i>	<i>7.05E-08</i>	<i>11.00</i>	
<i>GO:0036503</i>	<i>ERAD pathway</i>	<i>1.38E-08</i>	<i>23.00</i>	
<i>GO:0035967</i>	<i>cellular response to topologically incorrect protein</i>	<i>2.31E-07</i>	<i>29.00</i>	
<i>GO:0036498</i>	<i>IRE1-mediated unfolded protein response</i>	<i>2.07E-07</i>	<i>18.00</i>	
<i>GO:0030968</i>	<i>endoplasmic reticulum unfolded protein response</i>	<i>1.03E-07</i>	<i>25.00</i>	
<i>GO:0032527</i>	<i>protein exit from endoplasmic reticulum</i>	<i>3.15E-07</i>	<i>13.00</i>	
<i>GO:0090114</i>	<i>COPII-coated vesicle budding</i>	<i>5.69E-09</i>	<i>19.00</i>	<i>Protein Transport</i>
<i>GO:0006888</i>	<i>endoplasmic reticulum to Golgi vesicle-mediated transport</i>	<i>7.31E-08</i>	<i>32.00</i>	
<i>GO:0048194</i>	<i>Golgi vesicle budding</i>	<i>3.84E-08</i>	<i>19.00</i>	
<i>GO:0048199</i>	<i>vesicle targeting, to, from or within Golgi</i>	<i>4.02E-07</i>	<i>17.00</i>	
<i>GO:0048207</i>	<i>vesicle targeting, rough ER to cis-Golgi</i>	<i>3.25E-07</i>	<i>16.00</i>	
<i>GO:0048208</i>	<i>COPII vesicle coating</i>	<i>3.25E-07</i>	<i>16.00</i>	
<i>GO:0006892</i>	<i>post-Golgi vesicle-mediated transport</i>	<i>1.08E-05</i>	<i>18.00</i>	

KEGG:04142	<i>Lysosome</i>	8.61E-10	24.00	Antiviral response
KEGG:04145	<i>Phagosome</i>	6.59E-08	24.00	
GO:0043299	<i>leukocyte degranulation</i>	8.63E-09	67.00	
GO:0002283	<i>neutrophil activation involved in immune response</i>	6.29E-09	64.00	
GO:0043312	<i>neutrophil degranulation</i>	3.54E-09	64.00	
GO:0045055	<i>regulated exocytosis</i>	2.69E-08	86.00	
GO:0019058	<i>viral life cycle</i>	5.06E-08	45.00	Virus replication
GO:0048524	<i>positive regulation of viral process</i>	4.02E-06	20.00	
GO:0075733	<i>intracellular transport of virus</i>	8.06E-06	13.00	

¹ p value $\leq 0,05$; ² Anzahl der zu diesem *GO Term* oder *KEGG pathway* gehörenden Proteine

Im Cluster 3 befinden sich Proteine, die zwischen den Wirtsarten ebenfalls unterschiedlich reguliert sind. Während in den Fibroblasten diese Proteine anfänglich unterexprimiert sind und mit dem Infektionsverlauf hochreguliert werden, werden diese Proteine in den Keratinozyten herunterreguliert. In den Fibroblasten werden diese Proteine erst 25h *p.i.* überexprimiert.

In VACWR infizierten Keratinozyten sind diese Proteine bereits nach 8h *p.i.* herunterreguliert.

Die Proteine dieses Clusters regulieren metabolische Prozesse, z.B. Energiegewinnung über den Fettstoffwechsel, Qualitätskontrolle der Proteine über die Proteinprozessierung sowie den Proteintransport vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) zum Golgi-Apparat.

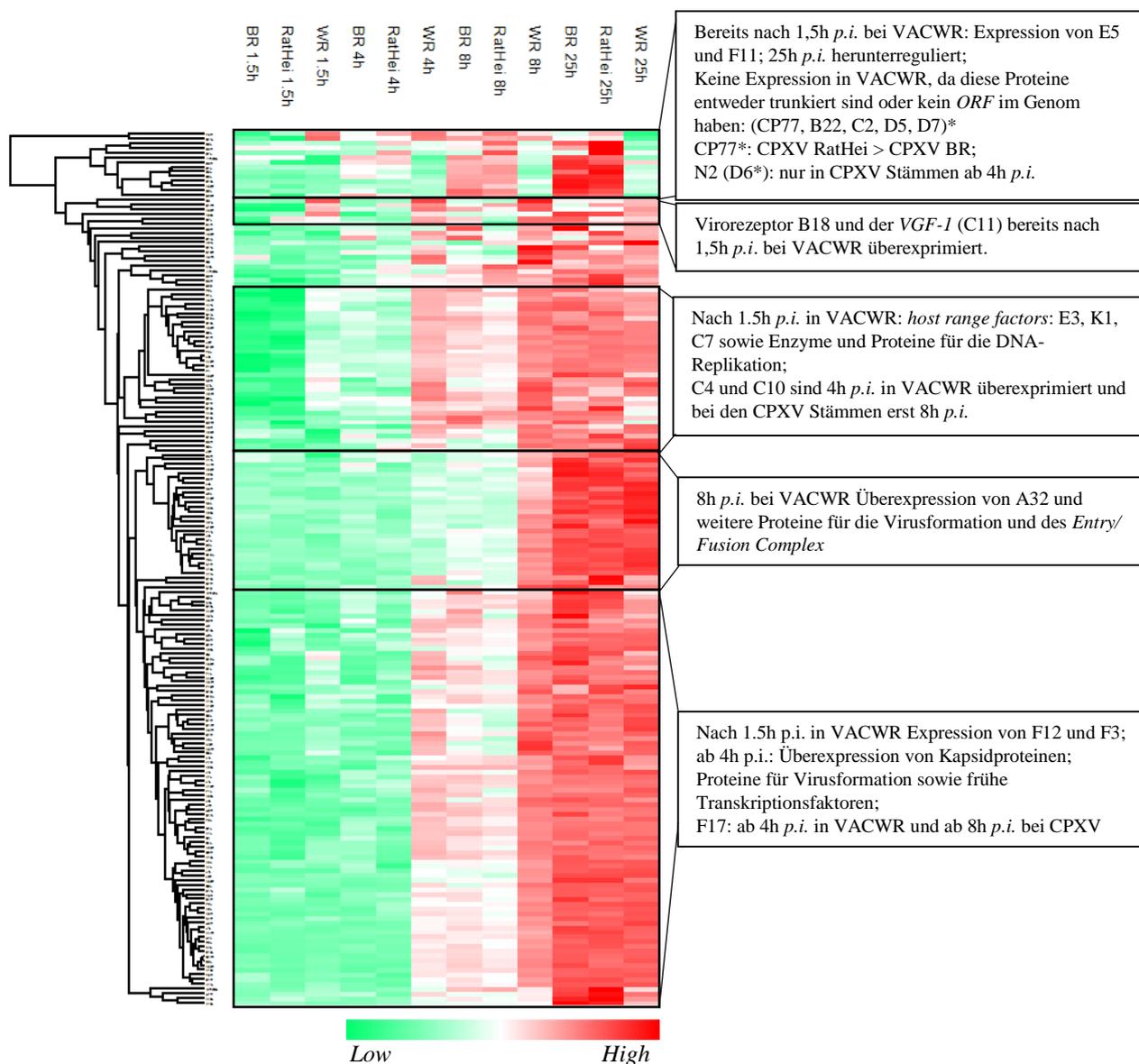
4.6. Virale Proteinexpression

Die Angaben der viralen Proteine basieren auf der Nomenklatur nach VACV Copenhagen, außer bei den Proteinen, die ausschließlich in CPXV exprimiert werden. Hier erfolgt die Angabe nach der CPXV GRI-90 Nomenklatur.

4.6.1. Virale Proteinexpression in den HaCat Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten HaCats 185 virale Proteine über den Infektionsverlauf identifiziert und quantifiziert.

Die exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 4.12). Das Expressionsmuster der viralen Proteine zwischen den Virusspezies unterscheidet sich gravierend in den HaCats. Bereits nach 1,5h *p.i.* werden bei VACWR Proteine für die virale Replikation exprimiert, während bei den CPXV Stämmen diese Proteine erst nach 4h *p.i.* erkennbar sind.



*CPXV GRI-90 Nomenklatur

Abbildung 4.12 Exprimierte virale Proteine in HaCat Zellen

In der Heatmap sind die exprimierten viralen Proteine innerhalb der HaCat Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Es herrschen bereits anfänglich der Infektion gravierende Unterschiede in der Proteinexpression bei VACWR und den CPXV Stämmen in den Keratinozyten.

4.6.2. Virale Proteinexpression in den BJ Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten BJ 177 virale Proteine über den Infektionsverlauf identifiziert und quantifiziert.

Die exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 4.13). Das Expressionsmuster der viralen Proteine in den BJ Zellen zwischen den Viruspezies unterscheidet sich nur minimal. Die CPXV Stämme scheinen in den BJ Zellen gut zu replizieren.

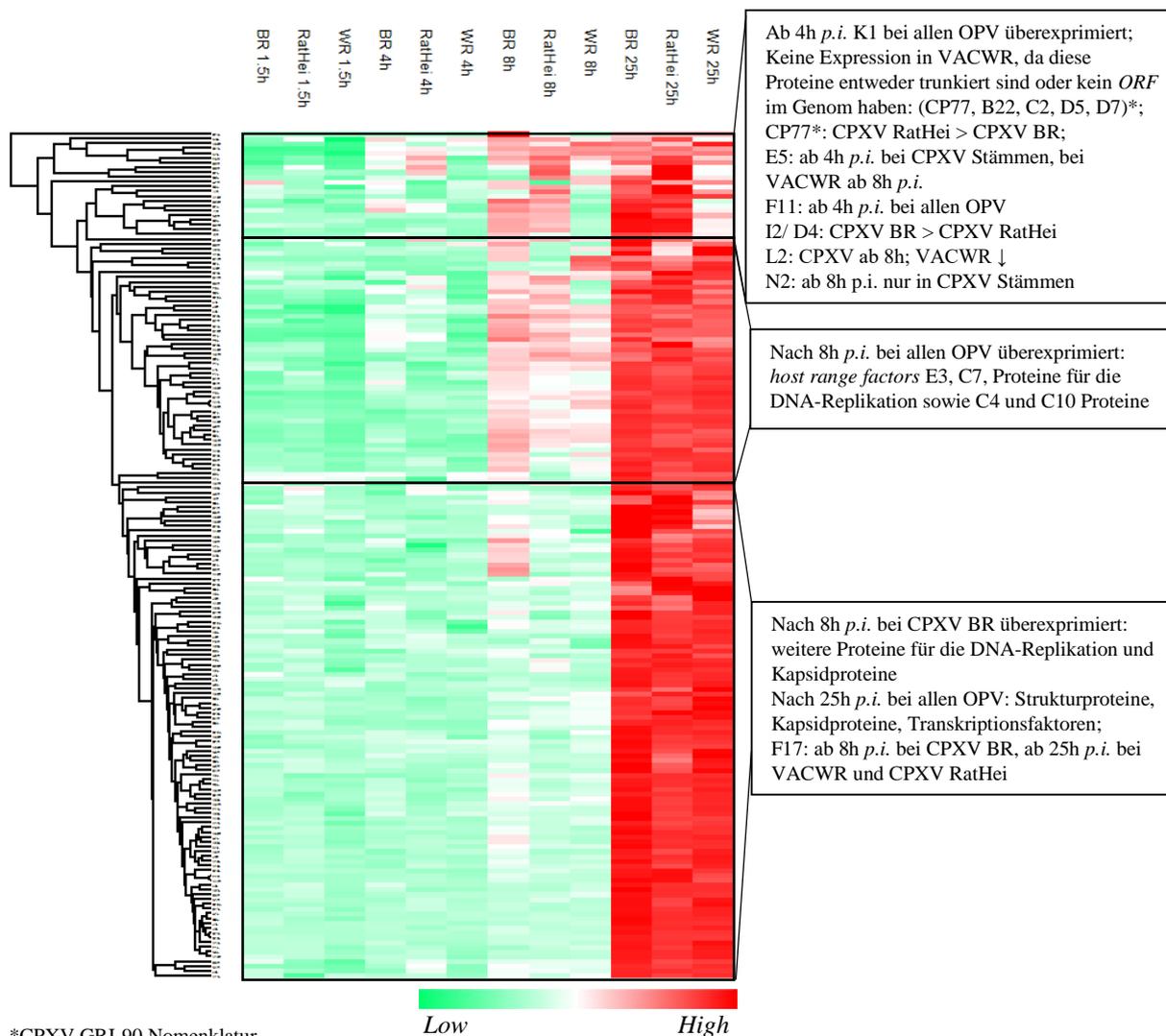


Abbildung 4.13 Exprimierte virale Proteine in BJ Zellen

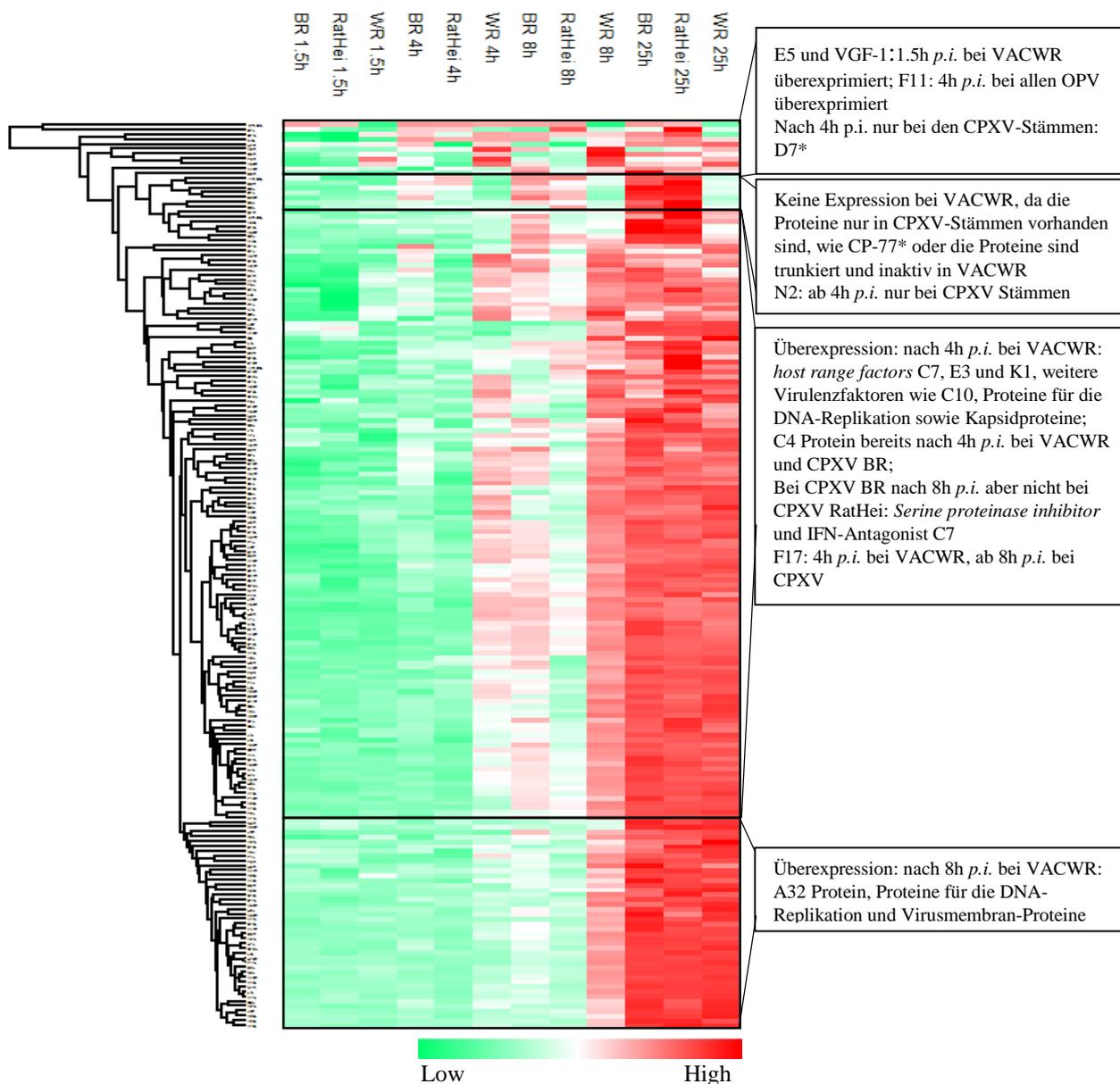
In der Heatmap sind die exprimierten viralen Proteine innerhalb der BJ Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Die Expression der viralen Proteine aller Virusarten verläuft ähnlich.

4.6.3. Virale Proteinexpression in den FR Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten FR 187 virale Proteine über den Infektionsverlauf identifiziert und quantifiziert.

Die exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 4.14).

Das Expressionsmuster der viralen Proteine zwischen den Virusspezies unterscheidet sich gravierend in den FR Zellen. Bereits nach 1,5h *p.i.* werden bei VACWR Proteine für die virale Replikation exprimiert, während bei den CPXV Stämmen diese Proteine erst nach 4h *p.i.* erkennbar sind. Der Expressionsverlauf der viralen Proteine in den FR Zellen hat Ähnlichkeiten mit dem in den HaCat Zellen.



*CPXV GRI-90 Nomenklatur

Abbildung 4.14 Exprimierte virale Proteine in FR Zellen

In der Heatmap sind die exprimierten viralen Proteine innerhalb der FR Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Es herrschen bereits anfänglich der Infektion gravierende Unterschiede in der Proteinexpression bei VACWR und den CPXV Stämmen in den FR Zellen.

4.6.4. Virale Proteinexpression in den Fc3Tg Zellen

Mittels nLC-MS/MS wurden in den OPV infizierten Fc3Tg 189 virale Proteine über den Infektionsverlauf identifiziert und quantifiziert.

Die exprimierten Proteine sind in einer *Heatmap* dargestellt (Abbildung 4.15).

Das Expressionsmuster der viralen Proteine zwischen den Virusspezies unterscheidet sich in den Fc3Tg Zellen. Bei CPXV BR werden die viralen Proteine intensiver exprimiert. Jedoch wird das immunmodulatorische Protein C9 (CP-77) nur bei CPXV RatHei nach 4h *p.i.* exprimiert. VACWR dagegen weist eine schwache Proteinexpression auf.

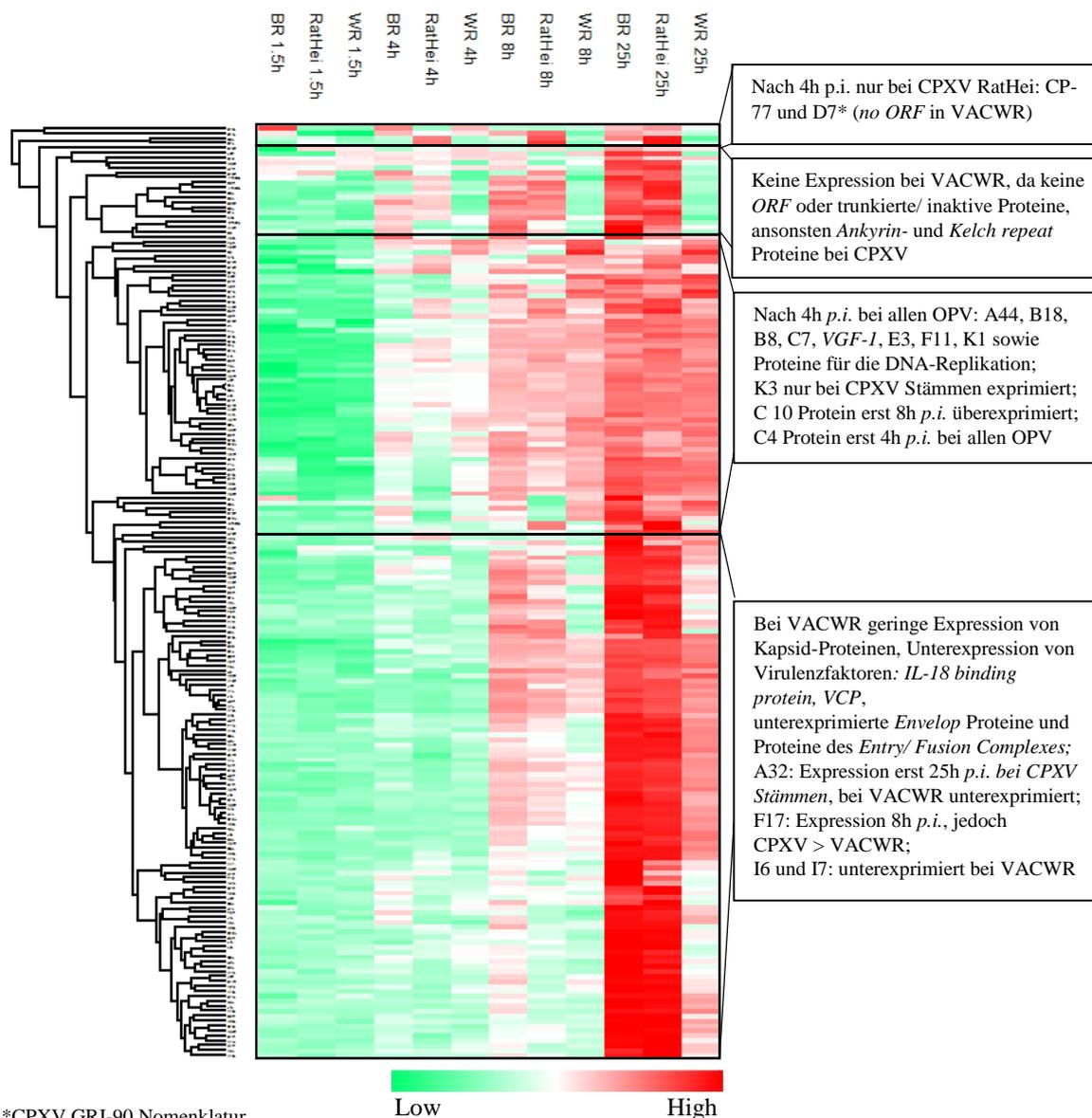


Abbildung 4.15 Exprimierte virale Proteine in Fc3Tg Zellen

In der Heatmap sind die exprimierten viralen Proteine innerhalb der Fc3Tg Zellen über den Infektionsverlauf dargestellt. Es herrschen gravierende Unterschiede in der Proteinexpression bei VACWR und den CPXV Stämmen in den Fc3Tg Zellen innerhalb des Infektionsverlaufs.

In der untenstehenden Tabelle 4.13 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 4.13 Zusammenfassung der Ergebnisse | > stärker/ höher/ besser; ↓keine bis gering; ↑Anstieg/ stärker; = identisch

Analyse	Methode	Zelllinien	OPV
Tropismus/ Permissivität/ Replikation	1. Echtzeitanalyse 2. PQT	1. Keratinozyten > Fibroblasten 2.(humane Zellen = Rattenzellen) > feline Zellen	1. VACV > CPXV 2. CPXV RatHei > CPXV BR <u>Ausnahme:</u> 3. CPXV > VACV in feline Zellen
VACWR infizierte feline Zellen			
Penetration	IFA	CPE – Bildung ↓; Leuchtintensität ↓	
Genomäquivalente	qPCR	CPXV ↑, VACWR: minimaler Anstieg der GE	
Replikationskinetik	EM	<i>Crescents, IVs</i> , abnormale Virusformationen: 24h <i>p.i.</i> = 48h <i>p.i.</i>	
Organ- und Gewebespezifität	Echtzeitanalyse	Keine morphologischen Veränderungen der Zellen erkennbar, welche durch die Infektionen mit VACWR verursacht wurden	
⇒ Abortive Replikation?			
Modulation intrazellulärer Prozesse auf Proteom-Ebene	nLC – MS/MS	<u>Gemeinsamkeiten:</u> 1. Morphologische Veränderungen → CPE ↑ (Ausnahme: VACWR in feline Zellen) <u>Modulierte intrazelluläre Prozesse:</u> 1. Metabolismus 2. Ubiquitin-Proteasom-System 3. Translation 4. Antivirale Antwort: dsDNA- und dsRNA Sensoren, Apoptose <u>Virusspezies-spezifische Muster:</u> 1. Programmierter Zelltod: VACWR > CPXV 2. Virale Replikation in 1. Feline Zellen: CPXV > VACWR 2. Rattenfibroblasten: VACV > CPXV <u>Stammspezifische Muster in Rattenfibroblasten:</u> 1. CPXV RatHei > CPXV BR	

5. Diskussion

In dieser Studie wurden Untersuchungen hinsichtlich Replikationsfähigkeit und Virulenz von VACV und CPXV in a) verschiedenen Zellpopulationen eines Wirts und b) in gleichen Zellarten verschiedener Wirtsspezies durchgeführt. Obwohl beide Virusarten ein breites Wirtsspektrum aufweisen, unterscheiden sich jedoch die Infektionsverläufe im Schweregrad der Hautläsionen. Während CPXV teilweise nekrotische Hautläsionen verursachen, verlaufen die Infektionen mit VACV milder (49,51). Jedoch hängt der Infektionsverlauf nicht nur von der Virusart ab, sondern auch vom Virusstamm, der Virusdosis als auch vom Infektionsweg (100).

Obwohl CPXV ein größeres Genom mit zusätzlichen *ORFs* besitzt, verfügen dennoch beide Virusspezies eine große Auswahl an Virulenzfaktoren, welche ihnen ermöglichen effektiv im Wirt zu replizieren.

Aufgrund des zoonotischen Potentials beider Virusarten und der steigenden Infektionsraten besteht das Risiko der Ausbildung von Viren höherer Pathogenität (103).

5.1. Test auf Permissivität der Zellen für CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR

Charakteristisch für OPV ist die Induktion von morphologischen Veränderungen in permissiven Zellen während der Infektion. Die Ergebnisse der Echtzeitanalysen von OPV-infizierten Keratinozyten und Fibroblasten verschiedener Wirtsspezies zeigen morphologische Veränderungen, jedoch mit unterschiedlicher Entwicklung. Die Infektionen aller drei Fibroblasten-Zelllinien (Abb. 4.1.1 A und 4.1.2 C, D) zeigten unabhängig von der Virusart und dem Virusstamm (Ausnahme: VACWR-infizierten Fc3Tg Zellen) einen nahezu identischen Verlauf: ca. 1-2h nach der synchronen Infektion der Zellen wurden erste phänotypischen Veränderungen registriert, die mit dem Infektionsverlauf fortschritten. Bei den Keratinozyten (Abb. 4.1.1 B) dagegen setzten die morphologischen Veränderungen je nach Virusart später ein als bei den Fibroblasten, jedoch erreichten die HaCats das CI Minimum nahezu zeitgleich mit den Fibroblasten.

Bereits in anderen Studien waren nach 1 bis 2h *p.i.* mit VACV morphologische Veränderungen der Zellen erkennbar (52), es trat sog. *cell rounding* auf. Im Verlauf der Infektion veranlassten die viralen Proteine weitere morphologische Veränderungen der Zellen, um eine möglichst effektive Virusverbreitung zu erreichen (4, 52). Die Zellen werden nicht nur zur Zellmigration befähigt durch Ausbildung von Zellpolarisation, Auflösung von Zell-Zell- und Zell-EZM-Kontakten und zytoskelettale Reorganisation zu Membranprotrusionen, sondern die späten viralen Proteine sorgen für eine verstärkte Aktinpolymerisation zur Ausschleusung von *EEVs* und *CEVs* aus der Zelle (47).

Die Unterschiede in der Ausbildung der CPEs bei VACV - infizierten Keratinozyten und Fibroblasten wurden auch in der Studie bei *Liu et al.* beobachtet (53).

Die Ursache für die Unterschiede in der Ausbildung des Cytopathischen Effekts in den beiden Zellarten könnten einerseits ihre natürliche Organisation und Funktion in der Haut sein. Keratinozyten erfüllen in der epidermalen Schicht eine Barrierefunktion, welche durch hyper-adhesive Desmosomen (54), den Tight junctions sowie den Hemidesmosomen aufrechterhalten wird. Die Annahme besteht darin, dass morphologische Veränderungen bei Keratinozyten später einsetzen, weil die engen und zahlreichen Zell-Zell-Kontakte erst modifiziert werden mussten (47). Die Proteine der Desmosomen wie das Desmocollin, Desmoglein und das Desmoplakin werden in VACWR infizierten HaCats bereits ab 8h *p.i.* herunterreguliert und bei CPXV infizierten HaCats erst zu 25h *p.i.* Fibroblasten sind im Gegensatz zu ihrer ausgereiften Form, den Fibrozyten, in der Dermis mobil und nur mit der EZM in Kontakt. Zusätzlich weisen die Fibroblasten bereits von Natur aus einen ovalen Zellkörper mit irregulären Zellfortsätzen auf, über welche die Fibroblasten auch Zell-Zell-Kontakte eingehen könnten.

In der Publikation von *Joklik* wird die CPE Bildung in zwei Phasen beschrieben: 1-2h *p.i.* äußert die Zelle ihre Veränderung mit einem *cell rounding* und nach der viralen DNA-Replikation und fertigen Virusformation wird die morphologische Veränderung durch Syncytiumbildung vorangetrieben um weitere Zellen zu infizieren (55).

In anderen Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass eine Syncytiumbildung ausbleibt, da eine Zell-Zell-Fusion aufgrund der vorhandenen Viren das weitere Wachstum der Viren unterbinden würde und

die Zellen einer Lyse unterliegen würden. Gegen diesen Effekt schützen sich VACV und CPXV durch den Proteinkomplex aus A56 und K2 (56). Dagegen scheinen Ectromelia Viren und Kamelpockenviren eine Zell-Zell-Fusion zu initiieren (57, 117).

Nun könnte die Annahme entstehen, je schneller der CPE einsetzt, umso höher muss der Titer in den Zellen sein. Diese Annahme kann nicht vollständig bestätigt werden, da der höchste Virustiter in den humanen Keratinozyten (Abb. 4.2 A) über den Infektionsverlauf gemessen wurde. Es herrschen jedoch zwischen den Virusarten Unterschiede im Viruswachstum, welcher einen Zusammenhang zwischen den morphologischen Veränderungen der Keratinozyten und dem Titer erklären könnten: Bei VACWR konnte bereits nach 4h *p.i.* ein Wachstum um 1 Logstufe detektiert werden und nach 8h *p.i.* waren es 4 Logstufen. Bei CPXV waren es nur 2 Logstufen 8h *p.i.* (Abb. 4.2.1 A). Die schnellere Virusformation bei VACWR und der Ausschleusungsprozess könnten die Ursache für schnellere Veränderungen in den Keratinozyten sein. Die Ergebnisse der Proteomanalyse bestätigen die frühere Expression der *Envelopmembran*-Proteine, wie das A36, F12, F13, A33, A34, A56 und B5, in den VACWR infizierten Keratinozyten, welche weitere morphologische Veränderungen initiieren. Während einige *Envelopmembran*-Proteine bereits nach 1.5h *p.i.* in VACWR infizierten HaCats exprimiert wurden, waren in CPXV infizierten HaCats erst zu 4h *p.i.* detektierbar.

Die virale Replikation aller OPV verläuft in den humanen und felines Fibroblasten ähnlich. Erst nach 25h *p.i.* wird eine Virusvermehrung in diesen Zellen gemessen (Abb. 4.2.2 B, D). In den Rattenfibroblasten sind die Virustiter ähnlich denen in den HaCats. Obwohl die Echtzeitzellanalyse von den infizierten Rattenfibroblasten und den Keratinozyten unterschiedlich verlaufen, gibt es dennoch eine Gemeinsamkeit: die morphologischen Veränderungen in den VACWR infizierten Zellen treten schneller ein als bei den CPXV infizierten Zellen (Abb. 4.1.1 A, B). Auch in den Rattenfibroblasten replizieren die VACWR schneller als die CPXV, da der Virustiter nach 4h und 8h *p.i.* bei VACWR um ca. 2 Logstufen höher liegt als bei CPXV (Abb. 4.2.2 C).

Es scheint im Allgemeinen, dass die Virusreplikation in den Fibroblasten weniger begünstigend verläuft als in den Keratinozyten. Jedoch scheinen die Rattenfibroblasten einen optimalen Replikationsort für die Viren zu sein.

In den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen stagniert die morphologische Veränderung ab 8h *p.i.* (Abb. 4.1.2 D) und es wird auch keine Virusvermehrung nach 25h *p.i.* gemessen (Abb. 4.2.2 D). Auch initiiert das VACWR keinen CPE in felines Lungenzellen (AK-D) und Astrozyten (PG-4) (Abb. 4.6). Damit scheinen feline Zellen für VACWR nicht-permissiv zu sein (weitere Diskussion unter 5.2).

Zusammenfassung:

1. VACWR replizieren effektiv in humanen Keratinozyten und Rattenfibroblasten, dagegen langsamer in humanen Fibroblasten und unvollständig bzw. abortiv in Katzenfibroblasten bzw. in felinen Lungenzellen und Astrozyten.
2. CPXV RatHei und CPXV BR replizieren ähnlich in den humanen Keratinozyten, jedoch scheint der RatHei Stamm besser in Rattenfibroblasten zu wachsen als der CPXV BR
3. Die Replikation der OPV scheint in humanen Fibroblasten langsamer zu verlaufen als in den Keratinozyten

5.2. Unvollständige oder gestörte VACWR Replikation in Fc3Tg Zellen

In der retrospektiven Studie von *Galileu Barbosa Costa et al.* wurden Katzenserren auf potentielle VACV Infektionen untersucht (58). Insbesondere in Brasilien werden zunehmende VACV Infektionen in ländlichen Regionen bei Menschen und Kühen beobachtet. Da Katzen eine wesentliche Mitwirkung an der CPXV Übertragung auf den Menschen haben (24, 31), wurde diese Studie durchgeführt, um die potentielle Rolle der Katzen in der VACV Übertragung zu verstehen. Die Studie beinhaltete die Serumanalyse von 277 Katzen, welche zum Zeitpunkt der Serumentnahme keine Symptome aufwiesen. Die Studie ergab, dass in einigen Seren neutralisierende Antikörper existierten, und einige Proben waren positiv auf virale DNA, gemessen an den Genen C11R und A56R.

Infizierte Tiere, die keine Symptome aufweisen, können auch als Vektoren wirken (59) und unbemerkt die Infektionen weitertragen.

In dieser Studie zeigten die VACWR infizierten Katzenszellen ein verändertes Verhalten verglichen mit dem in permissiven Zellen. Bereits die charakteristische morphologische Veränderung der Zellen (Abb. 4.1.2 D) blieb aus und konnte mit dem fehlenden Virustiteranstieg über 25h *p.i.* bestätigt werden (Abb.4.2.2 D). Jedoch ist die Frage zu beantworten, ob die Kinetik der Virusreplikation in diesen Zellen stark verlangsamt oder die Replikation abortiv verläuft. Die Replikation von VACV in permissiven Zellen erfolgt in drei wesentlichen Schritten: 1. Freisetzung des Genoms aus dem Kapsid in das Zytoplasma und Expression früher Gene, 2. nach der DNA-Replikation werden die intermediären Proteine synthetisiert und 3. im Anschluss werden die späten Gene exprimiert, welche die Morphogenese der Viren vorantreiben. Eine langsame Replikation, insbesondere des letzten Schrittes, ist nicht unüblich, da bereits in anderen Experimenten eine Gesamtdauer von 48h für die Virusreplikation gezeigt wurde (2).

Die EM-Aufnahmen (Abb. 4.5.1 - 4) nach 24h *p.i.* und 48h *p.i.* zeigen jedoch nahezu identische Zustände der Virusreifung: zu beiden Zeitpunkten sind sehr viele *Crescents*, *IVs* aber auch zum geringen Anteil *IMVs* sichtbar. Jedoch scheinen die *IVs* und *IMVs* einen abnormalen Zustand aufzuweisen: im Zytoplasma sind DNA-Kristalloide vorzufinden, ein großer Teil der formierten Virionen besitzen leere Kapside oder die Formation von infektiösen Partikeln bleibt aufgrund von fehlenden Kapsidproteinen

aus (36,104). Bereits in anderen Studien wurden Untersuchungen zur Replikation von VACV-Mutanten durchgeführt (36,104). Je nach fehlendem Gen in der Mutante wurden unterschiedliche Abnormalitäten in der Virusreplikation beobachtet: I7 Δ VACV-Mutanten waren nicht in der Lage reife Virionen wegen der fehlenden Kapsidformation auszubilden. Bei der I6 Δ VACV-Mutante wurden DNA-Kristalloide im Zytoplasma entdeckt. Dieses Protein steuert den Einschluss der DNA in die Viruspartikel. Partiell sind auch 48h *p.i.* lysierte Zellen in den EM-Bildern sichtbar.

Die Analyse des viralen Proteoms bestätigt die Ergebnisse der EM-Aufnahmen: die Kapsidproteine sind unterexprimiert, das A32 Protein, welches als ATPase fungiert und den Prozess des DNA-Einschlusses in die Viruspartikeln antreibt (60), ist ebenfalls unterexprimiert. In einer anderen Studie wurde das Vorkommen von Virusformationen mit leeren Kapsiden bei der Verwendung von H4 Δ VACV-Mutanten bestätigt (61). Das H4 Protein ist ein Nucleokapsid-Protein, welches mit der viralen DNA und weiteren Proteinen der Transkriptionsmaschinerie assoziiert vorliegen soll. Dieses Protein ist ebenfalls in den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen unterexprimiert.

Interessant ist aber auch, dass nach 24h *p.i.* noch intakte Kapside im Zytoplasma via EM zu sehen waren. Dies könnte entweder auf eine erschwerte Penetration der Viren in die Zellen hindeuten oder eine gestörte Wechselwirkung mit dem Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) sein. Das UPS ist notwendig für die Freisetzung des viralen Genoms in das Zytoplasma. Hierbei werden weitere Untersuchungen benötigt.

Das F17 Protein erfüllt drei wesentliche Funktionen: 1. Als spätes Protein steuert dieses die Morphogenese der Viren (111), 2. das Protein besitzt immunmodulatorische Funktionen (112, 113) und 3. das Protein sorgt für eine gesteigerte Translation viraler Proteine sowie beeinflusst das metabolische System (112, 113). Punkt 2 und 3 werden durch die Steuerung des mTORs (mechanistic Target of Rapamycin) bewirkt. In den VACWR – infizierten Fc3Tg Zellen ist das F17 Protein über den untersuchten Infektionszeitraum ebenfalls unterexprimiert, so dass die Virusformation der IVs stagniert. Untersuchungen mit F17 Δ VACV – Mutanten bestätigten den Stillstand der Virusmorphogenese (36).

D6 und A7 sind Untereinheiten des frühen Transkriptionsfaktors, welcher mit in das Viruskapsid integriert wird und Bestandteil der viralen Transkriptionsmaschinerie ist. Beide Proteine sind in den VACWR – infizierten Fc3Tg Zellen unterexprimiert. In der Studie von Xiaolu Hu *et al.* wurde gezeigt, dass die fehlende Expression des D6 Proteins anscheinend einen negativen Einfluss auf die Virusmorphogenese hat, wodurch keine infektiösen Partikel formiert werden konnten (115).

Die Abb. 4.16 stellt schematisch die Replikation von VACWR in Fc3Tg Zellen im Vergleich zu einer Replikation in permissiven Zellen dar.

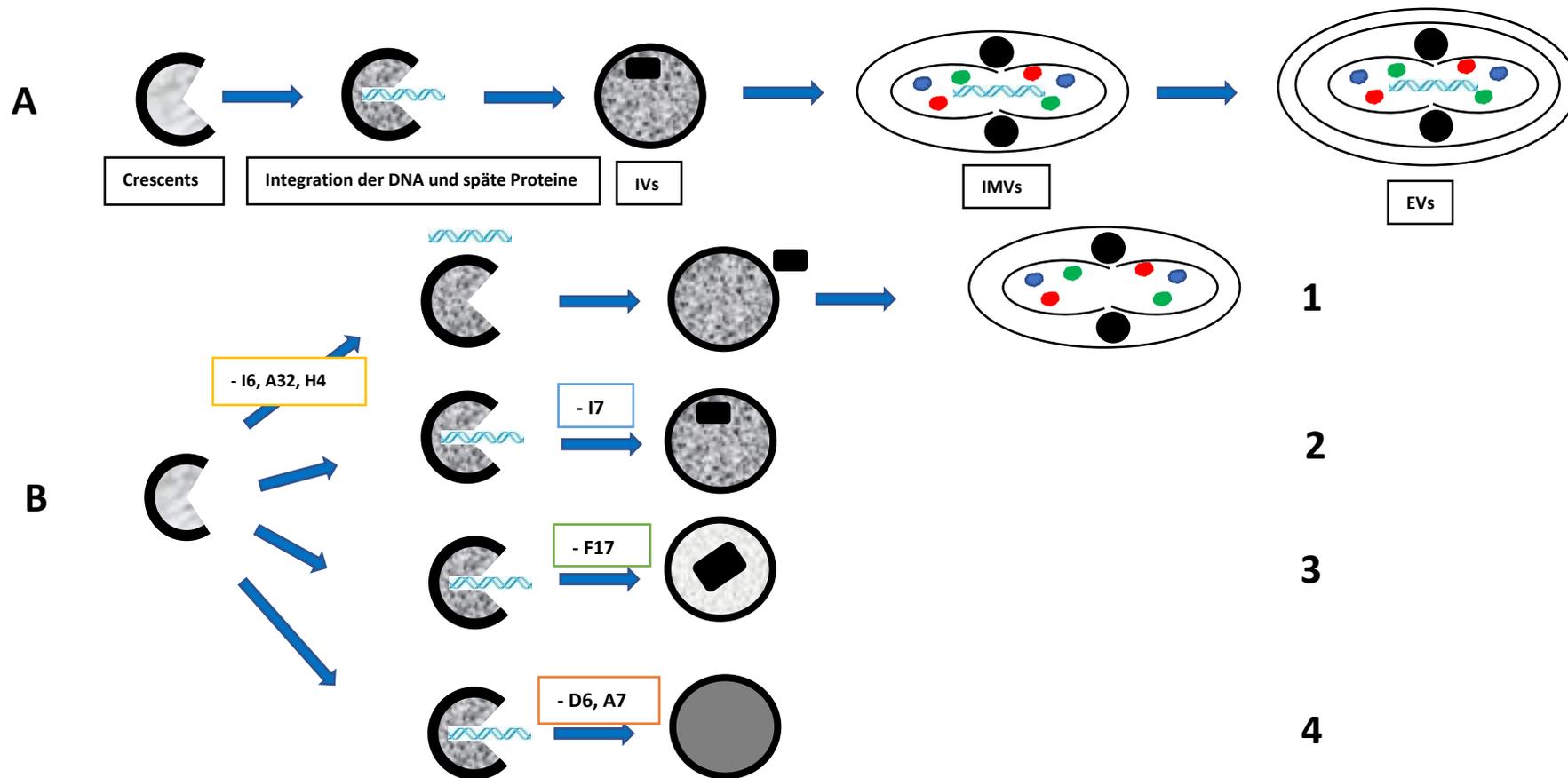


Abbildung 4.16 Schematische Darstellung der VACV Replikation in permissiven Zellen und in Fc3Tg Zellen | Unter **A** ist die Virusreplikation in permissiven Zellen dargestellt: beginnend mit der Ausbildung der *Crescents* über die Formation der *IVs* und *IMVs* bis *EVs*. Unter **B** sind die abnormalen Virusformationen dargestellt, die durch die Unterexpression von I6, A32, H4, I7, F17 und D6 Proteinen entstehen. Diese viralen Proteine sind in den VACWR – infizierten Fc3Tg Zellen unterexprimiert. Bei **1B** bleibt das Kapsid leer aufgrund der unterexprimierten Proteine I6, A32 und H4, die den Einschluss des Genoms in die *IVs* steuern. Dadurch verbleibt die DNA im Zytoplasma. Bei **2B** ist das I7 Protein unterexprimiert, welches die Kapsidformation im *IV* vorantreibt. Das Virus verbleibt im Status des *IV*. Bei **3B** ist das F17 Protein unterexprimiert, welches essentiell für die Virusmorphogenese zu sein scheint. Bei **4B** sind die Untereinheiten des frühen Transkriptionsfaktors unterexprimiert. Dieses Protein scheint auch einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Morphogenese der Viren zu haben.

■ – virale DNA; ● ● ● – späte Proteine: Enzyme, Transkriptionsfaktor

Ein wesentlicher Aspekt für eine effektive Replikation ist die Nutzung des metabolischen Systems der Zelle. Die virale Replikation bedarf eine erhöhte Menge an ATP für die Synthese der viralen Proteine, für die Morphogenese der Viren aber auch für die Aufrechterhaltung der Zelle bis zur Freisetzung der infektiösen Partikel. In anderen Experimenten wurde bestätigt, dass die OPV insbesondere die Fettsäuresynthese (FAS) sowie die nachfolgende β -Oxidation und die Glutaminolyse für eine effektive Replikation benötigen (62, 74). Die Hemmung der Fettsäure-abhängigen ATP-Synthese bzw. Glutaminolyse führt entweder zu einer vollständigen Blockade der viralen Replikation oder sorgt für einen sehr niedrigen Virustiter in den Zellen (62). Während der FAS im Zytoplasma wird Palmitinsäure synthetisiert, welche eine langkettige Fettsäure mit 16 C-Atomen ist. Langkettige Fettsäuren können nur durch aktiven Transport mittels Carnitin-O-Acyltransferase in die Mitochondrien überführt werden. Es ist ein essentieller Schritt, da die β -Oxidation zur ATP Gewinnung ausschließlich in den Mitochondrien abläuft und dabei den Citrat-Zyklus mit Acetyl-CoA auffüllt.

Während die Enzyme FASN (Fettsäuresynthase) und ACC (Acetyl-CoA-Carboxylase) in den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen hochreguliert sind, ist die Carnitin-O-Acyltransferase, spezifisch Carnitin Palmitoyltransferase (CPT 1) bereits ab 4h *p.i.* herunterreguliert. In einer Studie wurde gezielt CPT 1 mit dem Wirkstoff Etomoxir blockiert, weshalb die Replikation von VACV stark abnahm (62). Erst zu 25h *p.i.* ist die FASN in den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen herunterreguliert.

Während diese Viren auf die aerobe Glykolyse vollständig verzichten können, ist die Glutaminolyse für eine effektive Replikation essentiell. Die Glutaminolyse wirkt hierbei als anaplerotische Reaktion und unterstützt den hohen ATP Verbrauch, indem der Citrat-Zyklus mit dem Intermediaten α -Ketoglutarat aufgefüllt wird. Die Palmitinsäure wird aber auch für die post-translationale Modifikation von A33, F13 und B5 benötigt (62). Auch diese Proteine sind nur geringfügig zum Ende der Infektion in den VACWR infizierten felines Zellen exprimiert. Diese Proteine werden während der Formation der *IEV* in die Membran integriert. Das F13 initiiert die Ausschleußung der *EEVs*.

Während die *host range* Faktoren wie das E3 (für die Replikation in HeLa und Vero Zellen (63)), K1 (in RK13 Zellen (63)) und C7 in den VACWR infizierten felines Zellen exprimiert werden, wird das K3 Protein (L929 Mauszellen, BHK Zellen (63)) im Vergleich zu der Expression in den CPXV infizierten Fc3Tg Zellen, unterexprimiert. K3 ist ein immunmodulatorisches Protein, das die dsPKR als Pseudosubstrat inhibiert. Das Protein ist homolog zum *eIF2 α* und verhindert dadurch die Phosphorylierung am Serinrest des *eIF2 α* durch die dsPKR (64). Das K3 dient einerseits zur Aufrechterhaltung des Translationssystems und andererseits verhindert das Protein die Aktivierung des NF κ B Transkriptionsfaktors. Trotz des unterexprimierten K3 Proteins ist das *eIF2 α* in den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen 25h *p.i.* noch exprimiert, während bei den CPXV infizierten Zellen herunterreguliert wird. K7 ist ein effektiver *DDX3* Inhibitor und wird bei den VACWR nach 4h *p.i.* exprimiert.

K3 wird zwar nicht in VACWR infizierten Fc3Tg Zellen exprimiert jedoch in CPXV infizierten Zellen. In allen OPV infizierten humanen Zellen und auch in den Rattenzellen war K3 nicht messbar, entweder,

weil dieses Protein zu wenig exprimiert war und der eingestellte Messmodus in der Tandem-MS nur die in Überfluss vorkommenden Proteine misst oder überhaupt nicht exprimiert wurde. Jedoch scheint die Expression von K3 in den Fc3Tg Zellen relevant für die Replikation zu sein.

CPXV RatHei hat aber weitere *ORFs*, die vermutlich immunmodulatorisch wirken, wie z.B. das D7 Protein. Da aber dieses Protein nicht im BR Stamm exprimiert wird, spielt anscheinend dieses Protein keine Rolle für die virale Replikation in den felineen Zellen.

CP-77 ist ein *host range* Faktor für die CHO Zellen und wird nur in CPXV als aktives Protein exprimiert und nicht in den VACV. Da aber eine Expression von späten Proteinen bei VACWR in Fc3Tg Zellen teilweise gemessen wurde und die frühen Proteine nicht abgebaut wurden wie es in den CHO Zellen erfolgt (65), kann die gestörte Replikation nicht am fehlenden CP-77 liegen. Als weitere Gemeinsamkeit zwischen den CPXV Stämmen ist die Expression des p28 Proteins bzw. C7 Proteins (CPXV GRI Nomenklatur) in den felineen Zellen. VACV kodieren dieses Protein nicht, welches für Ectromelia Viren als *host range* Faktor dient. Nach der Infektion von BGMK Zellen mit VACV wurde 24h *p.i.* in den Zellen Apoptose induziert, da VACV kein p28 synthetisieren (66) und dadurch die Replikation abgebrochen wurde.

Auch das F1 Protein wird unterexprimiert. Dieses Protein hemmt die intrinsische Apoptose. In Studien wurde jedoch nachgewiesen, dass F1 Δ VACV - Mutanten trotz der fehlenden Expression des F1 Proteins attenuiert replizieren können (67).

In der Studie von *Parviainen et al.* wurden feline Plattenepithelkarzinomzellen mit Replikationskompetenten onkolytischen VACV infiziert (Δ vgf Δ tkVACV – Deletion des *Vaccinia Growth Factors* und *Thymidine kinase*) (68). Statt onkolytisch zu wirken, persistierten die Viren über mehrere Wochen in den Zellen und bildeten nur unreife Virionen aus. EM-Aufnahmen dieser Studie zeigten ebenfalls eine unauffällige Virusfabrik und unreife Viren, die in unterschiedlichen Replikationsstatus verharrten, jedoch keine *IMVs* aufwiesen.

In den meisten Wirten findet eine Gewebe- bzw. Organ-spezifische OPV-Replikation statt. VACV können z.B. aufgrund der fehlenden Expression des aktiven CP-77 nicht in CHO Zellen replizieren, jedoch sind BHK-21 Zellen permissiv für VACV (114). Beide Zellarten sind Hamsterzellen. Während die CHO Zellen Epithelzellen aus den Ovarien sind, sind die BHK-21 Zellen Fibroblasten aus der Niere. Deshalb wurde untersucht ob die gestörte Replikation von VACWR spezifisch für die felineen Zungenfibroblasten sei oder in anderen felineen Zellen ebenfalls abbricht. Dabei wurden feline Lungenepithelzellen und feline Astrozyten mit VACWR infiziert und auf ihre Permissivität untersucht (Abb. 4.6). Da auch in diesen Zellen der charakteristische CPE ausblieb, scheint die Replikation in Katzenzellen verlangsamt abzulaufen bzw. abzubrechen.

Da die *Envelopmembran*-Proteine ebenfalls nach 25h *p.i.* herunterreguliert sind, ist das Ausbleiben der weiteren zellverändernden Ereignisse durch die VACV in den Fc3Tg Zellen erklärbar. Die später wieder einsetzende morphologische Veränderung der VACWR infizierten Fc3Tg Zellen (Abb. 4.1.2 D) könnte durch eine einsetzende Zelllyse, welche in der Abb. 4.5.3 I zu sehen ist, bedingt sein.

Zusammenfassung:

1. Die Replikation von VACWR in den feline Zellen verläuft unvollständig bzw. abortiv, da zahlreiche virale Proteine in diesen Zellen unterexprimiert sind. Neben Strukturproteinen sind auch immunmodulatorische Proteine unterexprimiert, wodurch in den Zellen zum Ende der Infektionsuntersuchung der Zelltod (vermutlich Apoptose) induziert wird.
2. Eine Vielzahl an viralen Proteinen wird nicht exprimiert bzw. unterexprimiert und dadurch verbleiben die Viren entweder im unreifen Stadium oder sie scheinen nicht-infektiöse Partikel zu bilden.
3. Eine effektive Virusreplikation hängt vom energetischen Status der Zelle ab. OPV beziehen ATP vermehrt über die β -Oxidation. Jedoch ist das mitochondriale Transfersystem für Fettsäuren in den VACWR infizierten Fc3Tg Zellen unterexprimiert, so dass vermutlich keine effektive Nutzung des Translationssystems erfolgen kann.
4. Diverse feline Zellen scheinen nicht-permissiv für VACWR zu sein, wodurch eine Gewebe- bzw. Organspezifische Replikation auszuschließen ist. Dies wurde in dieser Studie sowie in anderen Studien bereits gezeigt.

5.3. Replikationsfähigkeit der OPV in humanen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten

Die Auswirkung der Viren auf die intrazellulären Prozesse in humanen Hautzellen wurde auf Proteomebene analysiert. Gemeinsam in den beiden Zellarten ist der virale Einfluss auf die Proteine des Zytoskeletts und der Zell-Zell- sowie Zell-EZM-Kontakte. Wie bereits unter 5.1 diskutiert, initiieren VACV und CPXV in allen untersuchten Zellen morphologische Veränderungen, die essentiell für die Virusverbreitung innerhalb des Wirts zu sein scheinen. Unterschiede sind aber in der Modulation der intrazellulären Prozesse vorhanden.

In der Tab. 5.1 sind die Prozesse aufgeführt, die im Infektionsverlauf entweder hochreguliert oder herunterreguliert werden. Interessant ist das Auftreten von gegenteiligen Effekten im Infektionsverlauf als auch die unterschiedlich ablaufenden Prozesse in den mock-infizierten HaCats und dermalen Fibroblasten. Es ist bekannt, dass die beiden Zellarten verschiedene metabolische Prozesse *in vivo* präferieren: Während die Keratinozyten in der Epidermis verstärkt ATP über den anaeroben Weg generieren (69), gewinnen die Fibroblasten ATP über den respiratorischen Weg. Dies hängt damit zusammen, dass die Epidermis nicht genügend mit Sauerstoff versorgt werden kann, da die Blutgefäße der Haut bis einschließlich die Dermis durchziehen. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die Mitochondrien in den Keratinozyten aufgrund des Sauerstoffmangels funktional „mangelhaft“ sind (69). Aber sobald Keratinozyten *in vitro* kultiviert werden, passen sie sich an die Umgebungsbedingungen an und generieren ATP vermehrt über den Fettstoffwechsel (69), während die Fibroblasten die aerobe Glykolyse weiterhin nutzen um Energie zu gewinnen (70).

Dies könnte die Erklärung für die unterschiedlich exprimierten homologen Proteine in den Kontrollzellen sein. Jedoch ändern sich die Präferenzen der verwendeten metabolischen Prozesse in beiden Zellarten mit fortschreitender Infektion.

OPV benötigen während der Replikation eine Unmenge an ATP, um neben der Translation und Morphogenese der infektiösen Partikel, auch die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) aufrechtzuerhalten. Deshalb reprogrammieren die Viren bereits zu Beginn der Infektion das metabolische System: einerseits wird der Fettstoffwechsel gesteigert und andererseits wird über die Glutaminolyse, einer anaplerotische Reaktion, der Citratzyklus mit Intermediaten versorgt (62,74).

Tabelle 5.1 Regulierte intrazelluläre Prozesse während der Infektion mit CPXV Stämmen und VACWR. ↑ Hochregulation; ↓ Herunterregulation; x keine Apoptose; ✓ Hinweise auf eine Initiation einer Apoptose vorhanden

	OPV in HaCats	OPV in BJ
Fettsäuresynthese	↓	↑
β-Oxidation	↓	↑
Glykolyse	↑ (anaerobe)	↓↑
Glutaminolyse	↓	↑
Oxidative Phosphorylierung	↓	↑
Mitochondriale Proteine	↓	↑
Hypoxiezustand	↑	↓
Translation	↑	↓
Proteasom	↑	↓
Apoptose	(✓)*	x

*Apoptose scheint nur Speziesspezifisch initiiert zu werden

Mit fortschreitender Infektion werden Proteine, wie die Carnitin-Palmitoyltransferase, in den VACWR infizierten HaCats herunterreguliert. Dies erklärt die abnehmende ATP- Gewinnung durch die β-Oxidation. Aber auch die nötigen Enzyme, Glutaminase und Glutamatdehydrogenase, für die Glutaminolyse werden in den HaCats parallel zur β-Oxidation herunterreguliert. Stattdessen wird zum Ende des Infektionsverlaufs ATP vermehrt über die anaerobe Glykolyse generiert, dass durch die Überexpression der Laktatdehydrogenase und den Glykolyse-relevanten Enzyme bestätigt wird. Verstärkt wird der anaerobe Weg durch die Stabilisierung des Hypoxie-induzierten Faktors HIF1- α Transkriptionsfaktors in den Zellen, der nur im Falle eines Hypoxiezustands in den Zellen stabilisiert wird (71). Der HIF1- α Transkriptionsfaktor sorgt für die vermehrte Expression von Pyruvat Dehydrogenase (PDH), Glucose Transporter 1(GLUT1) und den Vascular endothelial factor. Dies bewirkt, dass mehr Glukose in die Zelle aufgenommen wird und die anaerobe Glykolyse im Zytoplasma verstärkt abläuft um ATP zu gewinnen. Das gebildete Pyruvat wird dann über die Milchsäuregärung abgebaut. Bei Normoxie wird der HIF1- α Transkriptionsfaktor durch das *human oxygen sensor prolyl-hydroxylase domain containing protein (PHD)2* hydroxyliert und nach der Ubiquitinierung abgebaut (71). Für die Stabilisierung des HIF1- α Transkriptionsfaktors sorgt das virale Protein C10 (VACWR C16) (72), welches das *PHD2* Enzym hemmt und dadurch den Anteil an HIF1- α in der Zelle erhöht. Das C10 Protein wird früh exprimiert und soll bereits vor dem *host shutoff* den HIF1- α Transkriptionsfaktor stabilisieren (71). Das C10 Protein wird bereits nach 1,5h *p.i.* bei VACWR und CPXV BR in den HaCats erhöht exprimiert.

In anderen Studien jedoch wird argumentiert, dass trotz der Stabilisierung des HIF1- α Transkriptionsfaktors keine Marker einer Milchsäuregärung vorliegen (73). Dies könnte auch für die infizierten HaCats zutreffen, da die Laktatdehydrogenase in beide Richtungen katalysiert und somit auch

aus Laktat die Glukoneogenese katalysieren kann. Aber auch die nötigen Hexokinasen für die Aktivierung der Glucosemoleküle werden zum Ende der Infektion herunterreguliert.

Weiterhin werden auch die mitochondrialen Proteine in den infizierten HaCats unterexprimiert, und erklären damit die abnehmende respiratorische Energiegewinnung.

In den dermalen Fibroblasten wird dagegen mit fortschreitender Infektion der Fettstoffwechsel und die Glutaminolyse hochreguliert, wobei erst zum Ende des Untersuchungszeitraums von 25h werden die entsprechenden Proteine überexprimiert gemessen.

Das C10 Protein wird erst nach 8h *p.i.* in den infizierten BJ Zellen exprimiert vorgefunden.

Das C10 Protein soll aber auch einen positiven Einfluss auf die Glutaminolyse haben. Es wurde nachgewiesen, dass Infektionen mit C10 Δ VACV- Deletionsmutanten attenuiert verlaufen, da eine Herunterregulation der Glutaminolyse-Intermediaten festgestellt wurde (73).

Dabei entsteht die Annahme, dass das C10 Protein einen Einfluss auf die beiden Enzyme Glutaminase (GLS) und Glutamindehydrogenase (GDH) nimmt, und mit der Expression des C10 Proteins diese aktiviert bzw. stabilisiert werden.

Da in den dermalen Fibroblasten das C10 Protein erst zu 8h *p.i.* überexprimiert vorliegt und dadurch die Glutaminolyse zum späteren Zeitpunkt hochreguliert wird, erklärt es die verzögerte Virusreplikation in den Fibroblasten.

Eine Hemmung des Fettstoffwechsels sowie die Abwesenheit des exogen zugeführten Glutamins in den Zellen, scheint zu einer Inhibition der VACV Replikation zu führen (62, 73, 74).

Die Abb. 4.17 fasst die Reprogrammierung der metabolischen Prozesse durch die OPV während der Infektion zusammen. Dabei scheinen zwei virale Proteine eine besondere Rolle zu spielen: F17 und C10. Glutamin ist aber auch ein wichtiger Bestandteil des Nukleotidstoffwechsels, da dieser das nötige Stickstoff für die Pyrimidin- und Purinsynthese liefert und dadurch unverzichtbar ist.

Die Fettsäuresynthese hat neben dem energetischen Aspekt noch einen weiteren Nutzen für die OPV. Proteine der *envelopmembrane* wie das A33, B5 und F13 werden für eine korrekte Proteinfunktion mit Palmitinsäure acyliert (62). Weiterhin wird die Myristinsäure, ein Zwischenprodukt in der Fettsäuresynthese, für die Acylierung des G9 Proteins gebraucht, das zu dem *Entry/ Fusion Complex* gehört (75).

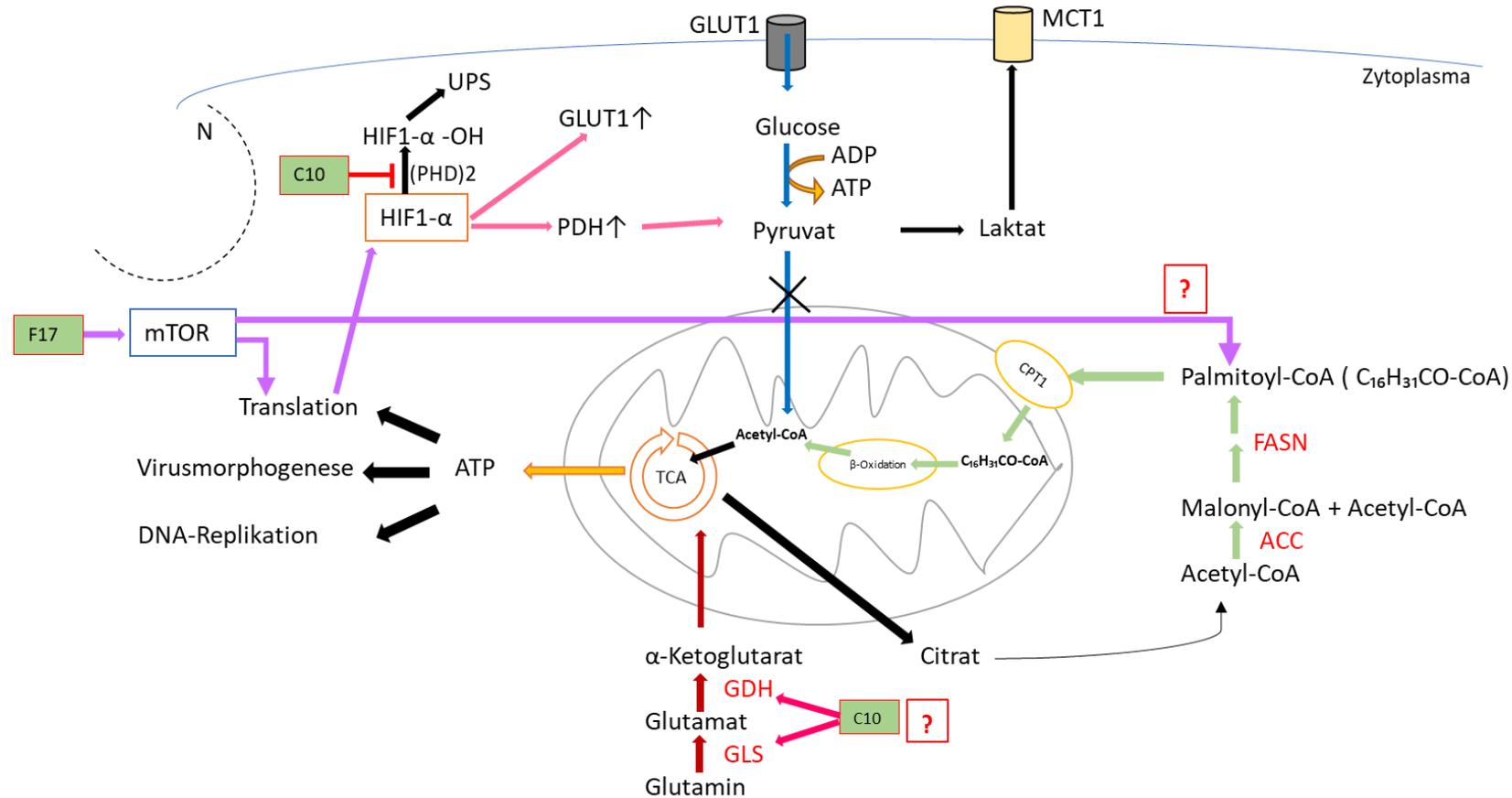


Abbildung 4.17 Reprogrammierung der metabolischen Prozesse durch OPV | OPV programmieren die metabolischen Prozesse der Zellen zum Vorteil der Replikation um, in dem der Lipidstoffwechsel, die Glutaminolyse und die anaerobe Glykolyse hochreguliert werden, um die Translation, die Virusmorphogenese und die DNA-Replikation energetisch ausreichend zu versorgen. Einerseits wird dies ermöglicht durch die Stabilisierung des HIF1- α Proteins, das für eine gesteigerte Expression des GLUT1 sowie der Enzyme der Glykolyse sorgt und dadurch die anaerobe Glykolyse steigert. Das Nebenprodukt Milchsäure wird über den MCT1 (Monocarboxylat-Transporter1) aus der Zelle ausgeschleust. HIF1- α wird durch das C10 Protein stabilisiert und über mTOR wird die Expression des Faktors erhöht. Bei fehlender Stabilisierung wird der HIF1- α Faktor nach der Hydroxylierung durch das PHD2 Enzym über das Proteasom System abgebaut. Andererseits wird durch die Stabilisierung bzw. Aktivierung der GLS und GDH die Glutaminolyse gesteigert (vermutlich durch das C10 Protein), welche als anaplerotische Reaktion den Citratzyklus mit α -Ketoglutarat versorgt. Der Lipidstoffwechsel wird vermutlich über die mTOR Proteine reguliert, welche durch das F17 gesteuert werden. Aus Acetyl-CoA wird mittels ACC und FASN Palmitinsäure gebildet, welche über den aktiven Transporter CPT1 in Mitochondrien aufgenommen wird und über β -Oxidation wieder in Acetyl-CoA abgebaut und in den Citratzyklus überführt wird. Anschließend wird in den Mitochondrien über die oxidative Phosphorylierung ATP gebildet und in das Zytoplasma abgegeben. Die Versorgung des Citratzyklus mit Acetyl-CoA über die Glykolyse wird während der Infektion eingestellt.

Das E3 Protein, welches in den HaCats bereits kurz nach der Infektion (1,5h *p.i.*) gemessen wird und in den BJ erst nach 25h *p.i.*, verhindert die Phosphorylierung des *eIF2 α* Proteins und hält damit das zelluläre Translationssystem aufrecht. Gleichzeitig verhindert das Protein die Aktivierung der antiviralen Immunantwort über die NF- κ B - Signalkaskade.

Durch die Übernahme des zellulären Translationssystems bewirken die OPV den sog. *host shutoff* und reduzieren damit beträchtlich die zelluläre Proteinsynthese (76). Nur ein geringer Teil der zellulären mRNA wird stabilisiert, um für die Virusreplikation die notwendigen Stoffwechselprozesse aufrechtzuerhalten. In der Studie von *Aimei Dai et al.* wurde bestätigt, dass die oxidative Phosphorylierung der Zellen erhöht wird, um die energieverbrauchende Translation der vielen Virusproteine gewährleisten zu können (76).

Aufgrund der frühen Expression des E3 Proteins in den infizierten HaCats wird die virale Replikation gefördert. Auch nach 25h *p.i.* sind die *eukaryotic initiation factors (eIFs)* und die anderen zytosolischen Ribosomproteine noch exprimiert. Dagegen sind die Proteine der Translationsmaschinerie in den BJ Zellen zu 25h *p.i.* unterexprimiert, da vermutlich durch die verzögerte Expression des E3 Proteins in den Fibroblasten die *eIFs* durch Phosphorylierung inaktiviert wurden. Denn in Abwesenheit von E3 Proteinen wird nicht nur das *eIF2 α* Protein phosphoryliert, sondern auch die rRNA wird durch die Aktivierung des 2',5' Oligoadenylatsynthetase/ RNase L-Systems verstärkt abgebaut (78).

Jedoch werden die Proteine für die ribosomale Biogenese zum Ende der Infektion in den BJ Zellen überexprimiert, um vermutlich den anfänglichen Verlust auszugleichen und die Virusreplikation zu steigern.

Während die Mitochondrien in den infizierten HaCats verändert und degradiert werden, bleiben diese in den infizierten BJ Zellen weiterhin stabil und aktiv. Nach 25h *p.i.* sind die mitochondrialen Proteine und Enzyme in den infizierten HaCats unterexprimiert, wie z.B. die ATP Synthase, Ribosomproteine aber auch die drei GTPasen Mitofusin1, Mitofusin2 und das *Dynamin-like 120 kDa protein (OPA1)* sind herunterreguliert. Diese drei GTPasen sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Mitochondrienmorphologie und sind für die mitochondriale *Fusion* zuständig (78). Mit der Herunterregulation dieser Proteine wird die Integrität der Mitochondrien gestört und die metabolischen Prozesse, wie die β -Oxidation und die aerobe Glykolyse, werden reduziert (79). Um den Verlust zu kompensieren, wird verstärkt Glukose in die Zelle eingeschleust, vermutlich durch die Stabilisierung des HIF1- α Transkriptionsfaktors, und ATP wird durch die anaerobe Glykolyse generiert (79).

Die mitochondriale Integrität wird durch den Stress-induzierten MAP-Kinase-Signalweg gestört. Dabei phosphoryliert die *c-Jun N-terminal kinase (JNK)* das Mitofusin2, welches anschließend durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut wird.

Das UPS nimmt eine essentielle Rolle während der viralen Replikation ein, denn die gezielte Hemmung des Proteasoms sorgt für einen Abbruch der viralen Replikation (105). Während die Expression früherer Gene unabhängig vom UPS erfolgt, wird das UPS für den Kapsidabbau benötigt, um das virale Genom im Zytoplasma freizusetzen. Das UPS wird in den OPV infizierten HaCats zum Ende der Replikation

überexprimiert, während in den BJ-Zellen das System herunterreguliert wird. In der Studie von *Rubins et al.* wurde die VACV Replikation in HeLa Zellen und humanen Hautfibroblasten auf Transkriptomebene verglichen. VACV induzieren einen selektiven Abbau von Transkripten von über 2000 Genen, welche u.a. für die Translationsmaschinerie und das Proteasom kodieren (80).

Da aber das UPS aktiv an der Regulation des Apoptoseprozesses teilnimmt und am Ende der Infektion in den HaCats der intrinsisch induzierte Zelltod stattfindet, wäre dies eine Erklärung für die unterschiedliche Regulation des UPS in den beiden Zellarten.

Parallel zu den überexprimierten Proteinen der Translationsmaschinerie in den infizierten HaCats scheint die Proteinqualitätskontrolle am Endoplasmatischen Retikulum (Hsp70 und Hsp90 sind überexprimiert) noch aktiv zu sein, während bei den BJ die Proteinprozessierung herunterreguliert wird. Das E3 Protein erfüllt aber neben dem *host shut off* auch eine immunmodulatorische Funktion. Durch die Inhibition der dsRNA-abhängiger Proteinkinase R (dsPKR) wird auch die Aktivierung von IRF3 – und NF- κ B-Transkriptionsfaktoren verhindert und damit die antivirale Antwort umgangen (81, 82).

Das K3 Protein ist ein weiteres dsPKR-bindendes Protein und wirkt als *eIF2* - Pseudosubstrat. Gleichzeitig agiert das K3 Protein als Wirtsfaktor (*host range factor*), der anscheinend für die Replikation in humanen Zellen nicht benötigt wird (63). Sowohl in den HaCats als auch in den BJ Zellen wurde keine Expression des K3 Proteins gemessen.

Als weiteres intrazellulär wirksames immunmodulatorisches Protein agiert das Poxin bzw. *poxvirus immune nuclease* (B2). Dieses Protein wird bereits nach 1,5h *p.i.* in HaCats exprimiert, während in den BJ Zellen das Poxin erst nach 4h *p.i.* gemessen wird. Poxin sorgt für den Abbau von 2',3'-cGAMP (*cyclic dinucleotide second messenger 2',3' cyclic GMP-AMP*). Das 2',3' cGAMP wird über das cGAS Enzym aktiviert. cGAS agiert als ein sog. DNA-Sensor, welcher freie virale dsDNA im Zytoplasma erkennt und das antivirale Immunsystem aktiviert. cGAS bindet dabei die virale dsDNA und aktiviert dadurch das cGAMP, welches wiederum über *STING* (*stimulator of Interferon genes*) die IRF3- und NF- κ B Transkriptionsfaktoren aktiviert (83). Poxin ist ein essentieller intrazellulärer Virulenzfaktor *in vivo*, denn die Abwesenheit des Proteins führt zu einer abgemilderten Replikation. Eine dermale Infektion von Mäusen mit Poxin-Deletionsmutanten führte zu einer ca. 40-fach geringeren Replikation verglichen mit der Infektion mit dem VACV-Wildtyp (84).

OPV sind DNA-Viren, die in der perinukleären Region replizieren. Das Genom wird im Zytoplasma in den Virusfabriken synthetisiert und ist dadurch der DNA-Proteinkinase (dsDNA-PK) zugänglich, da die DNA-PK mit den Virusfabriken co-lokalisiert ist (82).

Die DNA-PK ist ein Proteinkomplex, welcher aus den Ku70, Ku80 und der katalytischen Untereinheit DNA-PK_{cs} zusammengesetzt ist. Alle drei Proteine sind fähig die zytosolische dsDNA zu binden. Jedoch bei Abwesenheit von Ku-Proteinen wird die Bindungsaffinität der DNA-PK_{cs} zur DNA stark reduziert (82, 85). VACV sowie die CPXV exprimieren deshalb zwei frühe Proteine, die eine direkte Bindung mit dem Ku70/Ku80 Heterokomplex der DNA-PK eingehen (86). Beide Proteine C4 und C10 (sowie die homologen Proteine der CPXV) weisen die gleiche Bindungsstelle im Komplex auf (87). Durch die

Bindung der Proteine an die Ku-Proteine, wird die Bindungsaffinität der DNA-PK_{cs} Untereinheit zur viralen DNA reduziert und die antivirale Antwort wird dadurch umgangen.

Die beiden viralen Proteine verhalten sich jedoch je nach Infektionsweg unterschiedlich. Während bei respiratorischer Infektion mit VACV die Proteine nicht redundant wirken und bei Abwesenheit eines der beiden Proteine die Virulenz sinkt, ist das Fehlen eines der beiden Proteine bei intradermaler Infektion vernachlässigbar (86,87). Die fehlende Expression von Protein C10 und/ oder C4 in den Lungen veranlasst eine Überexpression von Chemokin Cxc110 und dem Interleukin-6 und begünstigt damit die Infiltration von Leukozyten (86,87). Beide Proteine agieren multifunktionell in der Zelle. Während das C10 Protein auch den Stoffwechselprozess beeinflusst, inhibiert das C4 Protein den NF- κ B induzierten antiviralen Signalweg (86). Experimentelle Studien mit C10 Δ C4 Δ VACV-Mutanten bestätigten, dass das C4 Protein nicht nur die Infiltration von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und NK-Zellen inhibiert, sondern auch die Aktivierung und Rekrutierung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (86). Das C10 Protein wird in VACWR infizierten HaCats bereits nach 1.5h *p.i.* exprimiert und nach 4h *p.i.* ist C10 in CPXV infizierten HaCats exprimiert. Die Expression des C4 Proteins wird dagegen nach 4h *p.i.* bzw. 8h *p.i.* gemessen. Dabei wird die katalytische Untereinheit der DNA-PK mit dem Infektionsverlauf herunterreguliert.

In den BJ Zellen wird jedoch zuerst das C4 Protein exprimiert und hemmt dadurch früh die antivirale Antwort. Das C10 Protein wird jedoch erst zu 25h *p.i.* detektiert. Dies könnte eine Erklärung für die verminderte bzw. verspätete Virusreplikation in den humanen Fibroblasten sein, da durch das fehlende C10 Proteine zu Beginn der Infektion die Modulation des Stoffwechselprozesses ausbleiben bzw. verlangsamt zu sein scheint. Interessant ist, dass die DNA-PK Untereinheit in den BJ mit dem Infektionsverlauf überexprimiert wird. Die DNA-PK erfüllt zwei Funktionen in den Zellen: einerseits bindet die katalytische Einheit den DNA-Bruch bei dsDNA und repariert diesen über den sog. non-homologous end joining (NHEJ) und andererseits dient der Komplex als dsDNA-Sensor im Zytoplasma mit nachfolgender Aktivierung des angeborenen Immunsystems (86).

Das F17 Protein wird in den VACWR infizierten HaCats ab 4h *p.i.* bzw. in CPXV infizierten HaCats ab 8h *p.i.* überexprimiert, während in allen OPV infizierten BJ Zellen das Protein erst ab 25h *p.i.* hochreguliert vorliegt. Dieses Protein, hochkonserviert in allen OPV, weist nicht nur immunmodulatorische Funktionen auf, sondern steigert auch die virale Translation zusätzlich zu dem *host shutoff* (112). Beide Prozesse reguliert das F17 Protein über die Steuerung des mTORs (112). Einerseits blockiert das F17 die Proteine Raptor und Rictor, welche als Kontrollsubstrakte in den mTOR Komplexen funktionieren, um dadurch die Aktivität der mTOR Kinase zu steigern und die virale Proteinsynthese zu maximieren. Andererseits wird durch die reduzierte Bildung der beiden mTOR Komplexe, mTORC1 und mTORC2, das Gleichgewicht zwischen den Komplexen gestört, wodurch der *cGAS-STING pathway* durch unkontrollierten Abbau von *cGAS* gedämpft wird (112,118). Die Viren haben aber auch die Fähigkeit in zwei Phasen die Expression der *Rac -alpha serine/ threonine protein kinase (Akt1)* hochzuregulieren: 1. Direkt nach dem Eindringen der Viren in die Zellen wird über

Integrin-Rezeptoren der *PI3K-Akt pathway* aktiviert und 2. während der Replikation (118). *Akt1* sorgt für die Aktivierung der mTOR Proteine, welche z.B. metabolische Prozesse, wie den Lipidstoffwechsel oder die anaerobe Glykolyse aktivieren, aber auch einen Einfluss auf die Zellproliferation nehmen und immunmodulatorische Funktionen innerhalb der Zellen erfüllen (119, 120). Während das *Akt1* Protein in den OPV infizierten HaCats hochreguliert wird, wird dieses Protein in den OPV infizierten BJ Zellen herunterreguliert. Vermutlich steigert die verstärkte Expression der mTOR Proteine und die Übernahme der Steuerung über diese Proteine durch die OPV den Lipidstoffwechsel während der Infektion.

Die Abb. 4.18 fasst die Vermeidung der Aktivierung der zellulären Immunantwort durch die OPV zusammen. Dabei bedienen sich die Viren der zahlreichen immunmodulatorischen Proteine, die die zellulären DNA- und RNA-Sensoren blockieren.

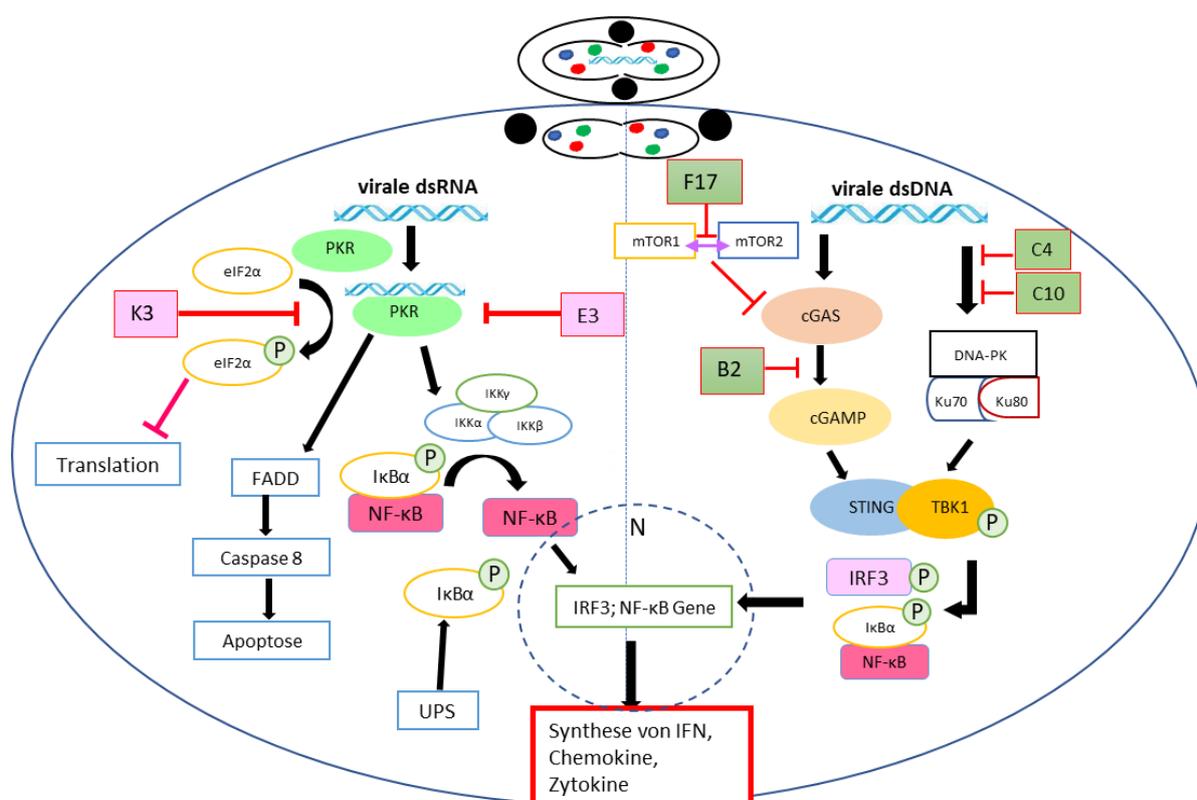


Abbildung 4.18 Umgehung der antiviralen Antwort der Zelle durch die Expression von immunmodulatorischen Proteinen OPV exprimieren eine Vielzahl an immunmodulatorischen Proteinen. Da OPV im Zytoplasma replizieren, ist das virale Genom den sog. DNA-Sensoren der Zelle zugänglich, die durch Bindung der dsDNA kaskadenartig die antivirale Antwort induzieren. Über den *cGAS-STING pathway* sowie *DNA-PK-STING pathway* werden die IRF3 und NF-κB Transkriptionsfaktoren aktiviert, welche für die Synthese der Interferone, Chemokine und weiterer Zytokine sorgen. Das B2 Protein hemmt die Aktivierung des cGAMP und die Proteine C4 und C10 hemmen die Bindung des Genoms an die DNA-PK. Das F17 Protein zerstört das Gleichgewicht zwischen den beiden mTOR Komplexen. Dadurch wird der *cGAS-STING pathway* inaktiviert, weil das cGAS abgebaut wird. Während der Transkription der viralen Gene können auch als Fehlbildung dsRNAs entstehen. Dadurch wird die dsPKR (RNA-Sensor) aktiviert, welcher die dsRNA bindet und einerseits den NF-κB Transkriptionsfaktor aktiviert und andererseits Apoptose in der Zelle induziert. OPV können sich davor durch die Expression der E3 und K3 Proteine schützen. Das K3 Protein agiert als eIF2α Pseudosubstrat und verhindert einerseits die Aktivierung der antiviralen Antwort und andererseits die Herunterregulation der Translation viraler Proteine. Das E3 Protein verhindert die Aktivierung der dsPKR.

dsPKR – dsRNA-abhängiger Proteinkinase R; N - Nucleus

Zusammenfassung:

1. In OPV infizierten HaCat Zellen sind die Proteintranslation sowie die Proteinprozessierung noch aktiv. Während dieser Prozess in den HaCats durch anaerobe ATP Gewinnung versorgt wird, werden die OPV infizierten Fibroblasten noch durch die respiratorisch gewonnenen ATP unterstützt.
2. Die verspätete Expression des E3 Proteins in den Fibroblasten könnte für die Unterexpression von Translationsproteinen und den Abbau von ribosomalen Proteinen verantwortlich sein, wodurch die Replikation verlangsamt stattfindet. Aber auch die Expression von F17 zu 25h *p.i.* könnte ein Hinweis für die verspätete Umprogrammierung der metabolischen Prozesse, wie den Lipidstoffwechsel, sein. F17 scheint ebenfalls ein wichtiger Virulenzfaktor zu sein.
3. C4 und C10 Proteine sind essentielle Virulenzfaktoren, weil diese beiden Proteine multifunktionell agieren. Zudem sind beide Proteine in OPV konserviert.
Je nach Zellart und Virus wurden beide Proteine zeitlich unterschiedlich exprimiert. Diese Tatsache könnte sich auf die Kinetik der Virusreplikation auswirken.
4. Die Replikation von OPV benötigt viel Energie. Um schnell, viel und effizient ATP zu synthetisieren, beziehen die Viren diese über den Fettstoffwechsel und Glutaminolyse.
Eine Hemmung der Glutaminolyse und des Fettsäurestoffwechsels beeinflussen negativ die Virusreplikation.
5. In OPV infizierten HaCats ist der Energiestoffwechsel bereits zu Gunsten der Viren moduliert. Das C10 Protein zur Stabilisierung des HIF1- α Transkriptionsfaktoren ist in den Zellen bereits kurz nach der Infektion überexprimiert.
6. In CPXV infizierten HaCats wird das C10 Protein zum späteren Zeitpunkt exprimiert, so dass die Virusvermehrung erst zum späteren Zeitpunkt erhöht gemessen wurde.
7. In den Fibroblasten wird das C10 Protein verspätet exprimiert. Dadurch wird das benötigte ATP erst zu späterem Zeitpunkt für die Translation und andere Prozesse der viralen Replikation bereitgestellt.

5.3.1. Speziesspezifische Unterschiede in den HaCats

Während der Infektion mit OPV in HaCats können Spezies-spezifische Unterschiede beobachtet werden, trotz des *in vitro* Modells. Dabei replizieren VACWR effizienter als die CPXV Stämme, jedoch gleichen sich die Titer am Ende der Infektionsuntersuchung an. Spezies-spezifische Unterschiede sind insbesondere in der schnelleren Expression der modulatorischen Proteine bei VACWR im Vergleich zu den CPXV Stämmen zu sehen. Die Ursache für die effiziente Replikation in HaCats sei vermutlich die Adaptation des Western Reserve Stamms in humanen Zellen durch mehrfaches Passagieren (88).

Doch Unterschiede scheinen auch in der Lyse der Zellen zu liegen. Entsprechend der Daten der Proteomanalyse scheinen VACWR eine Apoptose auszulösen, während die CPXV Stämme mehr zu einer Nekroptose tendieren könnten.

Während in VACWR infizierten HaCats die mitochondrialen Proteine und damit die oxidative Phosphorylierung herunterreguliert werden, werden im Zytoplasma pro-apoptische Proteine überexprimiert. BAX, ein Protein aus der Bcl-2 Familie, das die Apoptose induziert, wird bereits nach 4h *p.i.* in VACWR infizierten HaCats gemessen und steigt mit weiterem Infektionsverlauf an. Durch die Herunterregulation von Mitofusin bei allen OPV in HaCats, wird die mitochondriale Integrität gestört und das Cytochrom C wird verstärkt in das Zytoplasma freigesetzt und abgebaut.

PARP1 (Poly-(ADP-Ribose) -Polymerase) wird mit fortschreitender Infektion herunterreguliert. Das Enzym ist u.a. für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich. Durch Caspase 1 und 3 wird das Enzym abgebaut (89). Caspase 3 wird 8h *p.i.* in VACWR – infizierten HaCats überexprimiert, während in den CPXV infizierten HaCats keine Veränderung in der Expression von Caspase 3 erfolgt. Auch CDK1 wird in den VACWR infizierten HaCats überexprimiert und dient als Marker für Apoptose (90). Die E3 Ubiquitin-Protein Ligase MARCH5 ist in den Mitochondrien lokalisiert und spielt eine wesentliche Rolle in der Morphologie der Mitochondrien. Das Protein wird in allen OPV infizierten HaCats unterexprimiert, wodurch die Fragmentierung von Mitochondrien induziert wird (91,92).

Das *Oxygen-regulated Protein* bzw. *Hypoxia regulated protein (ORP)* ist in allen OPV infizierten HaCats unterexprimiert. *ORP* ist ein *heat shock protein*, welches unter hypoxischen Zuständen die Apoptose inhibiert (93). Da aber in OPV infizierten HaCats zum Ende des Untersuchungszeitraums die anaerobe Glykolyse abläuft und das *ORP* herunterreguliert wird, könnte dies ein weiterer Hinweis für die Induktion von Apoptose sein. Auch die Verminderung der DNA-PK in den OPV infizierten HaCats ist ein Hinweis für einsetzende Apoptose (94).

Doch was spricht gegen die Apoptose in den CPXV infizierten HaCats? Die Nekroptose ist eine Rezeptor-induzierte Form der Nekrose und verläuft vollkommen unabhängig von Caspaseproteinen (95). In weiteren Experimenten sollte die Caspaseaktivität in den VACV – und CPXV infizierten HaCats untersucht werden, um die Induktion der Apoptose zu bestätigen.

In den OPV infizierten dermalen Fibroblasten sind keine pro-apoptischen Proteine überexprimiert.

5.3.2. Stammspezifische Unterschiede in CPXV infizierten HaCats

Obwohl CPXV RatHei *open reading frames (ORF)* im Genom hat, die nicht bei CPXV BR vorkommen, wie das D7L oder das D5L, replizieren beide nahezu identisch in den HaCats. Unterschiede werden jedoch in der Echtzeitanalyse von CPXV infizierten HaCats beobachtet wie bereits unter Punkt 5.1 diskutiert.

Das CP77 Protein wird bei CPXV RatHei höher exprimiert als bei CPXV BR als auch das D7 ähnliche Protein (92% Identität zu D7 Protein von CPXV GRI-90) (96), welches ausschließlich bei CPXV RatHei exprimiert wird.

Da beide Stämme einen recht hohen Virustiter zum Ende des Infektionszeitraums aufweisen, wird davon ausgegangen, dass die exprimierten Proteine der zusätzlichen *ORFs* bei CPXV RatHei keinen wesentlichen Einfluss auf die Virulenz in *in vitro* Modellen ausüben.

5.4. Replikation von OPV in Rattenzellen

Ratten und andere Nagetiere, insbesondere Feldmäuse, wirken nicht nur als Überträger von CPXV und VACV Infektionen auf andere Tiere und Mensch, sondern scheinen auch natürliche Reservoirs für beide Virusarten zu sein (97,98,99).

Die Infektionen in FR Zellen zeigten ähnliche Veränderungen im Expressionsmuster der homologen Proteine wie in allen anderen Fibroblasten im Verlauf der Infektion. Jedoch gleicht die virale Replikation und das Expressionsmuster der viralen Proteine sehr denen in HaCats. In den Rattenfibroblasten werden nicht nur Spezies-spezifische, sondern auch Stamm-spezifische Unterschiede sichtbar.

Während VACWR und CPXV RatHei in den FR Zellen nahezu identische Virustiter zu jedem Zeitpunkt wie in den HaCats aufweisen, divergiert der Titer von CPXV BR und weist um ca. 2 Logstufen geringeren Virustiter auf als CPXV RatHei.

Bereits in Tiermodell-Studien mit Wistar-Ratten wurden Unterschiede in Virulenz und Replikation zwischen CPXV BR und einem CPXV Isolat aus Ratten (CPXV RatPox09) nachgewiesen. Obwohl der RatPox Stamm und der RatHei Stamm phylogenetisch unterschiedlich sind (100), besitzen jedoch beide Stämme *ORFs* für Proteine (D5L, D7L) (96), welche nicht vom BR Stamm exprimiert werden. In den Studien wurden jedoch keine Unterschiede in der Replikation zwischen RatPox und BR in *in vitro* Modellen sichtbar (100).

Während die Infektion mit CPXV BR in den Wistar-Ratten mild verlief, zeigten die Infektionen mit dem RatPox Stamm schwerwiegende Verläufe (100).

Auch in der Studie von *Tamošūnaitė, Aistė* wurden Wistar-Ratten einerseits mit CPXV RatPox09 und CPXV BR Wildtypen infiziert als auch mit rekombinanten CPXV BR. Dabei wurden die Gene für das *NMDA receptor-like* Protein (D5) als auch für das CrmE Protein in den CPXV BR Stamm integriert. Infektionen mit den rekombinanten CPXV BR zeigten eine erhöhte Pathogenität vergleichsweise mit dem CPXV BR Wildtyp, jedoch immer noch nicht vergleichbar mit der Pathogenität ausgelöst durch

den RatPox Stamm (96). Weiterhin wird vermutet, dass die Kombination aus beiden Genen und/ oder weiteren Genen wie dem D7 und *7tGP-like Protein* die Pathogenität des RatPox Stamms erhöhen. Diese vier Gene sind im BR Stamm entweder abwesend oder durch ein frühes *Stop-Codon* im Gen inaktiviert (96, 100).

Das D5 und D7 Protein werden in CPXV RatHei infizierten FR Zellen exprimiert. Vermutlich erfüllen beide Proteine immunmodulatorische Funktionen und sorgen für die höhere Pathogenität in den FR Zellen. Die Ähnlichkeit der VACWR Replikation in FR Zellen zu der in den HaCats besteht nicht nur in dem Virustiter, sondern auch partiell in dem zellulären Expressionsmuster. Während die Proteine des Proteasoms, der Glutaminolyse und der Glykolyse in den CPXV infizierten FR Zellen herunterreguliert werden, bleiben diese Proteine in den VACWR infizierten FR Zellen konstant.

Der RatHei Stamm ist ein CPXV Isolat aus Ratten. Es wird vermutet, dass aufgrund von aufeinanderfolgenden natürlichen Passagen zwischen den Ratten dieser Stamm auf Ratten adaptierte und virulenter wurde, vergleichbar zum RatPox Stamm (100).

In VACWR gibt es kein *ORF* für das D7 Protein, jedoch kodieren die Viren ein homologes Protein zu dem D5 Protein. Es zeigt eine 98%ige Identität mit dem *Vaccinia Golgi anti-apoptotic protein* (VACV GAAP). Dies könnte der Grund für eine ähnliche Replikation von VACWR und CPXV RatHei in den FR Zellen sein.

Zusammenfassung:

1. CPXV RatHei ist virulenter als das CPXV BR in den FR Zellen, vermutlich aufgrund der zusätzlich exprimierten Proteine durch den RatHei Stamm.
2. VACWR repliziert effizienter als die CPXV in den FR Zellen, aber die VACWR scheinen die zellulären Prozesse in den FR Zellen geringer negativ zu beeinflussen um vermutlich dadurch weniger Schaden im umliegenden Gewebe anzurichten.
3. Das D5 Protein bzw. VACV-GAAP scheinen einen wesentlichen Einfluss auf die Replikation von CPXV RatHei und VACWR in FR Zellen zu nehmen.

6. Fazit und Ausblick

Natürliche Infektionen mit CPXV und VACV verlaufen unterschiedlich pathogen. Während CPXV Infektionen teilweise nekrotische Hautläsionen ausbilden und über mehrere Monate ausheilen, entwickeln natürliche VACV Infektionen Pustel-artige Läsionen aus.

In dieser Studie wurde bestätigt, dass die Virusspezies kinetisch unterschiedlich replizieren und, dass beide Virusspezies effektiv in Epithelzellen wachsen. Zwischen den CPXV Stämmen konnten jedoch keine Differenzen im Virustiter gemessen werden. Auch in Studien, in denen 3D Hautmodelle zur Analyse der Pathogenese von CPXV BR und CPXV RatPox09 verwendet wurden, konnten zwar keine Unterschiede in Replikation beider Stämme detektiert werden, jedoch ergaben histologische Untersuchungen, dass die Viren bevorzugt in Keratinozyten replizieren (40,96). Beide Stämme wiesen jedoch nicht nur ähnliche Titer auf, sondern zeigten am Infektionsende typische Anzeichen einer Nekrose.

VACV sind bekannt in einigen Zelllinien am Ende der Infektion eine Apoptose zu induzieren, um die MVs freizusetzen, und minimieren damit den Schweregrad der Infektion (90).

Obwohl VACWR im Vergleich zu CPXV schnell und effektiv in den Epithelzellen replizieren, wurde scheinbar dennoch in den VACWR infizierten Zellen Apoptose induziert. Damit scheint die hier durchgeführte experimentelle Studie den milden Verlauf natürlicher Infektionen mit VACV zu bekräftigen.

Auf molekularbiologischer Ebene konnten Unterschiede zwischen den Virusspezies bestätigt werden, jedoch nur geringfügig zwischen den CPXV Stämmen.

Dagegen scheinen die Fibroblasten die Replikation der OPV kinetisch zu verlangsamen und weisen am Infektionsende geringere Titer auf.

Die Analyse der Expression homologer Proteine zwischen den infizierten Zellen ergab ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster zwischen Keratinozyten und Fibroblasten, auch bereits im nicht-infizierten Zustand. Während die Fibroblasten die metabolischen Prozesse unter Kultivierungsbedingungen nutzen wie in *in vivo* Modellen, sind diese in Keratinozyten unter *in vitro* Bedingungen den Umgebungskonditionen angepasst (69). Auch werden teilweise andere Proteine unter Kultivierungsbedingungen produziert und freigesetzt (43).

Deshalb sollten weitere Untersuchungen in komplexerer Zusammensetzung durchgeführt werden, da dabei aufgrund der vorhandenen Kommunikation zwischen den Zellen neue Erkenntnisse gewonnen werden können. Da bereits in anderen Studien 3D Modelle für Pathogenitätsanalysen genutzt wurden und darauf basierend Transkriptomunterschiede festgestellt werden konnten (101), sollten im weiteren Verlauf Analysen auf Proteomikbasis nicht nur in den Keratinozyten durchgeführt werden, sondern auch in den Fibroblasten.

Da OPV auf die metabolischen Prozesse der Zelle angewiesen sind, insbesondere auf den Fettstoffwechsel, sollten auch in 3D Modellen Untersuchungen auf Metabolitebene stattfinden. Weiterhin wäre interessant zu analysieren welche viralen Proteine für die Steigerung des

Fettstoffwechsels verantwortlich sind. Auch sollte das Augenmerk auf die Umprogrammierung der mTOR Proteine durch das F17 Protein während der Infektion gelegt werden.

Besonders hervorzuheben sind die multifunktionellen viralen Proteine C4 und C10. Beide steuern partiell gleiche sowie unterschiedliche intrazelluläre Prozesse. Die Abwesenheit beider Proteine in Mutanten ergab die Bildung von attenuierten Viren (86,87). Beide Proteine sind in OPV konserviert und bieten damit eine potentielle Angriffsfläche für Arzneistoffe. Gleichzeitig scheinen diese Proteine interessant für den Einsatz als Wirkstoffe bei anderen Erkrankungen zu sein.

Bei der erblich bedingten Enzephalopathie *Aicardi-Goutières Syndrom (AGS)*, bei der aufgrund von Genmutationen Enzyme fehlen, die im Rahmen des Zellzyklus DNA-Schäden reparieren oder DNA-Fragmente entfernen, sind verstärkt DNA-PK Enzyme aktiv. Dadurch werden permanent immunologische Prozesse ausgelöst, die dauerhafte Schäden bei den Patienten verursachen. Durch die spezifische Hemmung der DNA-PK könnten die immunologischen Prozesse bei den Betroffenen reduziert werden.

Da VACWR unvollständig bzw. gestört in feline Zellen replizieren, wäre im weiteren Verlauf interessant zu untersuchen:

1. ob überhaupt neue infektiöse Partikel gebildet werden oder ob der gemessene Virustiter via PQT auf schlecht zu penetrierenden Viren zurückzuführen ist. Dafür müsste eine Analyse mit z.B. *GFP*-markierten rekombinanten VACWR durchgeführt werden, welches mit einem späten Gen exprimiert wird.
2. K3 und p28 werden nur von CPXV in Fc3Tg Zellen exprimiert, wohingegen bei VACWR K3 unterexprimiert vorliegt verglichen zu CPXV, und p28 nicht exprimiert wurde. Damit könnte K3 oder p28 ein *host range* Faktor für feline Zellen sein. Dabei sollten Untersuchungen mit CPXV K3- bzw. p28 Mutanten durchgeführt werden oder durch gezieltes Aktivieren der Expression von K3 Protein in VACWR.

Auch könnten rekombinante Viren mit einem funktionierenden p28 Gen hergestellt werden oder via Plasmidtransfektion parallel zum Virus in die Zelle verbracht werden, um den potentiellen Effekt von p28 zu analysieren.

Auch sollten in weiteren Untersuchungen die Rolle der microRNAs (miRNAs) für die Pathogenese der OPV berücksichtigt werden. MicroRNAs erfüllen in den Zellen unterschiedliche Funktionen. Beginnend von der Suppression von posttranslationalen Modifikationen bis zur Auswirkung auf die Zellproliferation und -differenzierung sowie die Kontrolle von Stoffwechselprozessen und Zelltod. Laut Literatur wird durch Infektion mit VACV die Genexpression von *Drosha* und *Dicer 1* herunterreguliert, so dass die miRNA Biogenese reduziert wird (102). Wie verhält es sich jedoch mit den bereits exprimierten miRNAs in der Wirtszelle vor der Infektion und welche der zahlreich vorhandenen miRNAs könnten sich negativ auf die Replikation der OPV auswirken.

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1 Aufbau des Pockenvirus
- Abbildung 1.2 Replikationszyklus von VACV
- Abbildung 1.3 Verlauf einer CPXV Infektion nach einer potentiellen Mensch-zu -Mensch Übertragung
- Abbildung 1.4 Verlauf einer VACV Infektion bei einem Laborunfall mit unbekanntem Stamm und Virustiter.
- Abbildung 1.5 Verlauf einer natürlichen VACV Infektion, welche nach ca.25 Tagen abgeklungen ist
- Abbildung 1.6 Immunmodulatorische Strategien der Pockenviren
- Abbildung 1.7 Schema Hautaufbau
- Abbildung 1.8 Wundheilungsprozess
- Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der Echtzeitanalyse
- Abbildung 4.1.1 RTCA via xCelligence für infizierte FR Zellen und HaCats
- Abbildung 4.1.2 RTCA via xCelligence für infizierte BJ – und Fc3Tg Zellen
- Abbildung 4.2.1 Virustiter intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in HaCats
- Abbildung 4.2.2 Virustiter intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in FR-, BJ- und Fc3Tg Zellen
- Abbildung 4.3 Immunfluoreszenztests zur Analyse der Permissivität von Katzenzellen für VACWR im Vergleich zu VACWR infizierten HaCats
- Abbildung 4.4 Virustiter via GE intrazellulär von CPXV BR, CPXV RatHei und VACWR in Fc3Tg Zellen
- Abbildung 4.5.1 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 24h *p.i.*, A - F
- Abbildung 4.5.2 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 24h *p.i.*, G, H
- Abbildung 4.5.3 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 48h *p.i.*, I - L
- Abbildung 4.5.4 Elektromikroskopische Aufnahmen von VACWR in Fc3Tg Zellen zu 48h *p.i.*, M, N
- Abbildung 4.6 RTCA von VACWR infizierten feline Zellen
- Abbildung 4.7 Intrazellulär regulierte Proteine in FR Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR
- Abbildung 4.8 Intrazellulär regulierte Proteine in BJ Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR
- Abbildung 4.9 Intrazellulär regulierte Proteine in Fc3Tg Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR
- Abbildung 4.10 Intrazellulär regulierte Proteine in HaCat Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR
- Abbildung 4.11 Intrazellulär regulierte homologe Proteine in BJ, HaCat, FR und Fc3Tg Zellen über 25h *p.i.* infiziert mit CPXV Stämmen und VACWR
- Abbildung 4.12 Exprimierte virale Proteine in HaCat Zellen
- Abbildung 4.13 Exprimierte virale Proteine in BJ Zellen
- Abbildung 4.14 Exprimierte virale Proteine in FR Zellen
- Abbildung 4.15 Exprimierte virale Proteine in Fc3Tg Zellen
- Abbildung 4.16 Schematische Darstellung der VACV Replikation in permissiven Zellen und in Fc3Tg Zellen
- Abbildung 4.17 Reprogrammierung der metabolischen Prozesse durch OPV
- Abbildung 4.18 Umgehung der antiviralen Antwort der Zelle durch die Expression von immunmodulatorischen Proteinen

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Darstellung einiger intrazellulär wirksamen Virulenzproteine
Tabelle 1.2	Verteilung der EZM Moleküle in den Schichten der Dermis
Tabelle 3.1.1	Chemikalien, Reagenzien, Antikörper und Enzyme
Tabelle 3.1.2	Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3.1.3	Nährmedien, Lösungen
Tabelle 3.1.4	Eukaryotische Zelllinien
Tabelle 3.1.5	Viren
Tabelle 3.1.6	Molekularbiologische Kits
Tabelle 3.1.7	Geräte, Software, Datenbanken
Tabelle 3.2	Reaktionsansatz und Thermoprofil
Tabelle 3.3	Einstellungsparameter der Flüssigchromatographie (nLC)
Tabelle 3.4	Einstellungsparameter des Massenspektrometers
Tabelle 3.5	MaxQuant Einstellungen
Tabelle 4.1	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 1
Tabelle 4.2	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 2
Tabelle 4.3	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine der FR Zellen zugehörig dem Cluster 3
Tabelle 4.4	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den BJ Zellen zugehörig dem Cluster 1
Tabelle 4.5	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den BJ Zellen zugehörig dem Cluster 2
Tabelle 4.6	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den Fc3Tg Zellen zugehörig dem Cluster 1
Tabelle 4.7	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den Fc3Tg Zellen zugehörig dem Cluster 2
Tabelle 4.8	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den HaCats zugehörig dem Cluster 1
Tabelle 4.9	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären Wirtszellproteine in den HaCats zugehörig dem Cluster 2
Tabelle 4.10	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 1
Tabelle 4.11	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 2
Tabelle 4.12	GO Annotationen und KEGG pathways für die signifikant regulierten intrazellulären homologen Wirtszellproteine zugehörig dem Cluster 3
Tabelle 4.13	Zusammenfassung der Ergebnisse
Tabelle 5.1	Regulierte intrazelluläre Prozesse während der Infektion mit CPXV Stämmen und VACWR

9. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
AGC	<i>Automated Gain Control</i>
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ATI	<i>A-type inclusion body</i>
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i>
CAA	2-Chloroacetamid
CEV	<i>Cell associated enveloped Virion</i>
CI	Zellindex
CMC-Na	Carboxymethylcellulose Natrium
cGAMP	Cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate
cGAS	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i>
CPE	<i>Cytopathic effect</i>
CPXV	Cowpox virus
CPXV GRI-90	CPXV Grishak-90 Stamm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNA-PK	dsDNA – abhängige Proteinkinase
dsPKR	dsRNA – abhängige Proteinkinase R
EEV	<i>Extracellular Enveloped Virion</i>
EM	Elektronenmikroskopie
EMEM	Eagle's Minimal Essential Medium
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Ameisensäure
FKS	Foetales Kälberserum
FDR	<i>False discovery rate</i>
GE	Genomequivalente
Gln	Glutamin
GO	<i>Gene Ontology</i>
HCD	<i>High -energy collision dissociation</i>
HIF1- α	<i>Hypoxie-induced factor</i>
IFA	Immuno fluorescence assay
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMV	<i>Intracellular Mature Virion</i>

IRF	Interferon regulatory factor
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L-Gln	L-Glutamin
LFQ	<i>Label free quantification</i>
MeOH	Methanol
MOI	<i>Multiplicity of infection</i>
MS	Massenspektrometrie
MS/MS	<i>Tandem mass spectrometry</i>
m/z	<i>Mass-to-charge ratio</i>
nLC	<i>nano Liquid chromatography</i>
OPV	Orthopockenviren
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
PBS	Phosphatpuffer
PBS ohne	Phosphatpuffer ohne Mg ²⁺ and Ca ²⁺
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming units</i>
PQT	Plaqu-Titrationstest
qPCR	quantitativ Polymerase Chain Reaction
RT	Raumtemperatur
RTCA	<i>Real Time Cell Analysis</i>
p.i.	<i>post infection</i>
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
STING	<i>Stimulator Interferon Genes</i>
sTRAP	<i>Suspension Trapping</i>
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
VACV	Vaccinia Virus
VACV Cop	VACV Copenhagen Stamm
VGf-1	<i>Pro-vaccinia growth factor 1</i>

10. Literaturverzeichnis

1. Harrison SC, Alberts B, Ehrenfeld E, et al. Discovery of antivirals against smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(31):11178-11192. doi:10.1073/pnas.0403600101
2. Fields N, M P, E D, et al. Fields Virology Contents. *Antivir Ther*. 2001;2(August):3177. <http://books.google.com/books?id=500somr0w18C>.
3. Cyrklaff M, Risco C, Fernández JJ, et al. Cryo-electron tomography of vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(8):2772-2777. doi:10.1073/pnas.0409825102
4. Smith GL, Murphy BJ, Law M. Vaccinia Virus Motility. *Annu Rev Microbiol*. 2003;57(1):323-342. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.091037
5. Laliberte JP, Moss B. Lipid membranes in poxvirus replication. *Viruses*. 2010;2(4):972-986. doi:10.3390/v2040972
6. Liu L, Cooper T, Howley PM, Hayball JD. From crescent to mature virion: Vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses*. 2014;6(10):3787-3808. doi:10.3390/v6103787
7. Tolonen N, Doglio L, Schleich S, Krijnse Locker J. Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell*. 2001;12(7):2031-2046. doi:10.1091/mbc.12.7.2031
8. Skinner M.A., Buller R., Damon I.K., et al. Poxviridae. 2012;(2001). doi:10.1016/B978-0-12-384684-6.00028-8
9. Leite JA, da Fonseca FG, de Trindade GS, et al. A-type inclusion bodies: A factor influencing cowpox virus lesion pathogenesis. *Arch Virol*. 2011;156(4):617-628. doi:10.1007/s00705-010-0900-0
10. Babkin I V., Babkina IN. The origin of the variola virus. *Viruses*. 2015;7(3):1100-1112. doi:10.3390/v7031100
11. Essbauer S, Pfeffer M, Meyer H. Zoonotic poxviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):229-236. doi:10.1016/j.vetmic.2009.08.026
12. Orthopockenviren: Infektionen des Menschen. Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz*. 2010;53(9):957-972. doi:10.1007/s00103-010-1110-3
13. Blackford S, Roberts DL, Thomas PD. Cowpox infection causing a generalized eruption in a patient with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 1993;129(5):628-629. doi:10.1111/j.1365-2133.1993.tb00500.x
14. Gazzani P, Gach JE, Colmenero I, et al. Fatal disseminated cowpox virus infection in an adolescent renal transplant recipient. *Pediatr Nephrol*. 2017;32(3):533-536. doi:10.1007/s00467-016-3534-y
15. Kurth A, Wibbelt G, Gerber HP, Petschaelis A, Pauli G, Nitsche A. Rat-to-elephant-to-human transmission of cowpox virus. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(4):670-671. doi:10.3201/eid1404.070817
16. Von Bomhard W, Mauldin EA, Breuer W, Pfleghaar S, Nitsche A. Localized cowpox infection in a 5-month-old Rottweiler. *Vet Dermatol*. 2011;22(1):111-114. doi:10.1111/j.1365-3164.2010.00923.x
17. Bonnekoh B, Falk K, Reckling KF, et al. Cowpox infection transmitted from a domestic cat. *JDDG - J Ger Soc Dermatology*. 2008;6(3):210-213. doi:10.1111/j.1610-0387.2007.06546.x
18. Tamulyte G, Lauraitis J, Ganceviciene R, Grigaitiene J, Zouboulis CC. Cowpox virus infection in two brothers with possible human-to-human transmission. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2019;33(1):e8-e10. doi:10.1111/jdv.15103
19. Sherry L, Haller, Chen Peng, Grant McFadden and Stefan Rothenburg. 2013. Poxviruses and the Evolution of Host Range and Virulence. *Infect Genet Evol*. 2014;23(0):15-40. doi:10.1038/jid.2014.371
20. Whitehouse ER, Rao AK, Yu YC, et al. Novel Treatment of a Vaccinia Virus Infection from an Occupational Needlestick- San Diego, California, 2019 .2019;68(42):943-946. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/68/wr/pdfs/mm6842a2-H.pdf>.

21. Yang G, Pevear DC, Davies MH, et al. An Orally Bioavailable Antipoxvirus Compound (ST-246) Inhibits Extracellular Virus Formation and Protects Mice from Lethal Orthopoxvirus Challenge. *J Virol.* 2005;79(20):13139-13149. doi:10.1128/jvi.79.20.13139-13149.2005
22. Trindade GS, Guedes MIC, Drumond BP, et al. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. *Clin Infect Dis.* 2009;48(3):e37-e40. doi:10.1086/595856
23. Costa GB, Miranda JB, Almeida GG, et al. Detection of vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(2):360-362. doi:10.3201/eid2302.161341
24. Świtaj K, Kajfasz P, Kurth A, Nitsche A. Cowpox after a cat scratch – case report from Poland. *Ann Agric Environ Med.* 2015;22(3):456-458. doi:10.5604/12321966.1167713
25. Johnston JB, McFadden G. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. *J Virol.* 2003;77(11):6093-6100. doi:10.1128/jvi.77.11.6093-6100.2003
26. Bahar MW, Graham SC, Chen RAJ, et al. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol.* 2011;175(2):127-134. doi:10.1016/j.jsb.2011.03.010
27. Johnston JB, McFadden G. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. *J Virol.* 2003;77(11):6093-6100. doi:10.1128/jvi.77.11.6093-6100.2003
28. Lee JH. *Keratinocyte Differentiation and Epigenetics.*; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-800957-4.00003-5
29. Schäfer C. Analyse der Zellwanderung am Beispiel von Keratinozyten: Zusammenspiel von Filopodien, Krafterzeugung und Matrix-Sekretion. *Matrix.* 2010.
30. Stagegaard J, Kurth A, Stern D, et al. Seasonal recurrence of cowpox virus outbreaks in captive cheetahs (*Acinonyx jubatus*). *PLoS One.* 2017;12(11):1-15. doi:10.1371/journal.pone.0187089
31. Schulze C, Alex M, Schirrmeier H, et al. Generalized Fatal Cowpox virus Infection in a Cat with transmission to human contact case. *Zoonoses Public Health.* 2007;54(1):31-37.
32. Duraffour S, Mertens B, Meyer H, et al. Emergence of Cowpox: Study of the Virulence of Clinical Strains and Evaluation of Antivirals. *PLoS One.* 2013;8(2):2-9. doi:10.1371/journal.pone.0055808
33. Sanderson CM, Hollinshead M, Smith GL. The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. *J Gen Virol.* 2000;81(1):47-58. doi:10.1099/0022-1317-81-1-47
34. McFadden BDH, Moussatche N, Kelley K, Kang BH, Condit RC. Vaccinia virions deficient in transcription enzymes lack a nucleocapsid. *Virology.* 2012;434(1):50-58. doi:10.1016/j.virol.2012.08.019
35. Liu L, Cooper T, Howley PM, Hayball JD. From crescent to mature virion: Vaccinia virus assembly and maturation. *Viruses.* 2014;6(10):3787-3808. doi:10.3390/v6103787
36. Condit RC, Moussatche N, Traktman P. In A Nutshell: Structure and Assembly of the Vaccinia Virion. *Adv Virus Res.* 2006;65(October 2017):31-124. doi:10.1016/S0065-3527(06)66002-8
37. Grubisha O, Traktman P. Genetic Analysis of the Vaccinia Virus I6 Telomere-Binding Protein Uncovers a Key Role in Genome Encapsidation. *J Virol.* 2003;77(20):10929-10942. doi:10.1128/jvi.77.20.10929-10942.2003
38. Carter GC, Law M, Hollinshead M, Smith GL. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol.* 2005;86(5):1279-1290. doi:10.1099/vir.0.80831-0
39. Fontaine KA, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. *J Virol.* 2014;88(8):4366-4374. doi:10.1128/jvi.03134-13
40. Breithaupt A, Kalthoff D, Deutskens F, et al. Clinical Course and Pathology in Rats (*Rattus norvegicus*) After Experimental Cowpox Virus Infection by Percutaneous and Intranasal Application. *Vet Pathol.* 2012;49(6):941-949. doi:10.1177/0300985812439077
41. Lu B, Cui L, Gu M, et al. Outbreak of Vaccinia Virus Infection from Occupational Exposure, China, 2017. *Emerg Infect Dis.* 2019;25(6):2017-2020.
42. Kupper TS, Fuhlbrigge RC. Immune surveillance in the skin: Mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(3):211-222. doi:10.1038/nri1310

43. Sorrell JM, Caplan AI. Fibroblast heterogeneity: More than skin deep. *J Cell Sci.* 2004;117(5):667-675. doi:10.1242/jcs.01005
44. Fang F, Ni K, Cai Y, et al. Biological characters of human dermal fibroblasts derived from foreskin of male infertile patients. *Tissue Cell.* 2017;49(1):56-63. doi:10.1016/j.tice.2016.12.003
45. Aiko Kawasumi, Natsume Sagawa, Shinchi Hayashi HY and KT. Wound Healing in Mammals and Amphibians: Toward Limb Regeneration in Mammals. In: *New Perspectives in Regeneration. Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer.* Vol 367. ; 2012:33-49. doi:10.1007/82
46. Guo S, DiPietro LA. Critical review in oral biology & medicine: Factors affecting wound healing. *J Dent Res.* 2010;89(3):219-229. doi:10.1177/0022034509359125
47. Smith GL, Sanderson CM. Cell motility and cell morphology: How some viruses take control. *Expert Rev Mol Med.* 1999;1(10):1-16. doi:10.1017/S1462399499000629
48. Hoy SM. Tecovirimat: First Global Approval. *Drugs.* 2018;78(13):1377-1382. doi:10.1007/s40265-018-0967-6
49. Eder I, Vollmar P, Pfeffer M, Naether P, Rodloff AC, Meyer H. Two distinct clinical courses of human cowpox, Germany, 2015. *Viruses.* 2017;9(12):1-7. doi:10.3390/v9120375
50. Silva-Fernandes AT, Travassos CEPF, Ferreira JMS, et al. Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol.* 2009;44(4):308-313. doi:10.1016/j.jcv.2009.01.007
51. Becker C, Kurth A, Hessler F, et al. Cowpox Virus Infection in Pet Rat Owners. 2009;106(19):329-334. doi:10.3238/arztebl.2009.0329
52. Chou W, Ngo T, Gershon PD. An Overview of the Vaccinia Virus Infectome : a Survey of the Proteins of the Poxvirus-Infected Cell. 2012:1487-1499. doi:10.1128/JVI.06084-11
53. Liu L, Xu Z, Fuhlbrigge RC, Pena-Cruz V, Lieberman J, Kupper TS. Vaccinia Virus Induces Strong Immunoregulatory Cytokine Production in Healthy Human Epidermal Keratinocytes: a Novel Strategy for Immune Evasion. *J Virol.* 2005;79(12):7363-7370. doi:10.1128/jvi.79.12.7363-7370.2005
54. Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2008;1778(3):572-587. doi:10.1016/j.bbamem.2007.07.014
55. Joklik WK. The poxviruses. *Bacteriol Rev.* 1966;30(1):33-66. doi:10.1146/annurev.mi.22.100168.002043
56. Wagenaar TR, Moss B. Expression of the A56 and K2 Proteins Is Sufficient To Inhibit Vaccinia Virus Entry and Cell Fusion. *J Virol.* 2009;83(4):1546-1554. doi:10.1128/jvi.01684-08
57. Erez N, Paran N, Maik-Rachline G, et al. Induction of cell-cell fusion by ectromelia virus is not inhibited by its fusion inhibitory complex. *Virol J.* 2009;6(Mv):1-13. doi:10.1186/1743-422X-6-151
58. Costa GB, Miranda JB, Almeida GG, et al. Detection of vaccinia virus in urban domestic cats, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(2):360-362. doi:10.3201/eid2302.161341
59. Peres MG, Barros CB, Appolinário CM, et al. Dogs and opossums positive for vaccinia virus during outbreak affecting cattle and humans, São Paulo State, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(2):271-273. doi:10.3201/eid2202.140747
60. Moss B. Poxvirus DNA replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013;5(9):1-12. doi:10.1101/cshperspect.a010199
61. McFadden BDH, Moussatche N, Kelley K, Kang BH, Condit RC. Vaccinia virions deficient in transcription enzymes lack a nucleocapsid. *Virology.* 2012;434(1):50-58. doi:10.1016/j.virol.2012.08.019
62. Greseth MD, Traktman P. De novo Fatty Acid Biosynthesis Contributes Significantly to Establishment of a Bioenergetically Favorable Environment for Vaccinia Virus Infection. *PLoS Pathog.* 2014;10(3). doi:10.1371/journal.ppat.1004021
63. Bratke KA, McLysaght A, Rothenburg S. A survey of host range genes in poxvirus genomes. *Infect Genet Evol.* 2013;14(1):406-425. doi:10.1016/j.meegid.2012.12.002
64. Beattie E., Tartaglia J. and PE. Vaccinia Virus-Encoded eIF-2a Homolog abrogates the antiviral effect of interferon J. 1991;422:419-422. doi: 10.1016/0042-6822(91)90158-8

65. Drillien R, Spehner D, Kirn A. Host range restriction of vaccinia virus in Chinese hamster ovary cells: relationship to shutoff of protein synthesis. *J Virol.* 1978;28(3):843-850. doi:10.1128/jvi.28.3.843-850.1978
66. Bourquain D. Modulation zellulärer Signalwege und antiviraler Mechanismen in Makrophagen durch Orthopockenviren.
67. Gerlic M, Faustin B, Postigo A, et al. Vaccinia virus F1L protein promotes virulence by inhibiting inflammasome activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(19):7808-7813. doi:10.1073/pnas.1215995110
68. Parviainen S, Autio K, Vähä-Koskela M, et al. Incomplete but infectious vaccinia virions are produced in the absence of oncolysis in feline SCCF1 cells. *PLoS One.* 2015;10(3). doi:10.1371/journal.pone.0120496
69. Ronquist G, Andersson A, Bendsoe N, Falck B. Human epidermal energy metabolism is functionally anaerobic. *Exp Dermatol.* 2003;12(5):572-579. doi:10.1034/j.1600-0625.2003.00018.x
70. Goldstein S, Ballantyne SR, Robson AL, Moerman EJ. Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro. *J Cell Physiol.* 1982;112(3):419-424. doi:10.1002/jcp.1041120316
71. Mazzon M, Peters NE, Loenarz C, et al. A mechanism for induction of a hypoxic response by vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(30):12444-12449. doi:10.1073/pnas.1302140110
72. Fahy AS, Clark RH, Glyde EF, Smith GL. Vaccinia virus protein C16 acts intracellularly to modulate the host response and promote virulence. *J Gen Virol.* 2008;89(10):2377-2387. doi:10.1099/vir.0.2008/004895-0
73. Mazzon M, Castro C, Roberts LD, Griffin JL, Smith GL. A role for vaccinia virus protein C16 in reprogramming cellular energy metabolism. *J Gen Virol.* 2015;96(2):395-407. doi:10.1099/vir.0.069591-0
74. Fontaine KA, Camarda R, Lagunoff M. Vaccinia Virus Requires Glutamine but Not Glucose for Efficient Replication. *J Virol.* 2014;88(8):4366-4374. doi:10.1128/jvi.03134-13
75. Ojeda S, Domi A, Moss B. Vaccinia Virus G9 Protein Is an Essential Component of the Poxvirus Entry-Fusion Complex. *J Virol.* 2006;80(19):9822-9830. doi:10.1128/jvi.00987-06
76. Dai, Aimei, Cao, et al. crossm Ribosome Profiling Reveals Translational Upregulation of Cellular Oxidative Phosphorylation mRNAs during Vaccinia Virus-Induced Host Shutoff. *J Virol.* 2017;91(5):1-17. e01858-16. doi: 10.1128/JVI.01858-16.
77. Mehta N, Enwere EK, Santos T Dos, et al. Expression of the Vaccinia Virus Antiapoptotic F1 Protein Is Blocked by Protein Kinase R in the Absence of the Viral E3 Protein. *J Virol.* 2018;92(19):1-14. doi:10.1128/jvi.01167-18
78. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci.* 2004;117(26):6535-6546. doi:10.1242/jcs.01565
79. Schrepfer E, Scorrano L. Mitofusins, from Mitochondria to Metabolism. *Mol Cell.* 2016;61(5):683-694. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.022
80. Rubins KH, Hensley LE, Relman DA, Brown PO. Stunned silence: Gene expression programs in human cells infected with monkeypox or vaccinia virus. *PLoS One.* 2011;6(1). doi:10.1371/journal.pone.0015615
81. Seth RB, Sun L, Chen ZJ. Antiviral innate immunity pathways. *Cell Res.* 2006;16(2):141-147. doi:10.1038/sj.cr.7310019
82. Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, Ren H, Smith GL. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife.* 2012;2012(1):1-17. doi:10.7554/eLife.00047
83. Moreno-Altamirano MMB, Kolstoe SE, Sánchez-García FJ. Virus control of cell metabolism for replication and evasion of host immune responses. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9(APR):1-15. doi:10.3389/fcimb.2019.00095
84. Eaglesham JB, Pan Y, Kupper TS, Kranzusch PJ. Viral and metazoan poxins are cGAMP-specific nucleases that restrict cGAS–STING signalling. *Nature.* 2019;566(7743):259-263. doi:10.1038/s41586-019-0928-6

85. Yaneva M, Kowalewski T, Lieber MR. Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: Biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 1997;16(16):5098-5112. doi:10.1093/emboj/16.16.5098
86. Scutts SR, Ember SW, Ren H, et al. DNA-PK Is Targeted by Multiple Vaccinia Virus Proteins to Inhibit DNA Sensing. *Cell Rep.* 2018;25(7):1953-1965.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.034
87. Peters NE, Ferguson BJ, Mazzon M, et al. A Mechanism for the Inhibition of DNA-PK-Mediated DNA Sensing by a Virus. *PLoS Pathog.* 2013;9(10). doi:10.1371/journal.ppat.1003649
88. de Freitas LFD, Oliveira RP, Miranda MCG, et al. The Virulence of Different Vaccinia Virus Strains Is Directly Proportional to Their Ability To Downmodulate Specific Cell-Mediated Immune Compartments In Vivo . *J Virol.* 2018;93(6):1-16. doi:10.1128/jvi.02191-18
89. Chaitanya GV, Alexander JS, Babu PP. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun Signal.* 2010;8(1):31. doi:10.1186/1478-811X-8-31
90. Wali A, Strayer DS. Infection with vaccinia virus alters regulation of cell cycle progression. *DNA Cell Biol.* 1999;18(11):837-843. doi:10.1089/104454999314836
91. Suen Der-Fen, Kristi L. Norris and R.J.Y. Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Cold Spring Harb Lab Press.* 2008;87(4):8-9. doi:10.1101/gad.1658508.GENES
92. Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, et al. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* 2006;25(15):3618-3626. doi:10.1038/sj.emboj.7601249
93. Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, et al. 150-kDa Oxygen-regulated Protein (ORP150) Suppresses Hypoxia-induced Apoptotic Cell Death *. 1999;274(10):6397-6404.
94. Tu Y, Ji C, Yang B, et al. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs)-SIN1 association mediates ultraviolet B (UVB)-induced Akt Ser-473 phosphorylation and skin cell survival. *Mol Cancer.* 2013;12(1):1-12. doi:10.1186/1476-4598-12-172
95. Veyer DL, de Motes CM, Sumner RP, Ludwig L, Smith GL, Johnson BF. Analysis of the anti-apoptotic activity of four vaccinia virus proteins demonstrates that B13 is the most potent inhibitor in isolation and during viral infection. *J Gen Virol.* 2014;95:2757-2768. doi:10.1099/vir.0.068833-0
96. Tamošiūnaitė A. *Cowpox Virus Virulence Determinants.*; 2017.
97. Peres MG, Bacchiega TS, Appolinário CM, et al. Vaccinia virus in feces and urine of wild rodents from São Paulo State, Brazil. *Viruses.* 2018;10(2):1-9. doi:10.3390/v10020051
98. Abrahão JS, Guedes MIM, Trindade GS, et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS One.* 2009;4(10). doi:10.1371/journal.pone.0007428
99. Franke A, Ulrich RG, Weber S, et al. Experimental cowpox virus (CPXV) infections of bank voles: Exceptional clinical resistance and variable reservoir competence. *Viruses.* 2017;9(12). doi:10.3390/v9120391
100. Hoffmann D, Franke A, Jenckel M, et al. Out of the Reservoir : Phenotypic and Genotypic Characterization of a Novel Cowpox Virus Isolated from a Common Vole. *Jvi.* 2015;89(21):10959-10969. doi:10.1128/JVI.01195-15.
101. Neumann M. Etablierung eines dreidimensionalen Infektionsmodells für Kuhpockenviren in humaner Haut und Charakterisierung der Infektion.
102. Grinberg M, Gilad S, Meiri E, et al. Vaccinia virus infection suppresses the cell microRNA machinery. *Arch Virol.* 2012;157(9):1719-1727. doi:10.1007/s00705-012-1366-z
103. Xu Z, Zikos D, Osterrieder N, Tischer BK. Generation of a Complete Single-Gene Knockout Bacterial Artificial Chromosome Library of Cowpox Virus and Identification of Its Essential Genes. *J Virol.* 2014;88(1):490-502. doi:10.1128/jvi.02385-13
104. McFadden BDH, Moussatche N, Kelley K, Kang BH, Condit RC. Vaccinia virions deficient in transcription enzymes lack a nucleocapsid. *Virology.* 2012;434(1):50-58. doi:10.1016/j.virol.2012.08.019
105. Teale A, Campbell S, Van Buuren N, et al. Orthopoxviruses Require a Functional Ubiquitin-Proteasome System for Productive Replication. *J Virol.* 2009;83(5):2099-2108. doi:10.1128/jvi.01753-08

106. Seitz R. Orthopox viruses: Infections in humans. *Transfus Med Hemotherapy*. 2010;37(6):351-364. doi:10.1159/000322101
107. Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. *Mol Cell Probes*. 2010;24(2):110-113. doi:10.1016/j.mcp.2009.10.008
108. Tyanova S, Cox J. Perseus: A Bioinformatics Platform for Integrative Analysis of proteomics data in Cancer Research. *Tractates Sabbat 'Eruvin*. 2012;1711:133-148. doi:10.1515/9783110289039.734
109. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods*. 2016;13(9):731-740. doi:10.1038/nmeth.3901
110. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc*. 2016;11(12):2301-2319. doi:10.1038/nprot.2016.136
111. Wickramasekera NT, Traktman P. Structure/Function Analysis of the Vaccinia Virus F18 Phosphoprotein, an Abundant Core Component Required for Virion Maturation and Infectivity. *J Virol*. 2010;84(13):6846-6860. doi:10.1128/jvi.00399-10
112. Meade N, Furey C, Li H, et al. Poxviruses Evade Cytosolic Sensing through Disruption of an mTORC1-mTORC2 Regulatory Circuit. *Cell*. 2018;174(5):1143-1157.e17. doi:10.1016/j.cell.2018.06.053
113. Meade N, King M, Munger J, Walsh D. mTOR Dysregulation by Vaccinia Virus F17 Controls Multiple Processes with Varying Roles in Infection. *J Virol*. 2019;93(15):1-26. doi:10.1128/jvi.00784-19
114. Carroll MW, Moss B. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: Propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*. 1997;238(2):198-211. doi:10.1006/viro.1997.8845
115. Hu X, Carroll LJ, Wolffe EJ, Moss B. De novo synthesis of the early transcription factor 70-kilodalton subunit is required for morphogenesis of vaccinia virions. *J Virol*. 1996;70(11):7669-7677. doi:10.1128/jvi.70.11.7669-7677.1996
116. Gallego-Gomez JC, Risco C, Rodriguez D, et al. Differences in Virus-Induced Cell Morphology and in Virus Maturation between MVA and Other Strains (WR, Ankara, and NYCBH) of Vaccinia Virus in Infected Human Cells. *J Virol*. 2003;77(19):10606-10622. doi:10.1128/jvi.77.19.10606-10622.2003
117. Erster O, Melamed S, Paran N, et al. First diagnosed case of camelpox virus in Israel. *Viruses*. 2018;10(2):1-13. doi:10.3390/v10020078
118. Meade N, DiGiuseppe S, Walsh D. Translational control during poxvirus infection. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2019;10(2):1-13. doi:10.1002/wrna.1515
119. Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, Skeen JE, Sonenberg N, Hay N. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32081-32089. doi:10.1074/jbc.M502876200
120. Soares JAP, Leite FGG, Andrade LG, et al. Activation of the PI3K/Akt Pathway Early during Vaccinia and Cowpox Virus Infections Is Required for both Host Survival and Viral Replication. *J Virol*. 2009;83(13):6883-6899. doi:10.1128/jvi.00245-09

11. Präsentationen

Posterpräsentationen:

1. Jährliches Diplomanden – und Doktorandentreffen des Robert Koch – Instituts|

Poster: Identification of Virus-Host – Interaction

Margarita Voskanian, Jörg Döllinger, Andreas Nitsche|Berlin 2016

2. Jährliches Diplomanden – und Doktorandentreffen des Robert Koch – Instituts|

Poster: Investigation of Pathogenic Potential of Cowpox Virus Strains|

Margarita Voskanian, Jörg Döllinger, Andreas Nitsche|Wernigerode 2017

Eigene Publikation unabhängig von dieser Arbeit:

Regenthal R, Voskanian M, Baumann F, et al. Pharmacokinetic evaluation of a transdermal anastrozole-in-adhesive formulation. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:3653-3664. doi:10.2147/DDDT.S170764

12. Danksagung

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.