

Aus dem Max von Pettenkofer Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München.  
Vorstand: Prof. Dr. Ulrich Koszinowski

# **Funktionelle Analyse des Matrixproteins des Tollwutvirus**

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Christine Schnellhammer  
aus  
Bad Kreuznach 2009

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Karl Klaus Conzelmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Stefan Finke

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2009

## Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäure
Ala	Alanin
AGP	Antigenpromotor
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BHK-Zellen	Babyhamster-Nierenzellen
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
CDTA	1,2-Cyclohexandiamintetraacetat
CPE	zytopathischer Effekt
C-terminal	Carboxy-terminal
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsRNA	doppelsträngige RNA
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Bakterienstamm <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt ( <i>enhanced</i> ) grün fluoreszierendes Protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	Et alii
EtBr	Ethidiumbromid
EYFP	verstärkt ( <i>enhanced</i> ) gelb fluoreszierendes Protein
ffu	focus bildende Einheit ( <i>focus forming unit</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G	Glykoprotein
G418	Geneticin
GP	Genompromotor
h	Stunde
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
IFN	Interferon
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	Interferon-stimuliertes Gen
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	<i>large</i> Polymerase
l	Liter
LB-Medium	Luria-Broth.Medium
M	Molar / Matrixprotein
m	Milli
μ	Mikro
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MOI	Infektionsmultiplizität ( <i>multiplicity of infection</i> )
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )

N	Nukleoprotein
n	Nano
nACh	nicotinsäureabhängige Acetylcholinrezeptoren
ng	Nanogramm
N-terminal	Amino-terminal
nt	Nukleotide
OAS	2'-5'Oligoadenylase
P	Phosphoprotein
p	Pico
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
p.i.	nach Infektion ( <i>post infection</i> )
P/S	Penicillin/Ampicillin
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Reverse Transkriptase / Raumtemperatur
RV	Tollwutvirus ( <i>rabies virus</i> )
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssRNA	einzelsträngige RNA
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TAE	Tris Acetat EDTA
TBE	Tris Borat EDTA
TBK	TANK-binding kinase
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TLR	Toll-like Rezeptoren
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VSV	Vesicular-Stomatitis-Virus
W	Watt
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

<b>Kapitel 1: Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Das Tollwutvirus	<b>3</b>
1.1.1 Taxonomie	3
1.2 Struktur und Genomorganisation	<b>5</b>
1.2.1 Antivirale Interferonantwort und Tollwutinfektion	7
1.2.1.1 Induktion von Interferon	8
1.2.1.2 Inhibition der IFN Induktion durch das Phosphoprotein	10
1.3 Der Replikationszyklus des Tollwutvirus	<b>10</b>
1.4 Transkription und RNA-Replikation	<b>11</b>
1.4.1 Das Matrixprotein als Regulator der viralen RNA-Synthese	14
<b>Kapitel 2: Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Material	<b>16</b>
2.1.1 Chemikalien	16
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Geräte	17
2.1.4 Enzyme	18
2.1.5 Serologische Reagenzien	18
2.1.6 Polyklonales Peptidserum gegen Phosphoprotein aus Kaninchen	18
2.1.7 Zellkulturmedien und Puffer	19
2.1.8 Sonstige Puffer	19
2.1.9 Verwendete kommerziell erhältliche „Kits“	19
2.1.10 Weitere Reagenzien	20
2.1.11 Nukleinsäuren, Virusstämme, Bakterien, Zellen	<b>20</b>
2.1.11.1 Oligonukleotide	21
2.1.11.2 Plasmide	23
2.1.11.2.1 Verwendete Plasmide	23
2.1.11.2.2 Plasmide aus dieser Arbeit	24
2.1.11.3 Virusstämme	26
2.1.11.3.1 Verwendete Viren	26
2.1.11.3.2 Viren aus dieser Arbeit	27
2.1.11.4 Bakterienstämme	27
2.1.11.5 Zelllinien	28
2.2 Methoden	<b>29</b>
2.2.1 Arbeiten mit DNA	29
2.2.1.1 Reinigung von DNA über Silicamembranen	29
2.2.1.2 DNA-Sequenzierung	29
2.2.1.3 DNA Restriktionsendonukleaseverdau	29
2.2.1.4 DNA Ligation	30
2.2.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	30

---

2.2.1.6 Reverse Transkription (RT)	30
2.2.1.7 Quantitative PCR (qPCR); real-time PCR	31
2.2.1.8 Auftrennung von DNA Fragmenten im Agarosegel	31
2.2.1.9 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.2.2 Arbeiten mit RNA	32
2.2.2.1 Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen	32
2.2.2.2 Auftrennung von RNA im Agarosegel	33
2.2.2.3 Nukleaseverdau von ribosomaler RNA	33
2.2.2.4 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)	34
2.2.2.5 Northernhybridisierung mit DNA/RNA-Sonden	34
2.2.2.5.1 Herstellung von DNA-Sonden	34
2.2.2.5.2 Herstellung von einzelstrangspezifischen RNA-Sonden	35
2.2.2.5.3 DNA/RNA Hybridisierung	35
2.2.2.5.4 RNA/RNA Hybridisierung	36
2.2.3 Arbeiten mit Proteinen	37
2.2.3.1 Auftrennen von Proteinen im denaturierenden Polyacrylamidgel	37
2.2.3.2 Western Blot auf Nitrozellulosemembran	38
2.2.3.3 Luciferase Assay	38
2.2.4 Zellkultur	39
2.2.4.1 Passage von Zellen	39
2.2.4.2 Anlegen von Gefrierkulturen	39
2.2.4.3 Transfektion von Zellen	40
2.2.4.4 Differenzierung von NS20Y Neuronen	40
2.2.4.5 Immunfluoreszenz	40
2.2.4.5.1 Direkte Immunfluoreszenz	40
2.2.4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz	41
2.2.4.5.3 Zellkernfärbung mit Hoechstfarbstoff	41
2.2.5 Arbeiten mit Viren	42
2.2.5.1 Herstellung rekombinanter Tollwutviren ausgehend von cDNA, <i>Virus Rescue</i>	42
2.2.5.2 Vermehrung von Tollwutvirus in Zellkultur	43
2.2.5.3 Wachstumskurven der Tollwutviren	43
2.2.5.4 Vermehrung von NPgrL-Virus in Zellkultur	44
2.2.5.5 Vaccinia Viren	44
2.2.5.6 Überexpression von cDNA in BSR Zellen mittels Vaccinia Viren	45
2.2.6 Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> )	46
2.2.6.1 Anzucht von <i>E.coli</i>	46
2.2.6.2 Präparation chemisch kompetenter Bakterien ( <i>E.coli</i> )	46
2.2.6.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	46
2.2.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E.coli</i>	47
2.2.7.1 Plasmid-Minipräparation aus <i>E.coli</i>	47
2.2.7.2 Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	47

2.2.8 Herstellung rekombinanter Plasmide	48
2.2.8.1 Konstruktion von ECFP-N3-P / EYFP-N3-P	48
2.2.8.2 Konstruktion von ECFP-N3-N / EYFP-N3-P	48
2.2.8.3 Konstruktion von M-ATG2-EYFP, M-ATG3-EYFP, M-ATG4-EYFP und M-ATG5-EYFP	48
2.2.8.4 Zielgerichtete Mutagenese des M-Gens	49
2.2.8.5 Konstruktion von rekombinanter Virus cDNA	51
<b>Kapitel 3: Ergebnisse</b>	<b>52</b>
3.1 Mutationsanalysen des Matrixproteins	<b>52</b>
3.1.1 Untersuchung zur Assemblyfunktion mutagenisierter M-Proteine	53
3.1.2 Expressionskontrolle mittels Western Blot	56
3.1.3 Die RNA-Syntheseregulation durch das Matrixprotein	57
3.2 Herstellung rekombinanter Tollwutviren mit Mutationen in der M Gensequenz	<b>66</b>
3.2.1 Wachstumsanalysen der Virusmutanten	68
3.2.2 Untersuchung der RNA-Synthese-Regulation der rekombinanten RV-Viren	69
3.2.2.1 Quantifizierung der Virus-RNA-Akkumulierung mittels Northern Hybridisierung	69
3.3 Etablierung einer Tollwutvirus-spezifischen quantitativen RT-PCR (RT-qPCR)	<b>74</b>
3.3.1 Primerauswahl und Hybridisierungssonden	75
3.3.1.1 Auswahl der Zielsequenz für die qPCR	75
3.3.1.2 $\beta$ -Aktin	76
3.3.2 Annealingtemperatur	78
3.3.3 $Mg^{2+}$ Konzentration	78
3.3.4 Standardkurven	79
3.3.5 Quantifizierung der RV-RNA und des RV-Genoms	82
3.4 Intrazelluläre Lokalisation der mutierten M-Proteine in virusinfizierten Zellen	<b>85</b>
3.4.1 Immunfluoreszenz	85
3.5 Überexpression von viralen Proteinen und die Induktion eines zytopathischen Effektes	<b>88</b>
3.6 Interferoninduktion durch Hi-T Mutanten	<b>94</b>
3.6.1 STAT-1 Phosphorylierung durch Hi-T-Virusmutanten	94
3.6.2 Luciferase Assay	96
3.7 Untersuchungen zur Interaktion von Tollwut M und P Proteine	<b>99</b>
3.7.1 Fusionsproteine, Tollwut M und P mit eCFP / eYFP	99
<b>Kapitel 4: Diskussion</b>	<b>102</b>
4.1 Regulation der RNA-Synthese durch das Matrixprotein	<b>102</b>
4.2 Das Matrixprotein als Mediator der RNA-Synthese?	<b>103</b>
4.2.1 Die Lokalisation der Transkriptions-, bzw. Replikationsmaschinerie hat möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation der RNA-Synthese	105
4.2.2 Die Promotor- und Antigenompromotoraktivität der mutierten Viren	106

4.2.3 Das Matrixprotein und das Phosphoprotein regulieren zusammen die RNA-Synthese	108
4.2.4 Die indirekte Regulation der RNA-Synthese über das Nukleoprotein	109
4.3 Tollwutvirus und Interferoninduktion	<b>110</b>
4.4 Quantitative PCR (qPCR)	<b>112</b>
4.5 Ausblick	<b>113</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>Summary</b>	<b>116</b>

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Tollwutvirus-infizierter Hund mit aggressiv gefletschten Zähnen.....	2
<b>Abbildung 2:</b> Aufbau eines Tollwutvirions.....	5
<b>Abbildung 3:</b> Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer M-Deletionsmutante des Tollwutvirus.....	6
<b>Abbildung 4:</b> Schematische Darstellung der Interferoninduktion.....	8
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der Induktion antiviraler Proteine.....	9
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung des Replikationszyklus des Tollwutvirus.....	11
<b>Abbildung 7:</b> Tollwutvirus mRNA-Transkription und RNP-Replikation.....	13
<b>Abbildung 8:</b> Aufbau des M- und G-deletierten RV-Replikons SAD NPgrL.....	52
<b>Abbildung 9:</b> Schematische Darstellung der Komplementationsversuche zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel.....	54
<b>Abbildung 10:</b> M Protein - Akkumlierung nach Transfektion der Expressionsplasmide in NPgrL infizierte BSR T7/5-Zellen.....	56
<b>Abbildung 11:</b> Schematische Darstellung der Komplementationsversuche zur Detektion von M-Mutationen, die die RNA-Syntheseregulation durch M beeinflussen.....	59
<b>Abbildung 12:</b> Verteilung des Matrixproteins in BSR T7/5-Zellen nach Transfektion mutierter M-Plasmide.....	63
<b>Abbildung 13:</b> Darstellung der Proteinsequenz des Matrixproteins der rekombinanten Viren, die erfolgreich von cDNA-Plasmiden generiert werden konnten.....	66
<b>Abbildung 14:</b> Wachstum der rekombinanten Tollwutviren auf BSR T7/5-Zellen.....	67
<b>Abbildung 15:</b> Northern Hybridisierung der Virus-RNA.....	69
<b>Abbildung 16:</b> Graphische Darstellung der Transkriptionsrate.....	70
<b>Abbildung 17:</b> Northern Hybridisierung von Nuklease unbehandelter und behandelter RNA.....	71
<b>Abbildung 18:</b> Bestimmung des Genom- und Antigenom-RNA Verhältnisses.....	72
<b>Abbildung 19:</b> Sequenzabschnitt des Nukleoproteins.....	75
<b>Abbildung 20:</b> Sequenzabschnitt des $\beta$ -Aktins.....	76
<b>Abbildung 21:</b> Amplifikationskurve nach Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentrationen.....	78
<b>Abbildung 22:</b> Standardkurven der qPCR.....	81
<b>Abbildung 23:</b> Akkumulierung von Genom- und Antigenomischer Virus-RNA in infizierten Zellen.....	82
<b>Abbildung 24:</b> Transkriptionsrate.....	83
<b>Abbildung 25:</b> Vergleich der Transkriptionsraten qPCR und Northern Hybridisierung.....	83
<b>Abbildung 26:</b> qPCR Nuklease-verdauter VirusRNA.....	84
<b>Abbildung 27:</b> Immunfluoreszenzaufnahmen von virusinfizierten BSR T7/5-Zellen.....	85
<b>Abbildung 28:</b> Immunfluoreszenzaufnahmen von virusinfizierten ausdifferenzierten NS20Y Zellen..	86
<b>Abbildung 29:</b> Erhöhte Proteinexpression der Hi-T Mutanten.....	88
<b>Abbildung 30:</b> CPE der Hi-T Mutanten auf verschiedene Zelllinien.....	92

---

<b>Abbildung 31:</b> Untersuchung auf Interferoninduktion der Hi-T Mutanten in BSR T7/5- und HEp2-Zellen .....	94
<b>Abbildung 32:</b> Durchschnittliche Interferoninduktionsrate der Hi-T Mutanten auf HEK 293T- Zellen .	96
<b>Abbildung 33:</b> (A) Northernblot zur Expressionskontrolle. (B) Transkriptionseffizienz der untersuchten RNA.....	97
<b>Abbildung 34:</b> (A) Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten Proteine M und P. (B) Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proteine in BSR T7/5-Zellen. (C) Kolokalisation von M-CFP und P-YFP nach Transfektion in BSR T7/5-Zellen .....	99
<b>Abbildung 35:</b> Schematische Darstellung der verkürzten Matrixproteine.....	100
<b>Abbildung 36:</b> Kolokalisation des Phosphoproteins mit verkürztem Matrixprotein.....	101
<b>Abbildung 37:</b> Modell der Inhibition der Interferoninduktion durch P und M Protein .....	111
<b>Tabelle 1:</b> Nicht segmentierte Negativstrang RNA Viren.....	4
<b>Tabelle 2:</b> Klassifizierung der Lyssaviren in 7 Genotypen.....	4
<b>Tabelle 3:</b> Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen, DNA und Schnittstellen .....	49
<b>Tabelle 4:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse aus der ersten Runde des phänotypischen Screens auf Assembly- und RNA-Syntheseregulations-Aktivität.....	60
<b>Tabelle 5:</b> Zusammenfassung der Ergebnisse aus der zweiten Runde des phänotypischen Screens auf Assembly- und RNA-Syntheseregulations-Aktivität.....	61
<b>Tabelle 6:</b> Zusammenfassung der M-Mutationen, die für die Herstellung rekombinanter Viren ausgesucht wurden.....	64

## Kapitel 1: Einleitung

Tollwut ist eine Zoonose, die sowohl für Tiere als auch für Menschen tödlich verläuft. Die ersten Fälle von tollwütigen Hunden wurden bereits 2300 v. Chr. im babylonischen Königsreich dokumentiert. Der Erreger der Tollwut, das Tollwutvirus (Rabies Virus, RV), besitzt ein sehr breites Wirtsspektrums und konnte sich weltweit verbreiten. Aktuell werden im Zusammenhang mit einer Tollwutinfektion jährlich bis zu 55 000 Todesfälle verzeichnet, davon über 10 000 allein in Indien (World Health Organization, 2004). Vor allem die Drittwelt-Länder in Afrika und Asien sind betroffen, da dort Menschen in engem Kontakt zu Tieren leben und ihnen zudem die Mittel fehlen, Impfungen oder Postexpositionsprophylaxen durchzuführen.

Westeuropa gilt als nahezu tollwutfrei. In Deutschland konnte die Fuchstollwut mit Hilfe einer flächendeckenden Impfkampagne eliminiert werden (Forschungs Report 01/2008 des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz). Die kürzlich in Deutschland aufgetretenen humanen Tollwuterkrankungen sind nicht auf die Übertragung durch einheimische Füchse zurückzuführen, sondern auf Auslandsaufenthalte (Schankin et al., 2005) oder die Transplantation von Organen einer Tollwutvirus-infizierten Spenderin (Schankin et al., 2005).

Das Tollwutvirus kann bei Tieren und Menschen eine letale Enzephalomyelitis verursachen. Die Übertragung erfolgt in der Regel über den Biss infizierter Tiere, die das Virus bereits bis zu 12 Tage vor Erkrankungsbeginn im Speichel ausscheiden können. Eine Kontaktinfektion über offene Wunden ist ebenfalls möglich und es wurde von Fällen berichtet, in denen das Einatmen von virushaltigem Staub zu einer Infektion über die Schleimhäute geführt hatte (Johnson et al., 2006). Dieser Übertragungsweg ist Thema aktueller Untersuchungen. Die Inkubationszeit kann bis zu zwei Jahre dauern, allerdings beträgt sie in den meisten Fällen 3 bis 12 Wochen. Nach einer Infektion gelangt das Virus in die peripheren Nerven, wo es durch die Axone zum Zentralen Nervensystem (ZNS) wandert und schließlich im Hippocampus, Hirnstamm und Ammonshorn entzündliche Läsionen verursacht. Es werden fast ausschließlich Neurone zerstört. Nach der Vermehrung im Gehirn breiten

sich die Virionen in periphere Organe aus, vor allem in die Speicheldrüse (Lafon M., 2004).

Die Tollwut äußert sich in aggressivem Verhalten und großer Unruhe. Das klassische Bild eines tollwütigen Hundes zeigt ein aggressives Tier mit Schaum vor dem Maul, da der Schluckreflex aussetzt (Abb.1). Durch die großen Mengen an Virus im Speichel trägt diese Symptomatik zu einer raschen Verbreitung des Virus bei. Beim Menschen äußert sich eine Tollwutinfektion mit Kopfschmerzen, Fieber, Hyperventilation und Lähmungserscheinungen. Der Patient verliert das Bewusstsein und fällt in ein Koma. Bei Tieren sind die Symptome der „rasenden Wut“ nur zum Teil vorhanden. Vermutlich basieren die Symptome auf die Störung von Neurotransmittersysteme. Es gibt allerdings auch eine „stumme“ paralytische Form der Tollwut, bei der sich das infizierte Tier unnatürlich ruhig und zurückgezogen verhält.



**Abbildung 1: Tollwutvirus-infizierter Hund mit aggressiv gefletschten Zähnen.** Die genauen Ursachen für die Wesensveränderung sind noch weitestgehend ungeklärt.

Seit 1885 ist es dank Louis Pasteur möglich, sich vorbeugend gegen Tollwut impfen zu lassen. Dies geschieht beim Menschen und Haustieren mit inaktivierten Rabies Viren, bei Hunden und Wildtieren mit attenuierten Lebendimpfstoffen. Die Impfung wilder Tiere erfolgt über Ködervakzine. Postexpositionell kann eine passive Immunisierung durchgeführt werden, indem hohe Konzentrationen an neutralisierenden Antikörper verabreicht werden. Zusätzlich erfolgt in diesen Fällen eine aktive Immunisierung. Ist das Virus in das Gehirn vorgedrungen, ist ein tödlicher Ausgang meist nicht mehr zu vermeiden (Warrell and Warrell, 2004). Nur in

vereinzelt gab es Überlebende einer Tollwutvirusinfektion (Willoughby, Jr. et al., 2005).

## 1.1 Das Tollwutvirus

### 1.1.1 Taxonomie

Das Tollwutvirus gehört zu der Gattung der *Lyssaviren* innerhalb der Familie der *Rhabdoviridae*. Aufgrund ihres nichtsegmentierten, einzelsträngigen RNA-Genoms werden sie neben den *Paramyxoviridae*, den *Bornaviridae* und den *Filoviridae* der Ordnung der *Mononegavirales* zugeordnet (Tab.1). Wichtige humanpathogene Vertreter der *Paramyxoviridae* sind das Masernvirus und das Humane Respiratorische Synzytialvirus (HRSV). Zu den Filoviren gehören die besonders hoch virulenten Ebola- und Marburgviren. Obwohl die Anzahl der kodierenden Virusgene in den einzelnen Familien unterschiedlich ist, wird aufgrund der großen Ähnlichkeit der Genomstruktur bei allen *Mononegavirales* vermutet, dass die grundlegenden Funktionen der Virusreplikation und Virusproteinexpression durch ähnliche Mechanismen reguliert werden. Sequenzvergleiche der Nukleoproteine innerhalb der *Mononegavirales* zeigten drei konservierte Bereiche (Barr et al., 1991), die partiell eine gemeinsame Sekundärstruktur aufweisen. Auch die Polymerase L zeigte nach Sequenzvergleiche zwischen Paramyo- und Rhabdoviren eine Homologie von 85% (Poch et al., 1990). Die beiden am besten untersuchten Rhabdoviren, Tollwutvirus und Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV) weisen in der Genomorganisation ebenfalls eine hohe Ähnlichkeit auf (Tordo et al., 1986a; Tordo et al., 1986b).

Mit einem Wirtsspektrum, das Wirbeltiere, Invertebraten und Pflanzen umfasst sind diese Rhabdoviren eine der am weitesten verbreiteten Virusfamilien. Mit Ausnahme einiger bisher noch nicht zugeordneter Viren (z.B. Hematopoietic Necrosis Virus), werden Rhabdoviren in 5 Genera einteilen (Tab. 1). Die Aufteilung des Genus der Lyssaviren erfolgte zunächst aufgrund der serologischen Eigenschaften der G-Oberflächenproteine (4 Serotypen) und zunehmend anhand von RNA-Sequenzhomologien. Lyssaviren werden in 7 unterschiedliche Genotypen aufgeteilt (Tab.2). Nur für Genotyp 2 Lyssaviren konnte bisher keine Übertragung auf den Menschen beobachtet werden (Markotter et al., 2006b; Markotter et al., 2006a).

**Tabelle 1: Nicht segmentierte Negativstrang RNA Viren (Ordnung *Mononegavirales*)** (Murphy F.A. et al., 1995)

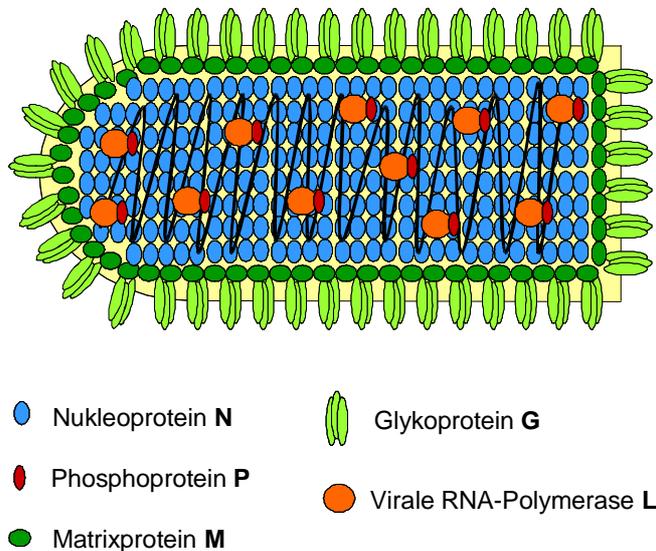
<b>Familie</b>	<b>Unterfamilie</b>	<b>Gattung</b>	<b>Vertreter</b>
<i>Rhabdoviridae</i>		<b>Lyssavirus</b> Vesiculovirus Ephemerovirus Nucleorhabdovirus Cytorhabdovirus keinem Genus zugeordnet	<b>Rabies Virus</b> Vesicular Stomatitis Virus (VSV) Bovine Ephemeral Fever Virus Sonchus Yellow Net Virus Lettuce Necrotic Yellow Virus Infectious Hematopoietic Necrosis Virus
<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Paramyxovirinae</i>	Paramyxovirus  Rubulavirus  Morbillivirus Hendravirus	Sendai Virus Parainfluenza Virus Typ 1 und 3 Mumps Virus Parainfluenzavirus Typ 2 und 4 Masern Virus Hendravirus, Nipahvirus
	<i>Pneumovirinae</i>	Pneumovirus	Respiratorisches Synzytialvirus
<i>Filoviridae</i>			Marburgvirus Ebolavirus
<i>Bornaviridae</i>			Borna Disease Virus

**Tabelle 2: Klassifizierung der Lyssaviren in 7 Genotypen.**

<b>Gattung</b>	<b>Genotyp</b>	<b>Vertreter</b>
Lyssavirus	Genotyp 1	<b>Rabies Virus</b>
	Genotyp 2	Lagos Bat Virus
	Genotyp 3	Mokola Virus
	Genotyp 4	Duvenhage-Virus
	Genotyp 5 und 6	European Bat Lyssavirus Typ 1 und 2
	Genotyp 7	Australian Bat Lyssavirus

## 1.2 Struktur und Genomorganisation

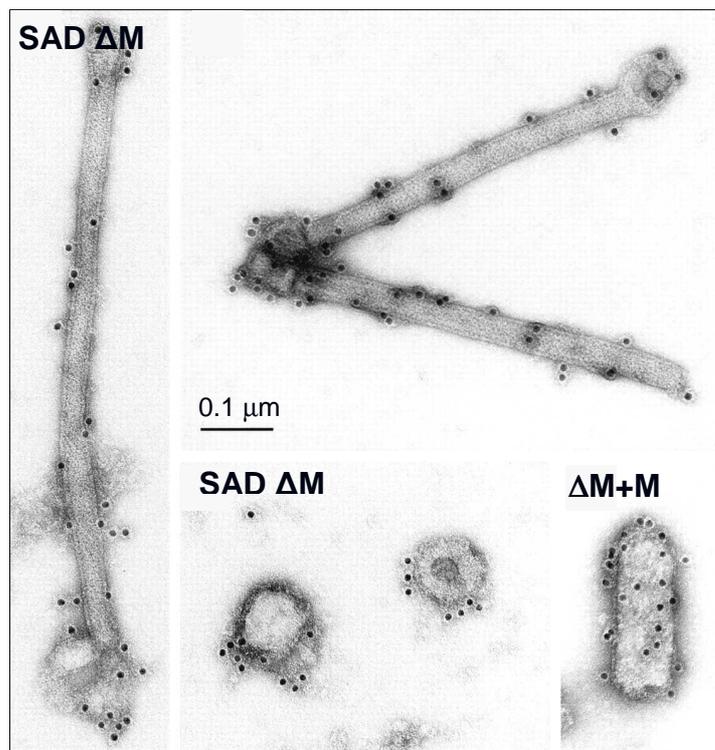
Die Viruspartikel (Virionen) der Rhabdoviren sind von einer Lipidhülle umgeben. Der Ursprung der Lipidhülle liegt in der Zellmembran der infizierten Wirtszelle, die bei der Freisetzung des Virions durch Knospung (*Budding*) das virale Genom und die viralen Proteine umschließt. Die infektiösen Partikel sind stäbchenförmig und ähneln optisch einer Gewehrpatrone (*bullet shaped*). Der Aufbau eines Virions ist mit nur 5 Proteinen bemerkenswert einfach (Abb.2).



**Abbildung 2: Aufbau eines Tollwutvirions.** Der helikale Ribonukleoproteinkomplex (RNP), bestehend aus N, P und L und der viralen RNA, wird durch das Matrixprotein kondensiert und bildet eine geschossähnliche Form. Das Virion ist umgeben von einer Lipidhülle, in der die Glykoproteine als Trimere eingebettet sind.

Das Matrixprotein und das Glykoprotein stellen die Hüllstrukturproteine dar. Das Matrixprotein ist mit der Innenseite der Membran assoziiert und vermittelt vermutlich die Interaktion zwischen RNP und der Virushüllmembran. Als Hüllstrukturprotein ist es zusammen mit dem Glykoprotein für die Partikelbildung und für den Austritt der Virionen aus der Zelle verantwortlich. Ein M-defizientes Virus zeigt kaum nachweisbare Assembly- oder Buddingaktivitäten und ist nicht pathogen (Mebatsion et al., 1999). Zusätzlich verliert die Deletionsmutante die typisch geschossähnliche Form (Abb.3). G ist ein glykosyliertes Protein, welches über eine hydrophobe Transmembran-Domäne im C-terminalen Bereich in der Hüllmembran

des Virus verankert ist. Es bildet als Homotrimer auf der Außenseite des Virions *Spikes*, die an der Adsorption der Viruspartikel an zelluläre Rezeptoren beteiligt sind. Zusätzlich vermitteln die *Spikes* die Membranfusion des Virions mit der Wirtszelle. Ein kurzer C-terminaler Bereich stellt den zytoplasmatischen Teil des Glykoproteins dar (Anilionis et al., 1981), welcher vermutlich eine Verbindung zwischen G und M vermittelt. G ist nicht essentiell für die Knospung von Viren (*Budding*) und Virus-Morphogenese (*Assembly*), jedoch sind G defiziente Viren nicht infektiös (Mebatsion et al., 1996).



**Abbildung 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer M-Deletionsmutante (SAD  $\Delta$ M) des Tollwutvirus.** Nach der Immunogoldfärbung mit MAb gegen das Glykoprotein zeigen Aufnahmen im Elektronenmikroskop, dass Virionen des SAD  $\Delta$ M-Virus statt der geschossähnlichen Struktur entweder stäbchenförmige oder runde Strukturen ausweisen (vermutlich Querschnitte von stäbchenförmigen Virionen). Dieser Effekt wird durch die zusätzliche Expression des Matrixproteins aufgehoben (Mebatsion et al., 1999).

Das RNA Genom des RV hat eine Größe von 12 kb und konnte erstmals für die Stämme PV (11932 nt) und SAD B19 (11928 nt) vollständig entschlüsselt werden (Tordo et al., 1986; Tordo et al., 1988; Conzelmann et al., 1990). Es besteht aus einer nichtsegmentierten einzelsträngigen RNA negativer Polarität, die zusammen

mit dem Nukleoprotein N, dem Phosphoprotein P und der Polymerase L das helikale Ribonukleoprotein-Komplex (RNP) bildet. Das Nukleoprotein umschließt die RNA vollständig und bildet so ein RNase-resistentes Nukleokapsid. Vermutlich dient dies zusätzlich als Schutz der RNA vor der Erkennung des Immunsystems (Albertini et al., 2006). Die Polymerase L bildet mit P den viruseigenen Polymerase-Komplex (Arnheiter et al., 1985) und stellt dabei die enzymatische aktive Untereinheit des RNPs dar. Das Phosphoprotein ist ein nicht-katalytischer Ko-Faktor der Polymerase (Canter and Perrault, 1996; Banerjee, 1987a) und fungiert bei der Verpackung der RNA als Chaperon für das Nukleoprotein (Mavrakis et al., 2006). Durch die Bildung stabiler N-P Komplexe wird verhindert, dass das Nukleoprotein unspezifisch zelluläre RNA inkorporiert und der Verpackung der viralen RNA in RNPs zur Verfügung steht. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das Phosphoprotein eine weitere wichtige Funktion erfüllt. Als Interferon-Antagonist verhindert es in der Wirtszelle die Aktivierung viraler Abwehrmechanismen (Brzózka et al., 2006).

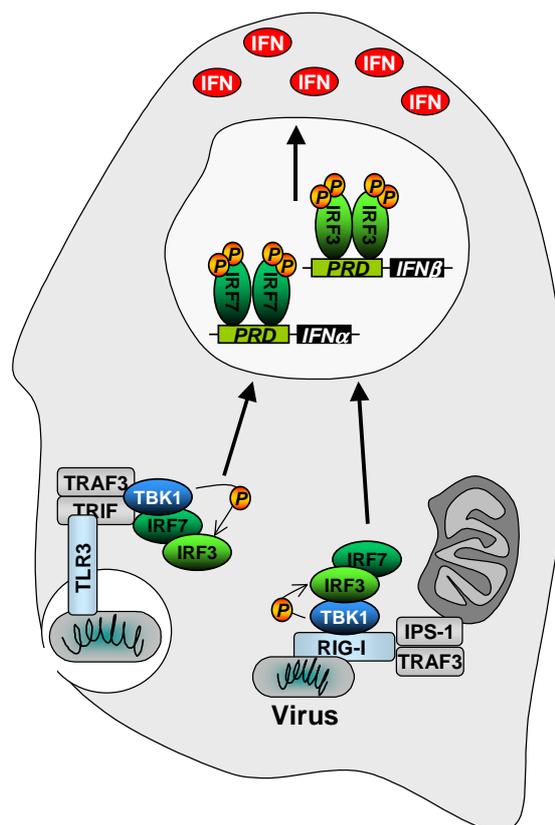
### 1.2.1 Antivirale Interferonantwort und Tollwutinfektion

Interferone sind Zytokine, die eine Hauptrolle bei der Aktivierung direkter antiviraler Abwehrmechanismen und der Regulation des adaptiven Immunsystems spielen. Die Relevanz der Interferone wird deutlich, wenn man die fehlende Immunantwort in IFN-defizienten Mäusen gegen verschiedene Viren beobachtet (Basler CF, García-Sastre A, 2002).

Es werden grundsätzlich drei Typen von Interferonen (IFN) unterschieden. TypI Interferone (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ ) werden als Antwort auf eine virale Infektion produziert und ausgeschüttet. Hauptinduktor der IFN-Synthese sind 5'-triphosphat- und doppelsträngige RNA-Moleküle. IFN wird in den meisten Zelltypen, jedoch besonders in plasmazytoiden Zellen (pDC), synthetisiert. Die Expression der TypII Interferon-Gene, IFN- $\gamma$ , ist auf aktivierte CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten und *natural killer* (NK) Zellen beschränkt. Beide Interferon-Typen fungieren mit unterschiedlichen Spezifikationen als Immunmodulatoren, die einen Effekt auf fast alle Phasen der angeborenen und adaptiven Immunreaktion haben (Goodbourn et al., 2000).

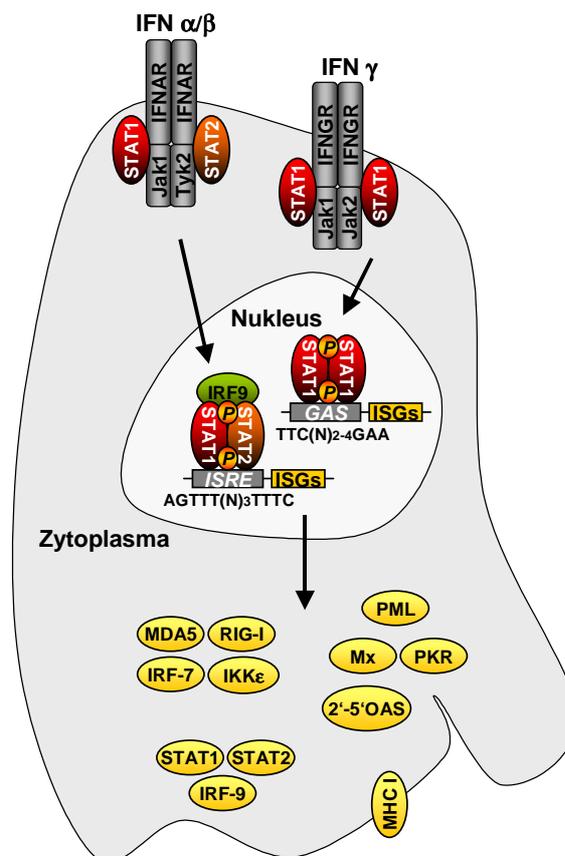
### 1.2.1.1 Induktion von IFN $\alpha/\beta$

Viren können durch intra- und extrazelluläre Rezeptoren erkannt werden, zu denen die membranassoziierten Toll-like Rezeptoren (TLRs) oder die intrazellulären RIG-like Rezeptoren, wie RIG-I (retinoic acid inducible gene) oder MDA5, gehören. Nachdem ein Pathogen erkannt wurde, führt dies zur Aktivierung von Signalübertragungs-Kaskaden, die in der Phosphorylierung von IRF-3 oder IRF-7 (*interferon regulatory factor*) münden. Aktivierte IRFs fungieren im Zellkern als Transkriptionsfaktoren und induzieren die Transkription der Interferongene (Yoneyama et al., 2002; Yoneyama et al., 1998; Lin et al., 1998; Lin et al., 1999) (Abb.4).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Interferoninduktion.** Pathogene können über ihre sogenannten PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) von verschiedenen extra- sowie intrazellulären Rezeptoren erkannt und gebunden werden. Die Rekrutierung von TBK-1 (TANK-binding kinase-1) an die rezeptorgebundenen Komplexe führt zur Phosphorylierung von IRF-3 oder IRF-7, die anschließend in den Zellkern transportiert werden und als Transkriptionsfaktoren die Synthese des Typ I Interferons stimulieren.

Die Expression zahlreicher antiviraler und immunstimulierender Proteine wird durch IFN reguliert. Nach der Bindung von IFN an die Rezeptoren bilden sich Homodimere aus phosphoryliertem STAT-1 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) (IFN- $\gamma$ ) oder Heterodimere mit phosphoryliertem STAT-2 (IFN- $\alpha/\beta$ ), die in den Zellkern einwandern und dort die Expression verschiedener antiviraler Proteine stimulieren (Abb.5).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Induktion antiviraler Proteine.** Durch die Bindung von Interferon an den Rezeptoren werden STAT-1 und STAT-2 phosphoryliert, die dann als Homodimere oder Heterodimere in den Zellkern wandern und dort die Synthese antiviraler Proteine stimulieren.

IFN regulierte Genprodukte können direkte oder indirekte antivirale Effekte haben (Sarkar and Sen, 2004; Samuel, 2001) und auf verschiedenen Ebenen aktiv sein. So wirken sie z.B. als Inhibitoren der Virus-Transkription/-Replikation wie das Interferon-stimulierbare Gen (ISG)-20 (Staehele, 1990) und Mx (Meier et al., 1990).

Auch auf der Ebene der Virustranslation gibt es viele Möglichkeiten zur Intervention wie z.B. durch die Proteinkinase R (PKR) oder die 2'-5'-Oligoadenylase (OAS) (Costa-Pereira et al., 2002). In beiden Fällen ist das Vorhandensein viraler RNA für eine Aktivierung des Abwehrsystems notwendig.

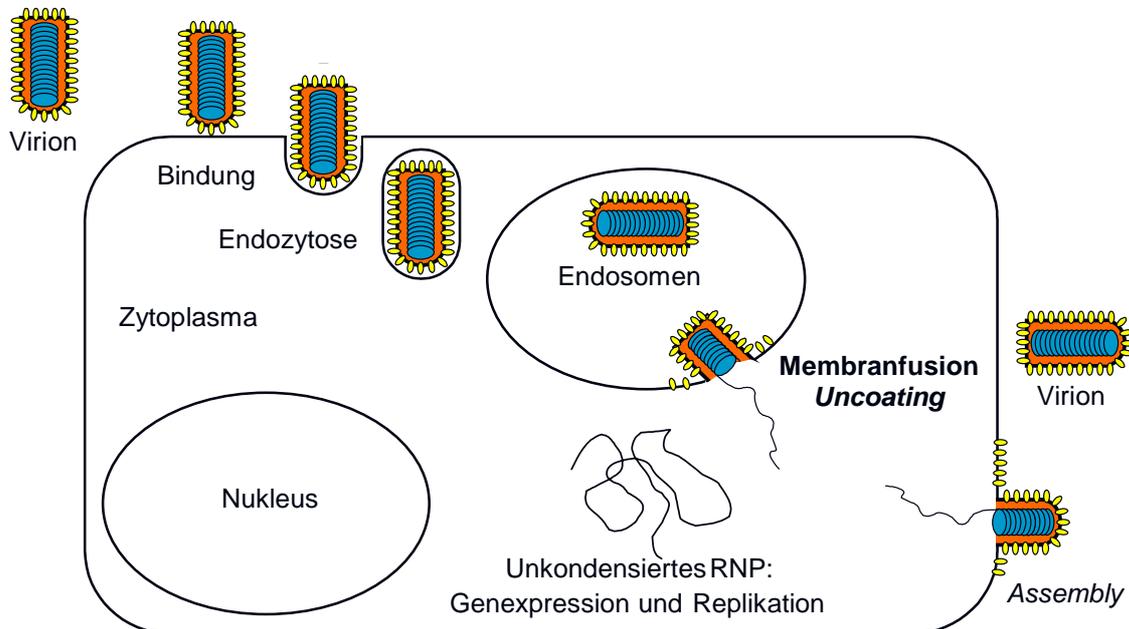
### 1.2.1.2 Inhibition der IFN Induktion durch das Phosphoprotein

Für das Tollwutvirus konnte gezeigt werden, dass das Phosphoprotein die Schlüsselrolle bei der Inhibition IFN-regulierter antiviraler Mechanismen spielt. P blockiert zum einen die Phosphorylierung des IRF-3 durch TBK-1, weshalb keine IRF-3-Dimerisierung stattfinden kann. Da dieses Dimer als Transkriptionsfaktor für die Induktion der beta-Interferonsynthese verantwortlich ist, wird die Signalkaskade an dieser Stelle unterbrochen und eine zelluläre Immunabwehr bleibt aus (Brzózka et al., 2005). Zusätzlich ist das Phosphoprotein in der Lage, an einer weiteren Stelle der Immunabwehr zu intervenieren. Es bindet phosphoryliertes STAT1 und STAT2, die somit nicht in den Zellkern transportiert werden. Sie erfüllen daher nicht mehr ihre Funktion als Transkriptionsfaktoren für die Expression antiviraler Proteine (Brzózka et al., 2006).

## 1.3 Der Replikationszyklus des Tollwutvirus

Der erste Schritt einer Virusinfektion erfolgt durch die Bindung der Oberflächenglykoproteine an zelluläre Rezeptoren (Tuffereau et al., 1998a). Als zelluläre Rezeptoren des RV wird der nicotinsäureabhängige Acetylcholinrezeptor (nACh) (Lentz et al., 1983), NCAM (*neural cell adhesion molecule*) (Thoulouze et al., 1998) und ein Neurotrophinrezeptor (p75<sup>NTR</sup>) (Tuffereau et al., 1998b) diskutiert. Nach rezeptorvermittelter Endozytose wird das Vesikelinnere angesäuert, woraufhin die Membrane von Virion und Endosomen verschmelzen und der RNP-Komplex in das Zytoplasma der Wirtszelle freigesetzt wird. Das Matrixprotein dissoziiert dabei vom RNP, welches dann im unkondensierten Zustand im Zytoplasma vorliegt. So kann die viruseigene RNA-Polymerase ungehindert an den RNPs entlangwandern und die viralen Gene transkribieren. Nach mRNA-Transkription und RNA-Replikation

werden neu synthetisierte Virus RNPs durch das Matrixprotein kondensiert und als neue umhüllte Virionen durch Knospung (Budding) an der Zytoplasmamembran der Wirtszelle freigesetzt (Abb.6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des Replikationszyklus des Tollwutvirus.** Nach der Bindung des Virions an einen zellulären Rezeptor, wird es über Endozytose aufgenommen. Nach Ansäuerung der Endosomen verschmilzt die Membrane des Virions mit der des Endosoms und das RNP wird in das Zytoplasma der Wirtszelle entlassen, wo die virale Transkription und RNA-Replikation erfolgt. Anschließend werden die RNPs durch M (rot) kondensiert und als umhüllte Viren in den Überstand freigesetzt.

## 1.4 Transkription und RNA-Replikation

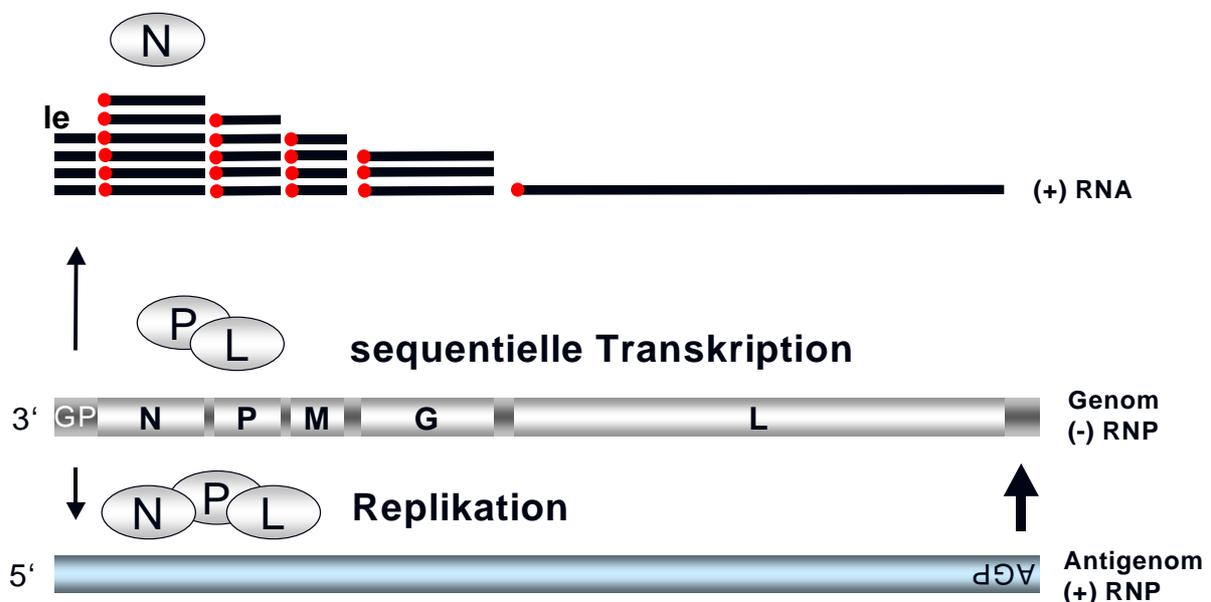
Die Tollwutvirus Transkription und Replikation erfolgt ausschließlich im Zytoplasma der infizierten Zelle. Sowohl die genomische RNA negativer, als auch antigenomische RNA positiver Polarität, liegen in der infizierten Zelle als RNP-Komplex vor. Nur die RNPs, nicht aber freie RNA, werden von der RNA-Polymerase als Matrize (*Template*) erkannt. Am 3'-Promotor (Genompromotor, GP) beginnt die Transkription der subgenomischen RNAs und die replikative Synthese des Antigenoms. Im Gegensatz dazu kann vom 3'-terminalen Promotor des Antigenoms (Antigenompromotor, AGP) nur die Replikation initiiert werden (Abb.7).

Neben den 5'-gecappten und polyadenylierten Protein-kodierenden mRNAs wird beginnend am 3'-Ende des Genoms eine kurze, nicht-gecappte und nichtpolyadenylierte *leader*-RNA (55 – 58 nt lang) synthetisiert. Ein Signal innerhalb der *leader*-Sequenz ist für die Verpackung der RNA in RNPs verantwortlich (Blumberg et al., 1983). Nach der *leader*-RNA-Synthese werden 5 monocistronische RNAs synthetisiert, die am 3' Ende polyadenyliert sind und am 5' Ende eine CAP-Struktur aufweisen (Banerjee, 1987b). Diese Modifikation der mRNA erfolgt durch den viruseigenen RNA-Polymerase-Komplex, da die entsprechenden Modifikationen der zellulären mRNAs im Zellkern erfolgen und dementsprechend die dazu benötigten zellulären Enzyme im Nukleus lokalisiert sind, nicht aber im Zytoplasma, dem Ort der Tollwutvirus RNA-Synthese.

Das Genom ist das *Template* für die Synthese von 6 subgenomischen RNAs. Die Transkription ist obligat sequenziell. Zunächst wird die *leader*-Sequenz transkribiert. Bei der weiteren Transkription dissoziiert ein Teil der Polymerasen vom *Template*. Da in diesen Fällen keine Reinitiation der mRNA-Synthese stattfindet, entsteht ein Transkriptionsgradient, wobei vom 3' Ende zum 5'-Ende des viralen Genoms die Menge der neusynthetisierten mRNA abnimmt. Dies konnte erstmals anhand von Untersuchungen mit VSV gezeigt werden (Iverson and Rose, 1981). Die Lokalisation der viralen Gene bestimmt demnach die Höhe der Expression. Das im 3'-terminalen Bereich kodierte N-Protein wird demnach in großen Mengen synthetisiert. Dies ist sinnvoll, da N als Strukturprotein für die Verpackung der Virus-RNA in RNPs in großen Mengen benötigt wird. Die am 5'-terminalen Ende kodierte enzymatische Untereinheit der RNA-Polymerase L wird dagegen nur in geringen Mengen für die Virusreplikation benötigt.

Eine Besonderheit der RNA-Polymerasen von Negativ-Strang RNA-Viren ist ihre duale Funktion als RNA-Replikase und als Transkriptase. Die Regulation der unterschiedlichen Polymerasefunktionen ist bis heute nur unvollständig verstanden. Insbesondere das Umschalten der Polymerasefunktion vom Transkriptase- zum Replikasemodus, in dem die internen Transkriptionssignale überlesen werden, ist Gegenstand aktueller Fragestellungen. Lange wurde für VSV postuliert, dass das Nukleoprotein (N) die Regulation der Polymeraseaktivitäten verantwortlich ist (Blumberg et al., 1983; Blumberg et al., 1981). Im Gegensatz zum Transkriptionsmodus benötigt die Polymerase von Negativ-Strang RNA-Viren im Replikationsmodus zusätzlich Nukleoprotein (Abraham and Banerjee, 1976; Ball and

White, 1976). Es wurde postuliert, dass das Nukleoprotein koreplikativ mit dem Genprodukt der *leader*-RNA (*le*) verpackt die Polymerase so modifiziert, dass sie die *leader*/N-Sequenz überliest und ein vollständige Antigenom-Kopie des RNP-Template synthetisiert (Blumberg et al., 1981). Für unterschiedliche *Mononegavirales* konnte allerdings gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit des Nukleoproteins zwar essentiell für die RNA-Replikation ist und die RNA-Syntheserate bestimmt, eine Veränderung im Verhältnis von Replikation und Transkription konnte aber nicht beobachtet werden (Fearn et al., 1997; Wertz et al., 1998). Die Regulation der RNA-Synthese wird demnach nicht nur durch das Nukleoprotein bestimmt.



**Abbildung 7: Tollwutvirus mRNA-Transkription und RNP-Replikation.** Die Polymerase des Tollwutvirus fungiert als Transkriptase und Replikase. Die mRNA wird sequentiell synthetisiert, durch die Dissoziation an den Gengrenzen entsteht ein Gradient. Für die Replikation benötigt die Polymerase zusätzlich das Nukleoprotein, die ko-transkriptionelle Verpackung führt zum Überlesen der Gengrenzen. Das Antigenom dient anschließend als Matrize zur Synthese des Virus-Genoms. Das Verhältnis von Antigenom und Genom wird durch die Aktivitäten der jeweiligen Promotoren bestimmt. Modifiziert aus (Finke and Conzelmann, 2005).

### 1.4.1 Das Matrixprotein als Regulator der viralen RNA-Synthese

Obwohl für VSV bereits frühzeitig eine selektive Transkriptionshemmung durch M gezeigt und eine regulatorische Funktion des M Proteins auf die RNA-Polymerasefunktion postuliert wurde (Carroll and Wagner, 1979), wurde die Regulationsfunktion des M Proteins erst mit der Entdeckung des regulatorischen Einflusses des Tollwutvirus M Proteins auf die virale Polymerasefunktion weiter verfolgt.

Ein M-Gen-deletiertes Tollwutvirus zeigte eine erhöhte Transkriptionsrate und eine signifikante Abnahme der Replikation, was ein klarer Hinweis für das Matrixprotein als Regulator der RNA-Synthese ist (Finke et al., 2003). Das Matrixprotein hat demnach eine Doppelfunktion, da es neben der RNA-Regulation als Hüllstrukturprotein an der Kondensierung der RNPs und an den Budding- und Assemblyereignissen beteiligt ist. Dass dies in der Tat zwei voneinander unabhängige Prozesse sind, konnte durch weitere Experimente gezeigt werden. Die Relokalisation von M an das distale Ende des Genoms hatte eine veränderte RNA-Synthese zur Folge, während das Virus die Fähigkeit beibehalten hatte, infektiöse Partikel zu bilden (Finke et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse konnten mit einer Mutante erzielt werden, die an einer Stelle im Matrixprotein eine Punktmutation aufwies. Das Virus zeigte eine deutliche Steigerung der Transkriptionseffizienz und war in der Replikation attenuiert (Finke and Conzelmann, 2003).

Nachdem so geklärt werden konnte, dass das Matrixprotein an der Regulation der RNA-Synthese beteiligt war, blieb die Frage nach dem Mechanismus der RNA-Polymerase Regulation durch das M Protein offen. Dies ist u.a. für den möglichen Einsatz des Tollwutvirus als viraler Vektor von Interesse, da eine regulierbare Genexpression eine wichtige Voraussetzung dafür ist.

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus dieser Regulation zu entschlüsseln. Durch Mutationsanalysen sollte das Matrixprotein an einzelnen Stellen modifiziert werden. In einem phänotypischen *Screen*, der auf einem *in trans*-Komplementierungstest basiert, sollten M-Mutanten identifiziert werden, die Defekte in der RNA-Synthese Regulation haben, die aber im Virus-Assembly noch intakt sind. Zusätzlich zu den *in trans*-Komplementierungen von M-Gen deletierten Tollwutviren sollten geeignete Mutanten in rekombinante Tollwutviren eingebaut und

stabil exprimiert werden. Mit Hilfe der rekombinanten Viren sollten zum einen die beobachteten Phänotypen im vollständigen Viruskontext bestätigt werden, zum anderen sollten die rekombinanten Viren die Grundlage bieten für eine genauere Untersuchung der Mechanismen der RNA-Syntheseregulation durch das Matrixprotein. Dabei standen Fragen zur Interaktion der viralen Proteine sowie zur intrazellulären Lokalisation der Transkriptions-/Replikationsmaschinerie in der Zelle und deren Einfluss auf die RNA-Synthese Regulation im Vordergrund. Parallel zu diesen funktionellen Untersuchungen sollte in einem methodischen Teil dieser Arbeit eine real-time PCR zur Detektion und Quantifizierung der viralen RNA-Moleküle etabliert werden.

## Kapitel 2: Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Dynal (Protein G Dynabeads), BD (Agar, Bactotrypton, Hefeextrakt), Biorad (Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1), Boehringer Mannheim/Roche (Proteaseinhibitoren Complete™, Heringsperma DNA, DTT), Fluka (Dextransulfat, MgCl<sub>2</sub>, NP40, Tricin, Xylencyanol), Fresenius Kabi Norge AS (OptiPrep™), GE General Electric (α-<sup>32</sup>P-CTP, α-<sup>32</sup>P-rUTP, Protein A Sepharose), ICN Biochemicals Inc. (APS), J.T.Baker (Isopropanol), Life Technologies/Invitrogen (Agarose), Merck (CaCl<sub>2</sub>, DMSO, Ethidiumbromid, Formamid, Glutaraldehyd, K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, K<sub>4</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Methanol, MgSO<sub>4</sub>, NaAc, NaCl, Na-citrat, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH, NH<sub>4</sub>Cl, Orange G, Paraformaldehyd, Phenolrot, Triton X-100), Roth (Aceton, DEPC, Ethanol, Essigsäure, Formaldehyd, Glycin, Glycerin, HCl, Harnstoff, Methanol, β-Mercaptoethanol, Magermilchpulver, PIPES, SDS, Tricin, Tris-HCl, TEMED, Tween-20, Polyethylenglykol 4000), Sigma-Aldrich (ATP, Ampicillin, Bromphenolblau, Butyryl-cAMP, Cytosine-β-D-arabinofuranoside, EGTA, Ficoll, Kanamycin, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, PMSF, TEMED, Uridin), Serva (Polyvinylpyrrolidon, Serdolit MB1) und VWR (EDTA) bezogen.

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham Bioscience (ECL-Hyperfilme), Beckmanns (Zentrifugenröhrchen), Eppendorf (Eppendorfhütchen Safe-Lock Tubes, PCR-Reaktionsgefäße), Falcon (Polystyrolröhrchen, Zellkulturplatten, Zellkulturschalen), Kodak (Röntgenfilme), Millipore (Sterilfilter), Nunc (Gewebekulturflaschen), Roth (Gel-Blotting-Papier), Schleicher & Schuell (Nitozellulose-Membran), Strategene (Duralon-UV™ Membran) und VWR (Whatmanpapier) bezogen.

### 2.1.3 Geräte

Agarosegelgießapparatur:	PeqLab
Brutschrank mit CO <sub>2</sub> -Begasung:	Sanyo
Filmentwicklermaschine OptimaxTR:	MS Laborgeräte
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 35:	Zeiss
Fluoreszenz-Laser-Mikroskop LSM 510:	Zeiss
Gelelektrophoresekammern (horizontal):	PeqLab, Owl Separation Systems
Gelelektrophoresekammern (vertikal):	PeqLab, Owl Separation Systems
Gelblotter:	PeqLab, Owl Separation Systems
Glasgeräte:	Schott
Hybridisierungsschrank:	UVP, HB-1000
Invertmikroskop:	Nikon
LightCycler 2.0:	Roche
LC CarouselCentrifuge 2.0:	Roche
Luminometer:	Berthold
Magnetrührer:	VELPScientifica
PAA-Gelgießapparatur:	Marke Eigenbau
Photoapparatur Eagle Eye:	BioRad
Photometer:	Eppendorf
Phospho-Imager StormScan:	Molecular Dynamics
Bildplatten:	Molecular Dynamics
Radioaktivmessgerät LB122:	Berthold
Schüttler:	EB Swip
Spannungsgeräte:	PharmaciaBioTech
Sterile Werkbänke:	BDK
Thermocycler:	Biometra
Transilluminator:	Bachhofer (254nm)
Thermomixer:	Eppendorf, Schuttron
UV-Crosslinker:	MS Laborgeräte
Vortex, MS1 Minishaker:	IKA
Wet-Blotter System:	Owl Separation Systems
Zentrifugen:	
Tischzentrifuge:	Heraeus
Tischkühlzentrifuge:	Eppendorf, 5417R
Tischultrazentrifuge:	Beckmann OptimaTLX
Kühlzentrifuge:	Heraeus 3.0R
Ultrazentrifuge:	Beckmann L8-55M

### 2.1.4 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Restriktionsendonukleasen, BSA, T4-DNA Ligase, *Pfu*-Polymerase), Böhlinger Mannheim (Micrococcal Nuclease S7), Biomaster (*Taq*-Polymerase) und Stratagene (Reverse Transkriptase) bezogen.

### 2.1.5 Serologische Reagenzien

Kaninchen $\alpha$ -Aktin, polyklonal	Sigma
$\alpha$ -Kaninchen-IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova
$\alpha$ -Huhn-IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova
$\alpha$ -Maus-IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova
$\alpha$ -Kaninchen-IgG, AlexaFluor <sup>®</sup> 633 konjugiert	Molecular Probes
$\alpha$ -Kaninchen-IgG, AlexaFluor <sup>®</sup> 488 konjugiert	Molecular Probes
$\alpha$ -Maus-IgG, AlexaFluor <sup>®</sup> 633 konjugiert	Molecular Probes
$\alpha$ -Maus-IgG, AlexaFluor <sup>®</sup> 488 konjugiert	Molecular Probes
$\alpha$ -Kaninchen-IgG, TexasRed <sup>®</sup> konjugiert	Dianova
Kaninchen $\alpha$ -M (M2D4, M1B3), Peptidseren	gestellt von Prof. Conzelmann
Kaninchen $\alpha$ -N/P (S50), Peptidserum	gestellt von Prof. Conzelmann
Maus $\alpha$ -P (26G6), monoklonal	gestellt von D. Blondel

### 2.1.6 Polyklonales Peptidserum gegen Phosphoprotein aus Kaninchen

Zur Analyse des Phosphoproteins wurde eine Peptidsynthese in Auftrag gegeben und ein Peptid aus der P-Sequenz synthetisiert (NRNIEDNQAHLQGEPC). Mit diesem Peptid wurden je zwei Kaninchen immunisiert (Metabion), um ein polyklonales Serum zu gewinnen. Die Tiere wurden dreimal im Abstand von 5 Tagen vor der ersten Blutung mit diesem Peptid immunisiert. Die Seren wurden mit ELISA auf Reaktion mit dem Antigen getestet. Am Abstand von 7 Tagen wurde anschließend zweimal immunisiert, bevor das Serum aus den Tieren gewonnen

wurde. Die Präimmunseren und Immunseren FCA 1 wurden von der Firma Metabion bezogen und in unserem Labor charakterisiert.

### 2.1.7 Zellkulturmedien und Puffer

BHK-21 Medium (Glasgow MEM)  
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)  
Tryptosephosphat-Broth 50x  
Penicillin- Streptomycin- Lösung (P/S)  
MEM-Amino Acids, 50x  
Dulbecco's PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ )  
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1mM Na-EDTA)  
Fötale Kälberserum (FKS)  
Neugeborenes Kälberserum (NKS)

### 2.1.8 Sonstige Puffer

Anodenpuffer: 200mM Tris-HCl pH [8,9]  
Kathodenpuffer: 100mM Tris-HCl pH [8,25]; 100 mM Tricin; 0,1% (w/v) SDS  
TAE-Puffer: 400mM Tris-HCl pH [7,8]; 5mM NaAc; 5mM EDTA

Weitere Puffer sind bei der jeweiligen Methode angegeben.

### 2.1.9 Verwendete kommerziell erhältliche „Kits“

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden für diese Arbeit verwendet: Nick Translation Kit (Amersham Bioscience), Riboprobe<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Combination System T3/T7, Dual Luciferase Reporter System (Promega); Nucleobond AX100 (Macherey-Nagel); Western Blot Chemiluminescence Reagent *Plus* (NEN); QiaQuick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit, QiaQuick<sup>®</sup> Nucleotide Removal Kit, QiaQuick<sup>®</sup> PCR Purification Kit, Rneasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen); Mammalian Transfection

Kit (Stratagene); FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), Light Cycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> Hybridization Probes (Roche).

### 2.1.10 Weitere Reagenzien

1 kb DNA-Leiter (LifeTechnologies), Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards (Bio-Rad), dNTP Set (Bioline), RNasin (Pharmacia), RNALadder (Invitrogen).

### 2.1.11 Nukleinsäuren, Virusstämme, Bakterien, Zellen

#### 2.1.11.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide und Hybridisierungsproben für die quantitative PCR wurden von der Firma Metabion bezogen. Veränderte Nukleotide in Mutagenese-*Primern* sind unterstrichen und kursiv hervorgehoben. Die Oligonukleotide werden jeweils in 5´-3´ Orientierung angegeben. Die Nukletidsequenzen von Primern und Hybridisierungssequenzen, die in der qRT-PCR verwendet wurden, sind in Kap.2.2.1.3.5. gesondert aufgeführt.

<u>Bezeichnung</u>	<u>Sequenz</u>
M-20AA	GACACTCAAAAATCC <u>GCTGCAGCGTCAGCCCCTC</u>
20rev	GGATTTTTGAGTGCCTCGTCCCTGC
M-31A	TGGATGACGATGAC <u>GCT</u> TGGCTTCCACCCCCTG
31rev	GTCATCGCTATCCAGAGGGGCTGAC
M-32A	TGGATGACGATGACTT <u>GCT</u> TTCACCCCCTG
M-32RM	TGGATGACGATGACTT <u>GCGCAT</u> GCCACCCCCTG
M-33A	GACGATGACTTGTGG <u>GCCC</u> ACCCCCTG
33rev	CCACAAGTCATCGTCATCCAGAGGG
M-34AAA	ACGATGACTTGTGGCTT <u>GCTGCAGCGGA</u> ATACGTCC
M-45A	CGCTGAAAGAACTT <u>GCAGGCAAGA</u> AACATGA
45rev	AAGTTCTTTCAGCGGGACGTATTCAGG
M-47A	CGCTGAAAGAACTTACAGGC <u>GCA</u> AAGAACATGA
M-51A	GCAAGAAGAACATG <u>GCT</u> AACTTTTGTATCAACG
51rev	CATGTTCTTCTTGCCTGTAAGTTCTTT
M-52A	GCAAGAAGAACATGAGGG <u>CA</u> TTTTGTATCAACG

M-53A GCAAGAAGAACATGAGGAACGCTTGTATCAACG  
M-55A ACATGAGGAACTTTTGTGCCAACGGAAGGGTTA  
54rev AAAGTTCCTCATGTTCTTCTTGCCTGTAA  
M-64A GGGTTAAAGTGTGTAGCGCAAATGGTTACTCGT  
63rev ACACACTTTAACCCCTTCCGTTGATACA  
M-67A TGTGTAGCCCGAATGGTGCCTCGTT CAGGATCC  
66rev ATTCGGGCTACACACTTTAACCCCTTC  
M-75AAA GGATCCTGCGGCACGCTGCAGCGTCATT CGACT  
75rev GTGCCGCAGGATCCTGAACGAGTAA  
M-78AAA GGCACATTCTGAAAGCTGCAGCGGGAGATATATT  
78rev TTTCAGAATGTGCCGCAGGATCCTG  
M-81AA GTCGAATGATTT CAGAATGTGCCGC  
81rev GTCGAATGATTT CAGAATGTGCCGC  
M-84AAA TCATTGACGAGATATATGCTGCAGCGCCATAGGATGA  
83rev TATCTCGTCG AATGATTTCA GAATG  
M-87AAA TATATTCTGGGAATGCTGCAGCGATCGGGTTAG  
87rev ATTCCCAGAATATATCTCGTCGAATG  
M-99R AAAGTGGTTATTGGAAGGGCccTGTCAGGATC  
99rev TCCAATAACCACTTTGACTAACCCG  
M-104AAA TGGCTTTGT CAGGAGGCTGCAGCGCCTGAGGGCC  
104rev TCCTGACAAAGCCAGTCCAATAACC  
M-104A TGGCTTTGT CAGGAGGCCCAGTCCCTGAGGGCC  
M-107AAA CAGGATCTCCAGTGCTGCAGCGCTGAACTGGG  
107rev GACTGGAGATCCTGACAAAGCCAG  
M-110AAA CAGTCCCTGAGGGCGCTGCAGCGGTATACAAAT  
110rev GCCCTCAGGGACTGGAGATGAGAT  
M-113AAA AGGGCCTGAACTGGGCTGCAGCGTGAGGAGAA  
113rev CCAGTTCAGGCCCTCAGGGACTGG  
M-119AAA ACAAATTGAGGAGAGGCTGCAGCGTTCCAGTGGG  
119rev TCTCCTCAATTTGTATACCCAGTT  
M-130AAA CTGATTCCAGGGGCGCTGCAGCGGGGGAGGAGT  
130rev GCCCCTGGAATCAGCCCACTGGAAG  
M-132A CTGATTCCAGGGGCCCTCTTGCGGGGGGAGGAGT  
M-133AAA GGGGCCCTCTTGAAGCGGCCACGTTGGAATACT  
133rev TTCAAGAGGGCCCCTGGAATCAGCC  
M-133F GGGGCCCTCTTGAATCCGAGGAGTTGGAATACT  
M-164A TGATTGCAAACAGTGT CATGCGCAGGGCAGAG  
162rev CTGTTTTGCAATCACTCTTATTTGC  
M-165A GCAAAACAGTGT CATATCGCTGGCAGAGTCT  
165rev GATATGACACTGTTTTGCAATCACTC

M-166AAA	CAAAACAGTGTTCATATCCAG <u>GCGGCCGCGTGG</u> TGTATCA
M-181AAA	AGAGCATGTCAACTA <u>GCGGCCGCGATGTCTCTTC</u>
181rev	TAGTTGACATGCTCTCGGGTTCATG
M-182A	AGAGCATGTCAACTATGG <u>GCCGACATGTCTCTTC</u>
M-184AAA	CAACTATGGTCTGAC <u>GCGGCCGCGCAGACACAAA</u>
184rev	GTCAGACCATAGTTGACATGCTCTC
M-193AAA	ACACAAAGGTCCGA <u>AAGCGGCCGCGGATTCTCTC</u>
193rev	TTCGGACCTTTGTGTCTGAAGAGAC
M-196AAA	CCGAAGAGGACAAA <u>GCGGCCGCGCTGCTTCTAG</u>
196rev	TTTGTCTCTTCGGACCTTTGTGTC
SADMtg	GACAGAGCTCTTCgATGAACCTCCTACGTAAG
SADMstop	TCTCTCGCTCTTCATTATTCTAGAAGCAGAGAG
PΔstopeco	ACGTCAGAATTCCAGCAAGATGTATAGCGATTC
NΔstopbam	ACGTCAGGATCCTGAGTCACTCGAATATG
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG
Nstop	CATCATGAAAAAACATTAGATCAGAAGAAC AACTGGGCAACACCCCTCCTTTTCG
Natg	AATACCATGGATGCCGACAAGATTG
β-Aktin <sup>+</sup>	GGCATCGTGATGGACTCC
β-Aktin <sup>-</sup>	CCGCCAGACAGCACTGTGTTGGCGTA
hamActinProbe1	FL-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-Fluo
hamActinProbe2	LCRed-640-AGATCATGTTTGAGACCTTCAACACC-Pho
hamActin-forw	GGAGAAGATCTGGCACC
hamActin-rev	CAGAGGCATACAGGGAC
RV N986+	GACCGACTAAGGACGC
RV N1068-	GCGTCCTTAGTCGGTC
RV N Probe1	FL-TCAGAGCCCAATTCCCTTCTACA-Fluo
RV N Probe2	LCRed-705-TGTAGAAGGGAATTGGGCTCTGA -Pho
TERM	AGCAGCCAACTAAGCTTC
CITE	CATGTCTTTAGTCGAGGTAA
NS1P	GTCGAATCCGACAAGCTG
G4M	GGGTACAAACAGGAGAGC

## 2.1.11.2 Plasmide

### 2.1.11.2.1 Verwendete Plasmide

pTIT	Derivat von pSKII- mit zusätzlicher interner Ribosomenbindungssequenz (IRES) und T7 Terminatorsequenz (Buchholz et al. 1999)
pTIT-M	Derivat von pTIT mit Matrixprotein-kodierender Sequenz (Finke et al., 2003)
pTIT-G	Glykoprotein kodierendes Derivat von pTIT (Finke et al., 2003)
pTIT-P	Phosphoprotein kodierendes Derivat von pTIT (Finke and Conzelmann, 1999)
pTIT-N	Nucleoprotein kodierendes Derivat von pTIT (Finke and Conzelmann, 1999)
pTIT-L	L-Polymerase kodierendes Derivat von pTIT (Finke and Conzelmann, 1999)
pT7T-P	Phosphoprotein kodierendes Derivat von pBluescript SKII- (Stratagene) mit zusätzlichen T7-Promotor- und T7-Terminatorsequenzen (Conzelmann and Schnell, 1994)
pT7T-N	Nucleoprotein kodierendes Derivat von pSKII- von pBluescript SKII- (Stratagene) mit zusätzlichen T7-Promotor- und T7-Terminatorsequenzen (Conzelmann and Schnell, 1994)
pM-YFP	M-YFP Fusionsprotein kodierendes Plasmid (erhalten von Dr. S. Finke)
pM-CFP	M-CFP Fusionsprotein kodierendes Plasmid (erhalten von Dr. S. Finke)
pECFP-N1	Enhanced Cyan Flurescent Protein kodierendes Plasmid (Clontech)
pEYFP-C	Enhanced Yellow Flurescent Protein kodierendes Plasmid (Clontech)
pDSRED	<i>Discosoma</i> sp. Red Flurescent Protein kodierendes Plasmid (Clontech)
pSADL16 $\Delta$ Sap	Derivat von pSADL16 ohne SapI-Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenzen (erhalten von Dr. S. Finke)
pSAD $\Delta$ MSap	Derivat von pSADL16 $\Delta$ Sap mit inserierter SapI Erkennungstelle im Bereich der M-Deletion (erhalten von Dr. S. Finke)
pATG2	Derivat von pTIT-M, bis zu dem 2. ATG Kodon in der M-Sequenz gekürzt (erhalten von Dr. S. Finke)
pATG3	Derivat von pTIT-M, bis zu dem 3. ATG Kodon in der M-Sequenz gekürzt (erhalten von Dr. S. Finke)
pATG4	Derivat von pTIT-M, bis zu dem 4. ATG Kodon in der M-Sequenz gekürzt (erhalten von Dr. S. Finke)
pATG5	Derivat von pTIT-M, bis zu dem 5. ATG Kodon in der M-Sequenz gekürzt (erhalten von Dr. S. Finke)
pECFP-N3- $\Delta$ ATG	Derivat von pEGFP-N3, mit ECFP Sequenz, ohne ATG Kodon (erhalten von Dr. S. Finke)
pEYFP-N3- $\Delta$ ATG	Derivat von pEGFP-N3, mit EYFP Sequenz, ohne ATG Kodon (erhalten von Dr. S. Finke)
pTIT-M $\Delta$ C13	Derivat von pTIT-M mit 13 AS Deletion im C-Terminus des M-Gens (erhalten von Dr. S. Finke)

pTITSapl                      Derivat von pTIT mit integrierter *Sapl* Erkennungsstelle (erhalten von Dr. S. Finke)

### 2.1.11.2.2 Plasmide aus dieser Arbeit

M-20AA                      Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 20-21, SP nach AA

M-31A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 31, L nach A

M-32A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 32, W nach A

M-32RM                     Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 32-33, WL nach RM

M-33A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 33, L nach A

M-34AAA                    Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 34-36, PPP nach AAA

M-45A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 45, T nach A

M-47A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 47, K nach A

M-51A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 51, R nach A

M-52A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 52, N nach A

M-53A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 53, F nach A

M-55A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 55, I nach A

M-64A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 64, P nach A

M-67A                        Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 67, Y nach A

M-75AAA                    Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 75-77, ILK nach AAA

M-78AAA                    Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 78-80, SFD nach AAA

M-81AA                     Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 81-82, EI nach AA

---

M-84AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 84-86, SGN nach AAA
M-87AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 87-89, HRM nach AAA
M-99R	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 99, G nach R
M-104AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 104-106, SPV nach AAA
M-104A	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 104, S nach A
M-107AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 107-109, PEG nach AAA
M-110AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 110-112, LNW nach AAA
M-113AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 113-115, VYK nach AAA
M-119AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 119-121, TFI nach AAA
M-130AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 130-132, PLE nach AAA
M-132A	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 132, E nach A
M-133AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 132, GEE nach AAA
M-133F	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 133, G nach F
M-164A	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 164, I nach A
M-165A	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 165, Q zu A
M-166AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 166-168, GRV nach AAA
M-181AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 181-183, WSD nach AAA
M-182A	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 182, S nach A
M-184AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 184-186, MSL nach AAA
M-193AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 193-195, EDK nach AAA

M-196AAA	Derivat des pTIT-M Plasmids mit einer Mutation entsprechend der aa-Position 196-198, DSS nach AAA
pP-CFP	Derivat von pT7T-P mit zusätzlicher CFP
pP-YFP	Derivat von pT7T-P mit zusätzlicher YFP
pN-CFP	Derivat von pT7T-N mit zusätzlicher CFP
pN-YFP	Derivat von pT7T-N mit zusätzlicher YFP
pSAD20AA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 20-21
pSAD34AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 34-36
pSAD35AA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 35-36
pSAD47A	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 47
pSAD99R	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 99
pSAD104AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 104-106
pSAD130AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 130-132
pSAD132A	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 132
pSAD193AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 193-195
pSAD196AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 196-198
pSAD184AAA	Derivat von pSADL16 mit einer Mutation an aa-Position 184-186

### 2.1.11.3 Virusstämme

#### 2.1.11.3.1 Verwendete Viren

SADL16	rekombinantes Tollwutvirus mit der Nukleotidsequenz von SAD B19 (Schnell et al., 1994)
MVA-T7	rekombinantes Vaccinia Virus, das die T7-Polymerase stabil exprimiert (Sutter et al., 1995)
RV-R58G	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 58 von R zu G (Finke and Conzelmann, 2003)
NPgrL	M- und G-Gen deletiertes Derivat von SADL16 (Finke et al., 2003)

### 2.1.11.3.2 Viren aus dieser Arbeit

RV-20AA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 20-21, SP zu AA
RV-34AAA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 34-36, PPP zu AAA
RV-35AA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 35-36, PP zu AA
RV-47A	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 47, K zu A
RV-99R	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 99, G zu R
RV-104AAA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 104-106, SPV zu AAA
RV-132A	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 132, E zu A
RV-193AAA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 193-195, EDK zu AAA
RV-196AAA	rekombinantes Tollwutvirus mit Mutation an aa-Position 196-198, DSS zu AAA

### 2.1.11.4 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der rekombinanten Plasmide wurde der Bakterienstamm *E.coli* XL1-blue (Stratagene) verwendet.

### 2.1.11.5 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Beschreibung</u>	<u>Organismus</u>
BSR	BHK-21 Klon, J.Cox, BFAV Tübingen	Hamster
BSR T7/5	BSR-Zellen, exprimieren T7 Polymerase (Buchholz et al., 1999)	Hamster
HEp2	Karzinome Larynxepithelzellen	Mensch
HEK 293T	Embryonale Nierenzellen, exprimieren SV40 large-T Antigen	Mensch
NS20Y	Neuroblastomzellen	Maus
MG <sub>on</sub> 136	BSR-Derivate mit M- und G-Gen unter der Kontrolle des TetR-Promotors; nach Zugabe von Doxycyclin werden M und G exprimiert (Finke et al., 2003).	Hamster

<u>Zelllinie</u>	<u>Kulturmedium</u>
BSR, BSR T7/5, MG <sub>on</sub> 136	BHK4+:BHK-21-Medium, 2% Tryptosephosphatmix, 2-fach MEM Aminosäurelösung, 10% NKS, 1% P/S
HEp2-Zellen, NS20Y, HEK 293T	DMEM, 10% FKS, 1% P/S, 1% Glutamin

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Arbeiten mit DNA**

#### **2.2.1.1 Reinigung von DNA über Silicamembranen**

Zur Reinigung von DNA Molekülen nach Inkubation mit Restriktionsenzymen und anderen DNA modifizierenden Enzymen wurde der „QiaQuick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. PCR Produkte wurden mit dem „QiaQuick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### **2.2.1.2 DNA-Sequenzierung**

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma Lafuga (Laboratory for Functional Genome Analysis) an einem 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt. Dazu wurde ein 300ng Ansatz DNA mit 3 pMol der entsprechenden Primer hergestellt.

#### **2.2.1.3 DNA Restriktionsendonuklease**

Der Einsatz von Restriktionsendonukleasen zur spezifischen Fragmentierung von DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers. Restriktionsendonukleasen wurden hitzeinaktiviert und mit dem „QiaQuick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aus dem Reaktionsgemisch entfernt.

#### **2.2.1.4 DNA Ligation**

Vektor- und cDNA Fragment wurden im Verhältnis 1:5 (0,5 – 1 µg DNA) gemischt. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers (16°C, 12-16 h).

### 2.2.1.5 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurden 100ng DNA mit je 10 pmol Primer gemischt. Nach Zusatz von 10µl Reaktionspuffer, 0,8µl dNTPs (25 mM) und 1µl *Pfu*-, bzw. *Taq*-Polymerase (2,5U) wurde die DNA zunächst für 1 min bei 95°C de naturiert. Anschließend erfolgten 35 Zyklen mit Denaturierung bei 95°C (1 min), Hybridisierung des Primers (1 min) und der Synthese der DNA-Stränge bei 72 °C (2 min). Die Hybridisierungstemperatur errechnet sich nach der Formel  $T_H = [2x(A+T)+4x(C+G)] - 5$ . Die PCR Produkte wurden mit dem QiaQuick PCR Purification Kit gereinigt und die Größen der Reaktionsprodukte wurden mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

### 2.2.1.6 Reverse Transkription (RT)

#### 10 x RT-Puffer

0,5 mM Tris-HCl [pH8,3]

0,3 M KCl

0,1 mM MgCl<sub>2</sub>

0,05 M DTT

Zur Synthese von cDNA aus mRNA wurde 1 µg Gesamt RNA mit dem entsprechenden Erststrang-Synthesepriemer und 0,5 µl RNasin in 42 µl Endvolumen gemischt. Zur Denaturierung der RNA wurde der Ansatz zunächst erhitzt (65 °C, 4 min). Anschließend erfolgte die Primerbindung bei (37 °C, 10 min). Zur Erststrang-Synthese wurden dann 2 µl dNTPs (je 25 mM), 5 µl 10 x RT-Puffer und 1 µl Reverse Transkriptase (Stratagene) zugegeben und für 1 h bei 37°C inkubiert. 3 µl der RT Reaktion wurde anschließend als *Template* bei der nachfolgenden PCR eingesetzt.

### 2.2.1.7 Quantitative PCR (qPCR); real-time PCR

Die Quantifizierung der DNA erfolgte mit dem Light Cycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> Hybridization Probes Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Die Abkürzungen in den Primersequenzen stehen hier für folgendes: FL = Fluoresceine-

Label; LCRed -640/-705= LightCycler-Fluorescence-Label; Pho=Phosphat-Modifikation; Fluo= Fluoresceine.

Zur Amplifikation von N, bzw.  $\beta$ -Aktin wurden folgende Primer (je 0,5  $\mu$ M) und Probes (je 0,4  $\mu$ M) verwendet:

RV N986+(RV Nfor)	GACCGACTAAGGACGC
RV N1068- (RV Nrev)	CGCCGCCAAACTTAAT
RV N Probe1	FL-TCAGAGCCCAATTCCCTTCTACA-Fluo
RV N Probe2	LCRed-705-AGTTTTTATCTCCACCAGAGAAC-Pho
hamActinProbe1	FL-GCCAACCGTGAAAAGATGAC-Fluo
hamActinProbe2	LCRed-640-AGATCATGTTTGAGACCTTCAACACC-Pho
hamActin-forw	GGAGAAGATCTGGCACC
hamActin-rev	CAGAGGCATACAGGGAC

Es wurde in jede Reaktion je 1  $\mu$ l einer 1:10 Verdünnung der template DNA eingesetzt. Zunächst wurde die DNA denaturiert (95  $^{\circ}$ C, 10 m). Anschließend folgten 40 Zyklen mit Denaturierung (95  $^{\circ}$ C, 10 s), Hybridisierung des Primers (58  $^{\circ}$ C, 10 s) und der Synthese der DNA-Stränge bei 72  $^{\circ}$ C (12 s).

Die Erstellung der Standardkurve und die Quantifizierung wurde mit Hilfe des von Roche mitgelieferten Programms Light Cycler<sup>®</sup> Software Edition 4.05) durchgeführt.

### 2.2.1.8 Auftrennung von DNA Fragmenten im Agarosegel

#### DNA-Probenpuffer

15% (w/v)	Ficoll 400
0,125% (w/v)	Orange G
5x	TAE

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurden Agarosegele von 0,8% - 1,5% (w/v) Agarose in TAE-Puffer verwendet. Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst. Das Agarosegel wurde mit TAE-Puffer (+0,02%Ethidiumbromid) überschichtet, die DNA-Proben mit DNA-Probenpuffer gemischt und bei 4-8 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar

gemacht. Die Bestimmung der Fragmentgrößen erfolgte durch Vergleich mit einem Größenstandard (1kb Leiter, LifeTechnologie).

### 2.2.1.9 Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA Fragmenten erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „QiaQuick Gel Extraction Kit“ (Qiagen).

## 2.2.2 Arbeiten mit RNA

Alle Puffer und Lösungen für die Arbeiten mit RNA wurden mit DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem  $H_2O_{dd}$ . Hierzu wurde  $H_2O_{dd}$  in der Verdünnung 1:1000 mit DEPC versetzt und gerührt (16 h, RT). Anschließend wurde der Ansatz zur Inaktivierung des DEPC autoklaviert (20 min. 121 °C)

### 2.2.2.1 Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen

RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini Kit“ nach modifizierten Angaben des Herstellers isoliert. Konfluente Zellen einer T25-Gewebekulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) wurden dabei im Gegensatz zu den Herstellerangaben mit der doppelten Menge RLT-Puffer (600 µl) überschichtet und mit 600 µl 70%igem Ethanol versetzt. Weitere Schritte bei der RNA Präparation erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

### 2.2.2.2 Auftrennung von RNA im Agarosegel

50x Phosphatpuffer	Blue Juice	Acridinorange-Stammlösung
250 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	0,125% Bromphenolblau	10 mg/ml Acridinorange
250 mM $NaH_2PO_4 \times H_2O$	0,125% Xylencyanol FF	in 1x Phosphatpuffer
pH[6,8]	0,125% Orange G	
	15% Ficoll 400	
	5 x TAE	

Zur Herstellung von denaturierenden Agarosegelen wurden 2g Agarose in 167,3 ml ddH<sub>2</sub>O und 4 ml 50x Phosphatpuffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 45 °C wurden 26,7 ml Formaldehyd-Lösung (37% in H<sub>2</sub>O) zugegeben und die Lösung in die Gelapparatur gegossen. Das Gel wurde anschließend mit 1x Phosphatpuffer überschichtet.

2-3µg RNA wurden in 12µl Gesamtvolumen mit 3µl 5x Phosphatpuffer unter Zugabe von 1,8µl Glyoxal (40% in ddH<sub>2</sub>O) für 45 min bei 56 °C denaturiert. Nach Zugabe von 3µl Blue Juice wurden die Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine RNA-kb-Leiter (Invitrogen) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 3-4 h bei 3 V/cm und konstanter Pufferumwälzung.

Das RNA-Agarosegel wurde mit einer Acridinorangelösung (1:300 Stammlösung in 1x Phosphatpuffer) 3 in gefärbt und anschließend dreimal je 20 min mit 1x Phosphatpuffer gewaschen. Der RNA-Größenstandard und die ribosomale RNA der Zelle wurden danach durch die UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar gemacht.

### 2.2.2.3 Nukleaseverdau von ribosomaler RNA

#### Lysepuffer

10 mM NaCl

10 mM Tris [pH7,5]

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

1% Triton

Um ein unspezifisches Binden von RNA Sonden an ribosomaler RNA zu verhindern, wurde die rRNA mittels Nukleaseverdau abgebaut. Vor der RNA-Isolation wurden 1 x 10<sup>5</sup> Zellen trypsinisiert und pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl Puffer lysiert und anschließend für 30 min. bei 30°C mit 50 µl (= 300 Units) Nuclease S7 (20 µg in 10 mM Tris [pH7,5] und 1 mM CaCl<sub>2</sub>) inkubiert.

### 2.2.2.4 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

#### 20xSSC

3 M NaCl

0,3 M NaCitrat

Die RNA aus den entfärbten Agarosegelen wurde mittels Kapillartransfer bzw. in einer Vakuumapparatur auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Dazu wurde 20x SSC als Laufpuffer verwendet. Die Membran wurde einmal mit 3x SSC gewaschen und anschließend getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Membran („Crosslinking“) erfolgte durch UV-Bestrahlung (254 nm).

### 2.2.2.5 Northernhybridisierung mit DNA/RNA-Sonden

#### 2.2.2.5.1 Herstellung von DNA-Sonden

Zur Herstellung der DNA-Sonde wurde pT7T-N als *Template*-DNA eingesetzt. Die N-Gensequenz wurde mittels PCR amplifiziert (Primersequenzen siehe Kap. 2.1.11.1 Nstop und Natg) und anschließend durch Geleluatation gereinigt. Die so gewonnene DNA wurde in einer zweiten PCR mit den gleichen Primern amplifiziert und mittels dem „PCR Purification Kit“ (Qiagen) aufgereinigt. Von dem gereinigten PCR Produkt wurden 100ng für die Herstellung der DNA-Sonde mit dem Nick Translation Kit eingesetzt.

Zur Synthese von DNA-Sonden wurde das Nick Translation Kit (Amersham Bioscience) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Markierung der Sonden wurde  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-CTP (GE General Electric) benutzt. Die Entfernung überschüssiger Nukleotide aus dem Reaktionsgemisch erfolgte mittels QiaQuick Nucleotide Removal Kit (Qiagen).

Für den zellulären Abgleich wurde in der gleichen Vorgehensweise eine Aktinsonde hergestellt (Primersequenzen siehe Kap. 2.1.11.1  $\beta$ -Aktin<sup>+</sup> und  $\beta$ -Aktin<sup>-</sup>).

#### 2.2.2.5.2 Herstellung von einzelstrangspezifischen RNA-Sonden

$\alpha$ -<sup>32</sup>P-rUTP markierte Sonden zum spezifischen Nachweis der Expression von „sense/antisense“ RNA, wurden durch *in vitro* Transkription als „run off“ RNA Moleküle mittels des „Riboprobe<sup>®</sup> *in vitro* Transcription Combination System T3/T7“ (Promega) synthetisiert. Die Transkription erfolgte von T3- bzw. T7-Promotoren nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Matrize wurde nach der Synthese durch Zugabe

einer Enzymeinheit DNaseI abgebaut. Zur Reinigung der radioaktiv markierten RNA wurde das „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) verwendet.

### 2.2.2.5.3 DNA/RNA Hybridisierung

Hybridisierungslösung	5% Zetalösung	1% Zetalösung
1mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
245 mM SDS	175 mM SDS	35 mM SDS
250 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
250 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
pH[7,2]	pH[7,2]	pH[7,2]

Die durch UV-Bestrahlung auf Nylonmembran fixierte RNA wurde 30 min mit 10-15ml Hybridisierungslösung im Hybridisierungssofen (68 °C, 7 Upm) präinkubiert. Hierdurch wurde verbliebenes Acridinorange von der Membran entfernt. Die Hybridisierungslösung wurde durch 8ml frische Hybridisierungslösung ersetzt. Die gereinigte, radioaktiv markierte Sonde wurde denaturiert (5 min, 95 °C) und der Hybridisierungslösung zugegeben. Nach Hybridisierung über Nacht (68 °C, 7 Upm) wurde die Membran einmal mit 5% Zetalösung und zweimal mit 1% Zetalösung (je 20 min, 68 °C, 7 Upm) gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet (RT) und die Signale mittels Phosphoimager autoradiographisch detektiert.

### 2.2.2.5.4 RNA/RNA Hybridisierung

Hybridisierungslösung	Waschlösung I	Waschlösung II
750 mM NaCl	750 mM NaCl	150 mM NaCl
0,15 M Tris-HCl pH[8]	0,15 M Tris-HCl pH[8]	30 mM Tris-HCl pH[8]
10 mM EDTA	10 mM EDTA	2 mM EDTA
0,2 M Phosphatpuffer pH[8]	25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	25 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
10% Dextransulfat	0,1% (w/v) SDS	1x Denhardt´s Solution
1x Denhardt´s Solution		
0,1% (w/v) SDS		
50% (v/v) Formamid (entionisiert)		
100 µg/ml Heringsperma		

**Waschlösung III**

50 mM NaCl  
 5 mM Tris-HCl pH[8]  
 0,4 mM EDTA  
 0,1% (w/v) SDS

Die RNA/RNA Hybridisierung wurde im Hybridisierungssofen bei 61°C durchgeführt. Nach einer Prähybridisierung von 1-3 h wurde die Membran mit der gereinigten, radioaktivmarkierten Sonde in 20ml Hybridisierungslösung über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit den Waschlösungen I-III je 45 min gewaschen, getrocknet (RT) und die radioaktiven Signale autoradiographisch detektiert.

Für die RNA-Sonde wurde pT7T-N mit *XhoI*, bzw. *BamHI* geschnitten und als Template für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Die *XhoI*-linearisierte Plasmid DNA diente als Template für die T3-Polymerase-Reaktion, die *BamHI*-linearisierte für die T7-Polymerase-Reaktion.

**2.2.3 Arbeiten mit Proteinen****2.2.3.1 Auftrennen von Proteinen im denaturierenden Polyacrylamidgel nach Jagow****Gelpuffer**

3M Tris-HCl pH[8,45]  
 0,3% (w/v) SDS

**Sammelgel (4%)**

1,4 ml Acrylamidlösung 40% (w/v) (29:1)  
 3,5 ml Gelpuffer  
 9 ml ddH<sub>2</sub>O  
 18 µl TEMED  
 116 µl APS

**SDS-Probenpuffer**

2% (w/v) SDS  
 62,5 mM Tris-HCl  
 6 M Harnstoff  
 10% (v/v) Glycerin  
 5% (v/v) β-Mercaptoethanol  
 0,01% (w/v) Phenolrot  
 0,01% (w/v) Bromphenolblau

**Polyacrylamid Trenngele**

	10%	12%	14%	16%
Gellpuffer	12 ml			
ddH <sub>2</sub> O	12,9 ml	11,1 ml	9,3 ml	7,5 ml
Acrylamidlösung	9 ml	10,8 ml	12,6 ml	14,4 ml
Glycerin	2 ml	2,6 ml	1,7 ml	0,9 ml
APS	175 µl			
TEMED	17 µl			

Die Mengen beziehen sich auf 16x14 cm Gele

Die Lösungen der Trenngele wurde mit TEMED und APS versetzt, zwischen zwei Glasplatten in einer Gelgießapparatur gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach 2-3 h Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und die Geloberfläche mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Danach wurde die Sammelgellösung überschichtet und ein Probenkamm eingeführt. Die Proben im SDS-Probenpuffer wurden vor dem Auftragen erhitzt (5 min, 95 °C) und bei einer konstanten Spannung von 30-150 V aufgetrennt.

**2.2.3.2 Western Blot auf Nitrozellulosemembran****Semi-Dry-Transferpuffer**

48 mM Tris-HCl pH[8,3]

39 mM Glycin

0,005% (w/v) SDS

18% (v/v) Methanol

**Waschpuffer**

1 x PBS

0,05% (v/v) Tween- 20

Die Polyacrylamidgele wurden nach der Gelelektrophorese 30 min im Semi-Dry-Transferpuffer unter Schütteln inkubiert. Der Transfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte mittels einer Semi-Dry-Transferapparatur (Peqlab) unter einer konstanten Stromstärke von 400 mA innerhalb von 2 h. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen inkubiert (5% (w/v) Magermilchpulver gelöst in Waschpuffer). Nach zwei Waschschritten (je 15 min) wurde mit dem ersten Antikörper (1:1 000 – 1: 20 000 in Waschpuffer) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach drei Waschschritten (je 15 min) wurde die Membran mit einem zweiten,

Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper inkubiert (2h, RT). Nach weiteren drei Waschschritten (je 15 min) erfolgte der Nachweis spezifischer Antikörperbindungen. Hierzu wurde das „Western Blot Chemoluminescence Reagent *Plus*“ (NEN) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Detektion der Chemolumineszenz wurden Hyperfilme (Amersham Bioscience) belichtet.

### **2.2.3.3 Luciferase Assay**

Zur Messung der Reportergenexpression wurde das Dual Luciferase Reporter Assay System von Promega verwendet. Neben den Firefly-Luciferase-Aktivitäten wurden die Renilla-Luciferase-Aktivitäten als interner Standard verwendet.

HEK 293T Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 200 µl 1x *Passive Lysis* Puffer bei RT durch schütteln lysiert. Anschließend wurde das Lysat zentrifugiert (14000 Upm, 4°C, 5 min.), um die unlöslichen Bestandteile zu pelletieren.

20 µl des Lysats wurden zu 80 µl des Firefly-Substrats (LARII) gegeben und die Firefly-Luciferase-Aktivitäten gemessen (Luminometer Berthold). Anschließend wurden 80 µl Renilla-Substrat (1:50 in StopGlo Buffer) zugegeben und die Renilla-Luciferase-Aktivitäten gemessen. Die Ergebnisse der Firefly-Aktivitäten wurden mit den Ergebnissen der Renilla-Aktivitäten abgeglichen.

## **2.2.4 Zellkultur**

### **2.2.4.1 Passage von Zellen**

Zellen wurden mit den angegebenen Medien (Kap. 2.1.11.5) kultiviert (37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit). Bei BSR T7/5-Zellen wurde zusätzlich in jeder zweiten Zellpassage Genitacin zugesetzt (G418, 1 mg/ml Medium). MGon136-Zellen wurden zusätzlich in jeder zweiten Zellpassage mit Genitacin und Hygromycin (4 mg/ml Medium) behandelt.

Nach 3 bis 4 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

#### **2.2.4.2 Anlegen von Gefrierkulturen**

Zur Konservierung von Zellen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen einer T75-Gewebekulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens durch Trypsinbehandlung abgelöst und in 9 ml Medium aufgenommen und auf Eis gekühlt. Nach der tropfenweisen Zugabe von 10% (v/v) DMSO wurden die eiskalten Zellen in 1 ml Aliquots portioniert und bei -70°C eingefroren. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### **2.2.4.3 Transfektion von Zellen**

Zur Transfektion von Zellen wurde das Mammalian Transfection Kit (Stratagene) oder FuGENE6 (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### **2.2.4.4 Differenzierung von NS20Y Neuronen**

Zur Ausdifferenzierung der neuronalen NS20Y Zellen, wurden die Zellen einer T25-Gewebekulturflasche in 8 ml 5% FCS aufgenommen und je 30 µl in µ-slide VI (oder 100 µl in µ-slide I) überführt (Fa. Ibidi, München). Nachdem die Zellen abgesetzt waren wurden 140 µl Medium (bzw. 1 ml) zugegeben. Nachdem der Zellrasen ca. 70% konfluent war, wurde das Medium gewechselt (DMEM + 0,5% FCS + 1 mM cAMP). Nach 3-4 Tagen wurde erneut das Medium gewechselt und nach 7 Tagen wurde das Medium durch Zellkulturmedium mit 5% FCS + 50 µM AraC + 300 µM Uridin ersetzt. Nach weiteren 3-4 Tagen wurde frisches Medium, 5% FCS + 50 µM AraC + 300 µM Uridin, auf die Zellen gegeben. 3-4 Tage später wurden den Zellen 5% FCS Medium zugegeben. Ab diesem Zeitpunkt fand alle 3-4 Tage ein Mediumwechsel statt.

## 2.2.4.5 Immunfluoreszenz

### 2.2.4.5.1 Direkte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Tollwutvirus N-Protein wurde eine direkte Immunfluoreszenz mit Centocor<sup>®</sup> durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 80% (v/v) Aceton durch 30 min. Inkubation bei 4°C fixiert, luftgetrocknet und anschließend mit der Antikörperlösung (Centocor<sup>®</sup> 1:200 in PBS) überschichtet. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 450 nm – 490 nm.

### 2.2.4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von viralen und zellulären Proteinen wurde neben der direkten Immunfluoreszenz die indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Für die Fixierung mit Paraformaldehyd wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit einer Paraformaldehydlösung (3% (w/v) Paraformaldehyd in PBS) inkubiert (20 min, RT). Die Präparate wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit NH<sub>4</sub>CL Lösung (50mM NH<sub>4</sub>CL, 20mM Glyzin in PBS) inkubiert (15 in, RT). Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% (v/v) Triton X-100/PBS permeabilisiert (15 min, RT) und erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Präparate zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Magermilchpulver (0,25% (w/v) in PBS) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit einer geeigneten Antikörperlösung (1:200 – 1:500 in PBS mit 0,25% (v/v) Magermilchpulver) gegen das nachzuweisende Protein überschichtet (1 h, 37 °C). Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde Zweitantikörper zugegeben, der mit Fluoreszenzfarbstoffen (Alexa633, Alexa488, Cy3 oder TexasRed) konjugiert war und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Sofern die Zellen zuvor auf Deckgläsern kultiviert wurden, wurden die Präparate mit Histogel oder Vectashield (Linaris Biological Products) auf Objektträgern fixiert. Dies geschah abhängig davon, ob die Präparate für FRET-Analysen vorbereitet wurden. In diesem Fall wurde mit Histogel fixiert, da Vectashield

vor Ausbleichung schützt und somit für FRET-Analysen, die auf Akzeptorbleichen basieren, ungeeignet ist.

Die Auswertung erfolgte im konfokalen Laserscanmikroskop (Zeiss, LSM 510) bei Verwendung entsprechender Filter zur Anregung und Detektion der emittierten Fluoreszenzen.

#### **2.2.4.5.3 Zellkernfärbung mit Hoechstfarbstoff**

Zum fluoreszenzmikroskopischen Nachweis von Zellkernen wurde der Hoechstfarbstoff 33342 verwendet. Dieser wurde 1:1000 in PBS verdünnt. Die permeabilisierten Zellen wurden mit dem Farbstoff überschichtet und für 5 min. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Intakte Zellkerne wurden über die emittierte Fluoreszenz im blauen Wellenlängenbereich sichtbar gemacht. Die Epifluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung der Axiovision unter Verwendung der Axiovision Bildaquirierungs- und Analysesoftware erstellt (Fa. Zeiss)

### **2.2.5 Arbeiten mit Viren**

#### **2.2.5.1 Herstellung rekombinanter Tollwutviren ausgehend von cDNA, *Virus Rescue***

Für die Herstellung von rekombinanten Tollwutviren wurden die Zellen sowohl mit dem Tollwutvirus cDNA Antigenom als auch den Helferplasmiden, die unter der Kontrolle des T7-Promotors die viralen Proteine N,P und L kodieren, transfiziert (10 µg cDNA Antigenom bzw. dessen klonierte Derivate, 5 µg pTIT-N, 2,5 µg pTIT-P und 2,5 µg pTIT-L). Dazu wurden BSRT7/5-Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen mit BHK4+ Medium kultiviert, bis sie zu 80% konfluent gewachsen waren. Die BSRT7/5-Zellen exprimieren konstitutiv die T7 RNA Polymerase und erlauben somit die Transkription von Nukleinsäuresequenzen, die unter der Kontrolle des RNA-Polymerase Promotors des Bakteriophagen T7 stehen. Eine h vor der DNA-Transfektion wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM gewaschen und mit 1 ml serumfreiem DMEM bei 37 °C

inkubiert. Die Transfektion erfolgte mittels der  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  Methode („Mammalian Transfection Kit“, Stratagene), wobei die Transfektionslösung nach 4 h Inkubation abgenommen wurde und die Zellen mit 2 ml frischem BHK4+ Medium überschichtet wurden. Nach 3 Tagen Inkubation wurde der Überstand abgenommen und 1 ml davon auf frisch ausgesäte BSRT7/5-Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen überführt. Der restliche Überstand wurde bei  $-70\text{ °C}$  gelagert. Die transfizierten Zellen wurden für weitere 3 Tage mit frischem BHK4+ Medium überschichtet. Nach einer weiteren Inkubation von 3 Tagen wurde erneut 1 ml des Überstandes der transfizierten Zellen auf frisch ausgesäte BSRT7/5-Zellen überführt und der Rest weggefroren. Zeitgleich wurde von der ersten Überstandspassage der Überstand geerntet. Die Ernte der zweiten Überstandspassage erfolgte nach weiteren 3 Tagen Inkubation. Nachdem der Überstand abgenommen wurde, erfolgte eine Centocor<sup>®</sup>-Färbung, um sichtbar zu machen, ob der Virus erfolgreich *gerescued* werden konnte. Waren Foci zu erkennen, wurden die Überstände dieser Passagen zur Vermehrung der Viren auf frische BSRT7/5-Zellen überführt.

### 2.2.5.2 Vermehrung von Tollwutvirus in Zellkultur

Zur Vermehrung der Tollwutviren in Zellkultur wurden zunächst BSRT7/5-Zellen auf T75-Gewebekulturflaschen kultiviert, bis sich ein konfluenten Rasen bildete. Die Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:3 auf neue Gewebekulturgefäße umgesetzt und mit einer MOI von 0,01 mit den entsprechenden Viren infiziert. Nach 2 h Inkubation ( $37\text{ °C}$ ) wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit frischem BHK4+ Medium überschichtet. 3-4 Tage p.i. wurde der Überstand geerntet und frisches BHK4+Medium auf die Zellen gegeben. Die Zelltrümmer wurden pelletiert ( $3500\text{ Upm}$ ,  $4\text{ °C}$ , 10-15 min, Heraeus Variofuge 3.0R) und der Überstand aliquotiert (je 1 ml) und eingefroren ( $-70\text{ °C}$ ).

Zur Bestimmung des Virustiters wurde ein konfluenten Zellrasen (BSR Zellen) in T25-Gewebekulturflaschen trypsiniert und in 25 ml BHK4+ aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 100  $\mu\text{l}$  Aliquots auf 96-Lochplatten verteilt. Die Zellen wurden anschließend 2-3 h bei  $37\text{ °C}$  inkubiert. Von den virushaltigen Zellkulturüberständen wurden Verdünnungsreihen in 10-fach Schritten durch Verdünnung in serumfreiem BHK-Medium hergestellt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  pro

Verdünnungsstufe wurden auf die in die 96-Lochplatten eingesäten BSR Zellen gegeben und für 2 Tage bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden dann mit 80% Aceton fixiert (30 min) und getrocknet. Die Virusplaques wurden mit Antikörpern (Centocor®) gegen Virusproteine sichtbar gemacht. Der Titer wurde im Fluoreszenzmikroskopie (Fa. Olympus) bestimmt.

### **2.2.5.3 Wachstumskurven der Tollwutviren**

Zur Charakterisierung des Viruswachstums wurden Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert und die Virustiter in Abständen von 12 h bestimmt. Hierzu wurden BSRT7/5-Zellen mit einer MOI von 0,1-1 in Suspension infiziert und in T25-Gewebekulturflaschen kultiviert. Zur Bestimmung der Virustiter wurden zu bestimmten Zeitpunkten (24 h, 36 h, 48 h p.i.) 500 µl Überstand abgenommen und bis zur Auswertung bei -70 °C aufbewahrt und anschließend parallel titriert (siehe Kap. 2.2.5.2 Virustiterbestimmung).

### **2.2.5.4 Vermehrung von NPgrL-Virus in Zellkultur**

Zur Vermehrung der NPgrL-Viren wurden MG<sub>on</sub>136-Zellen einer konfluenten T25-Gewebekulturflaschen 1:3 gesplittet, in T75-Gewebekulturflaschen überführt und mit NPgrL-Viren (MOI= 0.1) infiziert. Nach mind. 48 Stunden Inkubation wurden die durchinfizierten Zellen in T175-Gewebekulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) umgesetzt. Nach 48 h wurden die infizierten Zellen 1:3 gesplittet und für weitere 24- 48 h kultiviert. War der Zellrasen zu ca. 90% konfluent wurde Doxycyclin zugegeben (1 µg/ml), um die Expression von Matrixprotein und Glykoprotein der MG<sub>on</sub>136-Zellen zu initiieren. Anschließend wurde nach 2-3 Tagen Inkubation der Überstand abgenommen, die Zelltrümmer abzentrifugiert (5 min, 4 °C, 1500 Upm), aliquotiert (je 1 ml) und eingefroren (-70 °C). Auf die Zellen wurde frisches BHK4+ Medium, sowie Doxycyclin gegeben, um nach 3 weiteren Tagen erneut den Überstand abzunehmen. Die Titerbestimmung erfolgte wie in 2.2.5.2 beschrieben.

### 2.2.5.5 Vaccinia Viren

#### Fixierlösung

2% Formaldehyd  
0,2% Glutaraldehyd  
in PBS

#### Stainingsolution

5 mM  $K_3Fe[CN]_6$   
5 mM  $K_4Fe[CN]_6 \times 3 H_2O$   
2 mM  $MgCl_2$   
in PBS

Kurz vor Anwendung: Zugabe von 250  $\mu$ l X-Gal (40 mg/ml in DMSO)

BSR Zellen wurden in einer T25-Gewebekulturflasche mit  $1 \times 10^7$  Vaccinia Viren infiziert. Nach Ausbildung des CPEs wurden die Zellen in eine konfluente T75-Gewebekulturflasche mit BSR Zellen überführt und nach Ausbildung des CPEs trypsinisiert und zentrifugiert (20 min, 5000 Upm, Heraeus Variofuge 3.0R). Der Überstand wurde verworfen und die infizierten Zellen in 1 ml BHK Medium resuspendiert. Um die Zellen aufzubrechen wurden sie anschließend dreimal bei  $-70^\circ C$  eingefroren und wieder aufgetaut. Zusätzlich wurden die mit 3 Stößen Ultraschall behandelt. Danach wurden sie aliquotiert ( je 100  $\mu$ l) und bis zur weiteren Anwendung bei  $-70^\circ C$  gelagert.

Zur Bestimmung des Vaccinia Virus Titers wurden BSR Zellen aus einer konfluenten T25-Gewebekulturflasche trypsinisiert und in 30 ml BHK4+ Medium aufgenommen. Je 500  $\mu$ l wurden auf eine 24-Well-Zellkulturschale verteilt. Die Zellen wurden anschließend 2-3 h inkubiert ( $37^\circ C$ ). 1 ml des gewonnenen Virus aus dem Überstand wurde in mehreren Schritten jeweils 1:10 in serumfreien BHK Medium verdünnt. 100  $\mu$ l der Verdünnungen wurden anschließend zu den BSR Zellen pipettiert und 2 Tage bei  $37^\circ C$  inkubiert. Die infizierten Zellen wurden dann mit der angegebenen Fixierlösung fixiert (10 min, RT), anschließend mit PBS gewaschen und mit frisch angesetzter Stainingsolution angefärbt (1 h,  $37^\circ C$ ). Nach nochmaligem Waschen mit PBS konnten die nun blaugefärbten Virusplaques mit Hilfe des Mikroskops (Axiovert 35) ausgezählt werden.

### 2.2.5.6 Überexpression von cDNA in BSR Zellen mittels Vaccinia Viren

Hohe zelluläre Proteinkonzentration wurden durch Transfektion von T7 Expressionsplasmiden und nachträglicher Infektion mit MVA-T7 Viren erreicht. Hierzu wurden konfluent gewachsene BSR T7/5-Zellen in 3,5 cm Schalen zunächst mit DMEM gewaschen, anschließend mit 1 ml DMEM inkubiert. Anschließend erfolgte die Transfektion nach Angaben des Herstellers entweder mit FuGENE6 (Roche) bzw. mit dem Mammalian Transfection Kit (Stratagene). 3-4 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit frischem Medium überschichtet und mit Vaccinia Viren (MOI=5) infiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert.

## 2.2.6 Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E.coli*)

### 2.2.6.1 Anzucht von *E.coli*

#### LB-Medium

0,5% (w/v) NaCl

0,5% (w/v) Hefeextrakt

1% (w/v) Bacto-Trypton

1 mM MgSO<sub>4</sub>

Die Anzucht der *E.coli* Kulturen erfolgte bei 37°C unter Schütteln. Zur Selektion transformierter Bakterien wurde Ampicillin (100 mg/ml) bzw. Kanamycin (100 mg/ml) zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde 1,5% (w/v) Bactoagar zugegeben.

### 2.2.6.2 Präparation chemisch kompetenter Bakterien (*E.coli*)

#### LB<sup>++</sup>-Medium

LB-Medium

20 mM MgSO<sub>4</sub>

10 mM KCl

#### Calcium-Puffer

60 mM CaCl<sub>2</sub>

10 mM Pipes pH[7,1]

15% (v/v) Glycerin

100 ml LB<sup>++</sup>-Medium wurden mit 1 ml einer *E.coli* Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> =0,6 unter Schütteln inkubiert (37 °C). Die Bakterien

wurden pelletiert (10 min, 4 °C, 4000 Upm, Beckmann -Zentrifuge, GS3-Rotor), in 25 ml Calcium-Puffer resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min, 4 °C, 4000 Upm) wurde das Bakterienpellet in 5 ml Calcium-Puffer aufgenommen, aliquotiert und 1-3 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Aliquots eingefroren (-70 °C). Die Transformationseffizienz der chemisch kompetenten Bakterien wurde durch Transformation mit 10 ng zirkulärer Plasmid-DNA und Ausplattieren auf Selektionsagar ermittelt.

### 2.2.6.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurde 10-100 ng Plasmid-DNA bzw. Ligationsansätze verwendet. 50 µl kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit der DNA gemischt. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend ein Hitzeschock (2 min, 42 °C) durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (5 min) wurden 200 µl LB<sup>++</sup>-Medium zugegeben und der Ansatz geschüttelt (45 min, 37°C). Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und inkubiert (16 h, 37 °C). Einzelne Bakterienkolonien wurden zur Plasmid-DNA Isolierung in LB-Medium überführt und vermehrt.

## 2.2.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*

### 2.2.7.1 Plasmid-Minipräparation aus *E.Coli*

#### Flexi-Puffer 1

100 mM Tris-HCl pH[7,5]  
10 mM EDTA pH[8,0]  
400 µg/ml RNaseI

#### Flexi-Puffer 2

200 mM NaOH  
1% (w/v) SDS

#### Flexi-Puffer 3

300 mM Kac pH[5,75]  
(mit HCOOH eingestellt)

1,5 ml einer Übernachtskultur von *E.coli* in der Tischzentrifuge pelletiert (5 min, 13 000 Upm) und mit 200 µl Flexi-Puffer 1 resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden durch Zugabe von 200 µl Flexi-Puffer 2 für 5 min lysiert. Nach der Zugabe von 200 µl Flexi-Puffer 3 wurde der Ansatz auf Eis inkubiert (5 min) und die

präzipitierten Proteine und chromosomale DNA anschließend durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 13 000 Upm). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 400 µl Isopropanol und Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde pelletiert (15 min, 13 000 Upm), einmal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 13 000 Upm), getrocknet und in 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

### **2.2.7.2 Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli***

Zur Präparation von großen Mengen Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden Nucleobond-Säulen (PC-100, Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet.

## **2.2.8 Herstellung rekombinanter Plasmide**

### **2.2.8.1 Konstruktion von ECFP-N3-P / EYFP-N3-P**

Um die Lokalisation der P-Proteine mikroskopisch zu analysieren und für die FRET-Analysen, wurden Expressionplasmide konstruiert, die für Fusionsproteine aus P- und Autofluorszprotein-Gensequenzen (ECFP / EYFP) bestehen.

Dazu wurde die RV-P Gensequenz mittels PCR amplifiziert (5´Primer: PΔstopeco, 3´Primer: T7). Das entstandene PCR-Produkt wurde anschließend mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *EcoRI* geschnitten.

Die Plasmide pECFP-N3-ΔATG, bzw. pEYFP-N3-ΔATG wurden ebenfalls mit *HindIII* und *EcoRI* geschnitten und anschließend mit dem amplifizierten P-Genabschnitt ligiert.

### **2.2.8.2 Konstruktion von ECFP-N3-N / EYFP-N3-P**

Ähnlich wie das Phosphoprotein, wurde das Nukleoprotein mit ECFP, bzw. EYFP fusioniert. Dazu wurde das RV-N mittels PCR amplifiziert (5´Primer: NΔstopbam, 3´Primer:T7) und das PCR-Produkt mit den Enzymen *HindIII* und *BamHI* geschnitten.

Die Plasmide pECFP-N3- $\Delta$ ATG, bzw. pEYFP-N3- $\Delta$ ATG wurden ebenfalls mit *HindIII* und *BamHI* geschnitten und anschließend mit dem amplifizierten N-Genabschnitt ligiert.

### 2.2.8.3 Konstruktion von M-ATG2-EYFP, M-ATG3-EYFP, M-ATG4-EYFP und M-ATG5-EYFP

Die verkürzten Matrixproteine wurden ebenfalls mit EYFP markiert. Dazu wurde ein Präparationsverdau mit pM-EYFP durchgeführt, wobei das Plasmid mit *NotI* und *XbaI* geschnitten wurde. Zusätzlich wurden die verkürzten M-Proteine (pM-ATG2, pM-ATG3, pM-ATG4, pMATG5) mit *NotI* und *XbaI* geschnitten. Anschließend erfolgte eine Ligation des EYFP in die jeweiligen ATG-Konstrukte.

### 2.2.8.4 Zielgerichtete Mutagenese des M-Gens

Um die Funktion des Matrixproteins untersuchen zu können, wurden mittels PCR Mutationen in den Expressionvektor pTIT-M eingebracht. Dazu wurden die Primer so gewählt, dass sie die gewünschte Veränderung der Proteinsequenz zur Folge hatten und es wurde eine zusätzliche Schnittstelle eingebracht, um die Kontrolle einer erfolgreichen Integration in die Sequenz durch Restriktionsverdauanalysen zu ermöglichen. Die Primer wurden nach der Position und der Art der veränderten Aminosäure (aa) benannt, so mutierten 34AAA/33rev an Position 34 des Peptids drei Prolin zu drei Alanin. Entsprechend ist die Nomenklatur der Mutanten. Die Primersequenz ist jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben. Bei Einzelaminosäureaustausch wurden die entsprechenden Plasmide als Template eingesetzt.

Für die PCR wurden 100ng DNA mit je 10 pmol Primer gemischt. Nach Zusatz von 10  $\mu$ l Reaktionspuffer, 0,8  $\mu$ l dNTPs (25 mM) und 1  $\mu$ l *Pfu*-Polymerase (2,5U) wurde die DNA zunächst 3 min bei 95  $^{\circ}$ C denaturiert. Anschließend erfolgten 18 Zyklen mit Denaturierung bei 95  $^{\circ}$ C (30 sek), Hybridisierung des Primers (1 min) und der Synthese der DNA-Stränge bei 68  $^{\circ}$ C (8 min). Die Hybridisierungstemperatur errechnet sich nach der Formel  $T_H = [2x(A+T)+4x(C+G)]-5$ . Die PCR Produkte

wurden mit dem QiaQuick PCR Purification Kit gereinigt und anschließend für 2 Stunden mit *DpnI* (10U) verdaut, um die methylierte DNA (Template-DNA) abzubauen. Danach folgte die Transformation in XL1-blue Zellen (siehe Kap. 2.2.7) mit anschließender Plasmidisolation (siehe Kap. 2.2.8). Mit Hilfe von Restriktionsverdauanalysen mit den entsprechenden Enzymen (siehe Tab. 2), wurde die erfolgreich integrierten Mutationen anhand ihres veränderten Restriktionsmusters und Sequenzierung mit den Primern CITE und TERM (siehe Kap.2.1.11.1) bestimmt.

**Tabelle 3: Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen, Template-DNA und Schnittstellen**

Plasmid	Primer	Template-DNA	Schnittstelle	Plasmid	Primer	Template-DNA	Schnittstelle
pTITM-20AA	M-20AA 20rev	pTITM	+ <i>PstI</i>	pTITM-99R	M-99R 99rev	pTIT-M	+ <i>ApaI</i>
pTITM-31A	M-32A 31rev	pTITM-31AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-104AAA	M-104AAA 104rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>
pTITM-32A	M-32A 31rev	pTITM-31AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-104A	M-104A 104rev	pTITM-104AAA	- <i>PstI</i>
pTITM-32RM	M-32RM 31rev	pTIT-M	+ <i>SphI</i>	pTITM-107AAA	M-107AAA 107rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>
pTITM-33A	M-33A 33rev	pTIT-M	+ <i>ApaI</i>	pTITM-110AAA	M-110AAA 110rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>
pTITM-34AAA	M-34AAA 33rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>	pTITM-113AAA	M-113AAA 113rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>
pTITM-45A	M-45A 45rev	pTITM-45AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-119AAA	M-119AAA 119rev	pTITM	+ <i>PstI</i>
pTITM-47A	M-47A 45rev	pTITM-45AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-130AAA	M-130AAA 130rev	pTITM	+ <i>PstI</i>
pTITM-51	M-51A 51rev	pTITM-51AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-132A	M-132A 130rev	pTITM-130AAA	- <i>PstI</i>
pTITM-53A	M-53A 51rev	pTITM-51AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-133F	M-133F 133rev	pTITM-133AAA	- <i>NotI</i>
pTITM-55A	M-55A 54rev	pTITM-54AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-164A	M-164A 162re	pTIT-M	+ <i>MstI</i>
pTITM-64A	M-64A 63rev	pTITM-63AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-165A	M-165A 165rev	pTITM-165R	- <i>SacI</i>
pTITM-67A	M-67A 66rev	pTITM-66AAA	- <i>PstI</i>	pTITM-166AAA	M-166AAA 165rev	pTIT-M	+ <i>NotI</i>
pTITM-75AAA	M-75AAA 75rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>	pTITM-181AAA	M-181AAA 181rev	pTIT-M	+ <i>NotI</i>
pTITM-78AAA	M-78AAA 78rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>	pTITM-182A	182A 181rev	pTITM-181AAA	- <i>NotI</i>
pTITM-81AA	M-81AA 81rev	pTIT-M	keine	pTITM-184AAA	M-184AAA 184rev	pTIT-M	+ <i>NotI</i>
pTITM-84AAA	M-84AAA 83rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>	pTITM-193AAA	M-193AAA 193rev	pTIT-M	+ <i>NotI</i>
pTITM-87AAA	M-87AAA 87rev	pTIT-M	+ <i>PstI</i>	pTITM-196AAA	M-196AAA 196rev	pTIT-M	+ <i>NotI</i>

### 2.2.8.5 Konstruktion von rekombinanter Virus cDNA

Zur Herstellung rekombinanter Viren mussten die mutierten M Sequenzen in sogenannte *full-length clones* eingebracht werden. Dazu wurden die mutagenisierten pTIT-M Plasmide als Template-DNA in einer PCR-Reaktion mit den Primern SADM<sub>atg</sub> und SADM<sub>stop</sub> (Kap. 2.1.11.1) eingesetzt. Das PCR Produkt, das die gesamte M-Gen kodierende Sequenz enthielt, wurde mit der Restriktionsendonuklease *SapI* geschnitten und nach Gelreinigung mit dem ebenfalls *SapI*-geschnittene und aufgereinigte pSAD $\Delta$ M-Vektor ligiert. Positive Klone wurden anschließend mit *Eco47III*, *NcoI* und *EcoRI* geschnitten und in ein ebenfalls mit *NcoI* geschnittenen pSADL16-Vektor ligiert. Die erfolgreiche Integration der Mutation wurde über Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert.

## Kapitel 3: Ergebnisse

### 3.1 Mutationsanalysen des Matrixproteins

Die regulatorische Funktion des Tollwutvirus Matrixproteins bei der RNA-Synthese ist bisher nur unzureichend verstanden. Mit der Identifikation des M-Proteins als Regulator der viralen RNA-Polymerase (Finke et al., 2003) und dem bei bestimmten M-Mutanten zu beobachteten Verlust der regulatorischen Aktivität bei intakter Assemblyfunktion zeigte sich, dass die Regulation der Polymerase und des Assemblys von Viren zwei voneinander unabhängige Funktionen sind (Finke and Conzelmann, 2003). Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine umfangreiche Mutationsanalyse zur genaueren Charakterisierung der an der Regulation beteiligten Aminosäuren und Domänen des M Proteins.

Zunächst wurde eine *Alanin-scan* Mutagenese durchgeführt, bei der durch zielgerichtete Mutagenese (siehe Kap. 2.2.8.5) jeweils Blöcke von 3 Aminosäuren des Matrixproteins gegen 3 Alanin ausgetauscht wurden. Die erfolgreiche Einführung der Mutationen wurde durch Kontrollverdaue und durch DNA-Sequenzierung (siehe Kap. 2.2.1.2) der mutagenisierten cDNA überprüft. Die zielgerichteten Mutationen wurden auf der Basis von vorausgegangen Mutationen (Finke und Conzelmann, 2003) geplant. Zum einen wurden noch nicht untersuchte Bereiche des Matrixproteins einbezogen, zum anderen wurden Bereiche, in denen bereits Mutagenesedaten vorlagen, detaillierter untersucht. Die Mutanten wurden nach der Position und der Art der veränderten Aminosäure benannt. Beispielsweise sind in der Mutante 34AAA beginnend mit Position 34 drei Prolin- zu drei Alaninresten mutiert.

Im Anschluss an die Mutagenese wurden die mutagenisierten Plasmide in Expressionsstudien auf phänotypische Veränderungen bezüglich der Funktion der kodierten M Proteine im Virus-Assembly und in der RNA-Syntheseregulation untersucht. Zum einen wurde untersucht, ob die eingebrachte Mutation einen Effekt auf die Virusformation und den infektiösen Virustiter haben, zum anderen ob eine Veränderung in der viralen RNA-Synthese zu beobachten war. Um die beiden Aspekte zu untersuchen, wurde zunächst das doppeldefiziente, M und G-Gen deletierte Virus SAD NPgrL (Abb.8) in *in trans*-Komplentierungsversuchen eingesetzt.

(A)



(B)



**Abbildung 8: Aufbau des M- und G-deletierten RV-Replikons SAD NPgrL. (A) Schematische Darstellung des Tollwutvirusgenoms.** Das Tollwutvirusgenom besitzt Gene für Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), Matrixprotein (M), Glykoprotein (G) und Polymerase (L). **(B)** Das NPgrL-Virus besitzt an Stelle der RV M- und G-Gene Reportergene, die GFP (green fluorescent protein aus *Aequorea victoria*) und Ds-Red (red fluorescent protein aus *Discosoma spec.*) kodieren (Finke et al., 2003; Finke and Conzelmann 2003).

### 3.1.1 Untersuchung zur Assemblyfunktion mutagenisierter M-Proteine

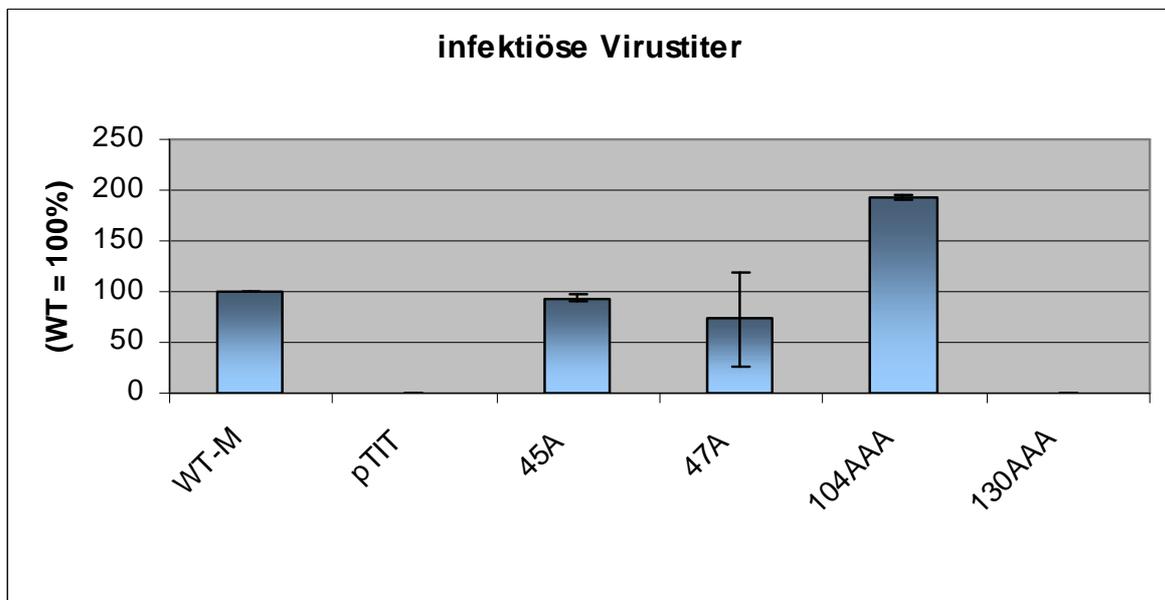
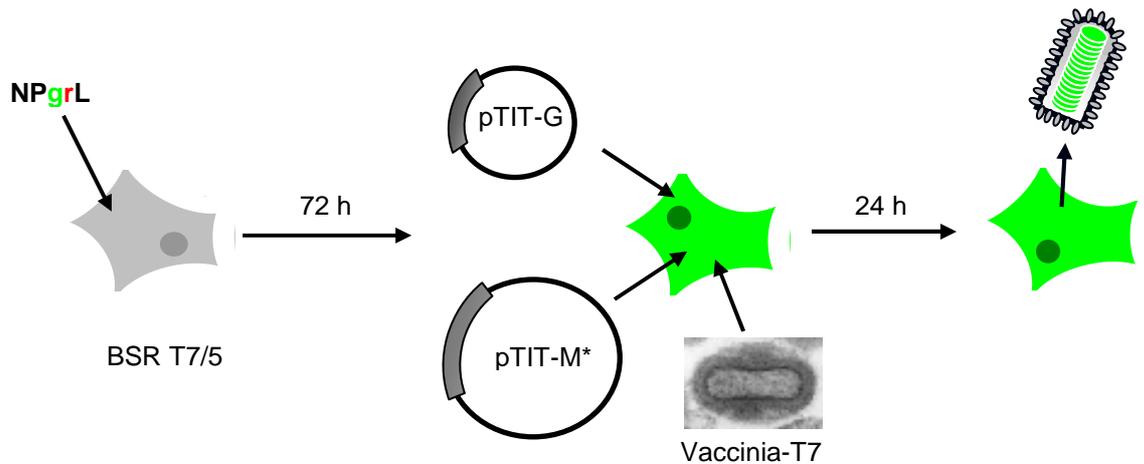
Zur Analyse der Assemblyaktivität der M Mutanten wurden BSR T7/5-Zellen mit dem NPgrL-Virus infiziert und für 72 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit akkumuliert das Virusgenom in den infizierten Zellen, ohne dass Viruspartikel freigesetzt werden. Durch das NPgrL-kodierte GFP-Gen (*green fluorescent protein*) konnte anhand der GFP-Autofluoreszenz eine erfolgreiche Infektion bestätigt werden. Nach 72 Stunden Inkubation wurden Expressionsplasmide, die für das Tollwutvirus Matrixprotein und das Glykoprotein kodieren (pTIT-M und pTIT-G) nach der Calciumphosphatmethode in die Zellen transfiziert (Abb. 9A). Die Expression der M- und G-Gene erfolgt bei den verwendeten Plasmiden über den T7-RNA-Polymerasepromotor. In den hier beschriebenen Experimenten erfolgte eine möglichst schnelle und effiziente Synthese der M und G Proteine durch Überinfektion mit rekombinantem Vaccinia Virus (MVA-T7). MVA-T7 exprimiert die RNA-Polymerase des bakteriophagen T7 (Fuerst et al., 1986), die für die T7-Promotor-kontrollierte Transkription der M und G mRNAs von den Expressionsplasmiden benötigt wird. Die im Verhältnis zu anderen eukaryotischen Expressionssystemen sehr

hohe Proteinexpression mit Hilfe des Vaccinia Virus sollte gewährleisten, dass das Matrixprotein in ausreichender Menge für die Komplementierung von NPgrL synthetisiert wird.

Als Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde die Autofluoreszenz des DS-Red (*Discosoma* sp. red fluorescence protein), das in einem separaten Ansatz von einem kotransfizierten Plasmid (pDs-Red) exprimiert wurde, gemessen. 24 Stunden nach Transfektion der Expressionsplasmide in NPgrL-infizierte Zellen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen. Von den infizierten und transfizierten Zellen wurden Proteinextrakte für spätere Expressionanalysen hergestellt.

Die infektiösen Virustiter in den Zellkulturüberständen wurden als Maß für die Assemblyaktivität der untersuchten M-Mutanten verwendet. Die Bestimmung der infektiösen Virustiter erfolgte über Endpunktverdünnungen (siehe Kap. 2.2.5.2). Als Positivkontrolle und um einen Vergleich der Mutanten mit dem Wildtyp Matrixprotein (WT-M) zu ermöglichen, wurde in allen Ansätzen pTIT-M mitgeführt, welches das authentische M Protein kodiert. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pTIT transfiziert. Zum Vergleich der infektiösen Virustiter wurde der Titer nach Komplementierung mit WT-M gleich 100% gesetzt. Die infektiösen Virustiter, die nach der Transfektion der mutierten cDNAs erzielt wurden, wurden in % relativ zu dem WT-M-vermittelten Virustiter dargestellt (Abb. 9B). Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse der *in trans*-Analysen beispielhaft anhand der Mutationen 45A, 47A, 104AAA und 130AAA dargestellt.

Während einige Mutationen, wie z.B. 104AAA, zu einer Steigerung der erzielten infektiösen Virustiter führten, wurden für viele Mutationen, so z.B. für 47A, reduzierte infektiöse Virustiter beobachtet. Die meisten Mutationen wie beispielsweise 130AAA führten zu einem kompletten Defekt in der Freisetzung infektiöser Viren (Abb. 9B). Im Falle von pTIT konnte keine infektiösen Virustiter nachgewiesen werden, was für eine zuverlässige Methode für Assembly-Analysen spricht, da es sich um ein weitestgehend hintergrundfreies System handelt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse steht in den Tabellen 4 und 5 (siehe S. 60 und 61).



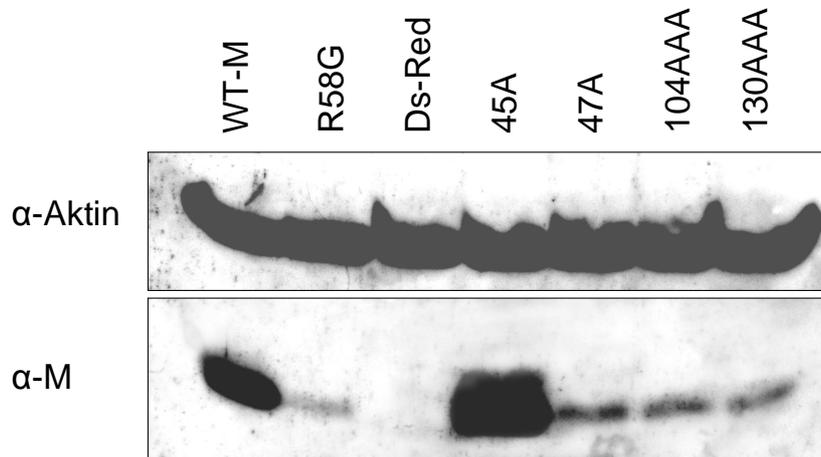
**Abbildung 9:(oben) Schematische Darstellung der Komplementationsversuche zur Freisetzung infektiöser Viruspartikel.** Um den Einfluss der Mutationen auf die Freisetzung von infektiösen Viren zu analysieren, wurden BSR T7/5-Zellen mit NPgrL infiziert und nach 72 Stunden mit den Plasmiden pTIT-G und mutagenisiertem pTIT-M\* transfiziert und mit MVA-T7 infiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturüberstände geerntet und die infektiösen Virustiter durch Endpunkttitrationen (Kap. 2.2.5.2.) bestimmt. **(unten) Infektiöse Virustiter nach Transfektion der Mutanten in NPgrL infizierten Zellen (n=3).** Die in den Endpunkttitrationen ermittelten infektiösen Virustiter der Mutanten wurden mit dem des Wildtypvirus verglichen (WT-M = 100%). In allen Versuchen wurden WT-M (pTIT-M) als Positivkontrolle und Leervektor (pTIT) als Negativkontrolle verwendet. Standardabweichungen sind durch Fehlerbalken dargestellt. Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse diese Assembly-Tests erfolgt in den Tabellen 4 (S. 60) und 5 (S. 61).

### 3.1.2 Expressionskontrolle mittels Western Blot

Um auszuschließen, dass der Funktionsverlust der mutierten Matrixproteine auf eine schlechte, bzw. nicht vorhandene Expression des Proteins zurückzuführen ist, wurden parallel zur Bestimmung der infektiösen Virustiter in den Zellkulturüberständen die Zellysate der M-transfizierten BSR T7/5-Zellen nach SDS-PAGE in Westernblots auf die Akkumulierung von M-Protein hin überprüft (Abb. 10). Zur Abschätzung der Mengen an exprimiertem Matrixprotein wurde zusätzlich das zelleigene Aktin detektiert.

Für die Mutanten R58G, 45A, 47A, 104AAA und 130AAA konnte eine effiziente Proteinexpression nachgewiesen werden. WT-M und 45A zeigten eine hohe Akkumulation des Matrixproteins, während für R58G, 47A, 104AAA und 130AAA eine deutlich niedrigere Akkumulation nachgewiesen werden konnte. Obwohl im Falle der Mutation 47A die geringe M-Expression für den niedrigen infektiösen Virustiter verantwortlich gemacht werden könnte, zeigt sich anhand der Mutation 130AAA, dass sich die Ursache für den Verlust der Assembly-Aktivität eindeutig auf die eingebrachte Mutation zurückführen lässt, da eine erfolgreiche Expression nachgewiesen werden konnte. Ebenso zeigt die Mutante 104AAA keine Korrelation zwischen Expressionsrate und Assembly-Aktivität, da trotz geringer Mengen an Matrixprotein ein hoher Virustiter beobachtet werden konnte. Die geringere Akkumulation der Mutanten R58G, 47A, 104AAA und 130AAA könnte auf die geringere Stabilität von M zurückzuführen sein. Je nach Art der eingebrachten Aminosäure ist es möglich, dass das Matrixprotein in seiner Struktur, bzw. Faltung so verändert wurde, dass es in seiner Stabilität beeinträchtigt wurde und somit durch eine veränderte Halbwertszeit schneller degradiert wird als das WT-M. In einzelnen Fällen konnte kein M detektiert werden, was vermutlich auf die vorzeitige Degradation von *mis-folded* Matrixproteinen zurückzuführen ist (siehe Zusammenfassung Tab. 4 u. 5).

Auf eine quantitative Detailanalyse durch Pulse-Chase Experimente wurde verzichtet, da die Funktionalität des Matrixproteins in einem möglichst schnellen *Screen* untersucht werden sollte. Wichtig waren dabei die erfolgreiche Expression und die Assembly-Aktivität der mutierten Matrixproteine.



**Abbildung 10: M Protein - Akkumlierung nach Transfektion der Expressionsplasmide in NPgrL infizierte BSR T7/5-Zellen.** Die Zelllysate der transfizierten und NPgrL infizierten BSR T7/5-Zellen wurden in Westernblotanalysen eingesetzt. Die M Proteine wurden mit M-spezifischen Seren (M1B3 1:10 000,  $\alpha$ -rabbit-PO 1:20 000) detektiert. Als zellulärer Abgleich wurde das zelluläre Aktin detektiert ( $\alpha$ -Aktin 1:10 000,  $\alpha$ -rabbit-PO 1:20 000).

### 3.1.3 Die RNA-Syntheseregulation durch das Matrixprotein

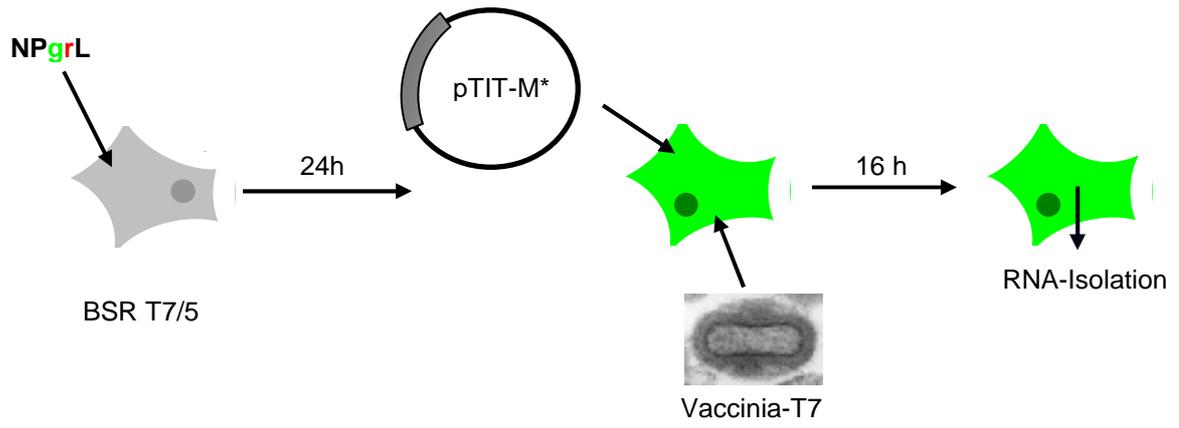
Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der RNA-Syntheseregulation durch das Matrixprotein zu untersuchen. Deshalb wurden die M Mutanten hinsichtlich ihrer Funktion bei der viralen RNA-Syntheseregulation analysiert. Dazu wurden NPgrL infizierte BSR T7/5-Zellen mit den mutierten pTIT-M (5  $\mu$ g) transfiziert und mit MVA-T7 überinfiziert (Abb. 11A). Die Komplementierung mit dem Matrixprotein erfolgte in diesen Ansätzen bereits 24 Stunden nach Infektion mit NPgrL, da eine starke Akkumulation des Virusgenoms in Folge der Virusreplikation den Effekt der M Proteine auf die RNP-Akkumulation, bzw. auf die mRNA-Transkription überdecken könnte. Auf eine Kotransfektion mit pTIT-G wurde in diesen Ansätzen verzichtet, da die Buddingaktivität des Virus auf das Mindestmaß reduziert und so möglichst alle Replikationsprodukte in den RNA-Analysen erfasst werden sollte. 16 Stunden nach

der Transfektion wurde die RNA aus den den virusinfizierten Zellen isoliert, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Northern Hybridisierung mit einer radioaktivmarkierten N Gen-spezifischen Sonde analysiert (Abb. 11B). Durch den Einsatz der radioaktiv markierten cDNA-Sonde werden im Northern Blot sowohl (+)-Strang mRNA und Antigenom als auch (-)-Strang Genom detektiert. Zur Ermittlung der Transkriptionsrate wurden die Hybridisierungssignale mit Hilfe eines Phosphoimagers detektiert und anschließend die Bandenintensitäten der N-mRNA (1,6 kb) und des Virusgenoms (12 kb) mit einer Software (ImageQuant 5.0) quantifiziert. Als Maß für die virale Transkriptionsaktivität wurden die N-mRNA und das Genom in Verhältnis zueinander gesetzt (mRNA / Genom). Für die Darstellung der Transkriptions-/ Replikationsverhältnisse wurden die für WT-M ermittelten Werte als 100% definiert (Abb. 11C).

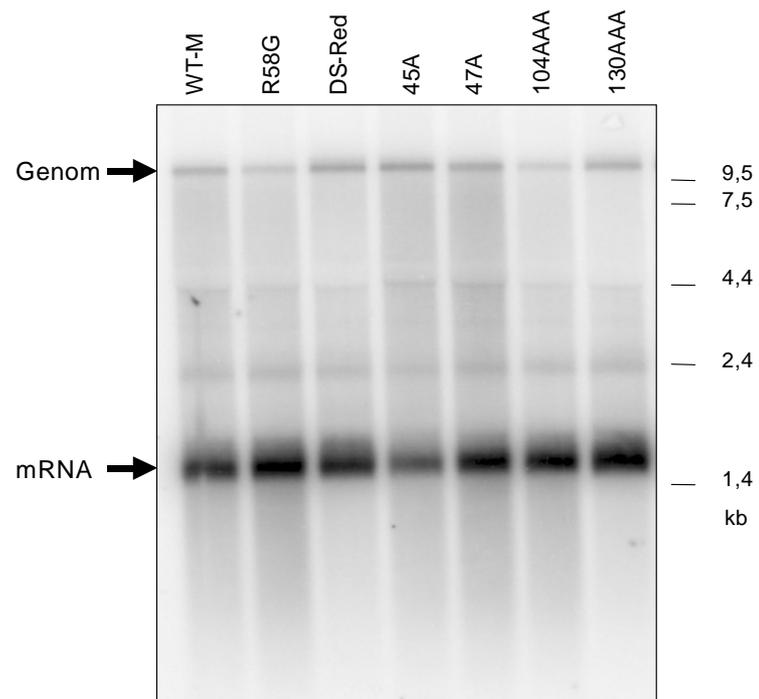
In Übereinstimmung zu den bereits publizierten Daten zeigte die Mutation R58G verglichen zu WT-M eine höhere Menge an N-mRNA und eine verminderte Menge an Genom, was in einer Transkriptionsrate von 262% resultiert (Finke et al., 2003).

Auffällig waren die verglichen zu WT-M schwächeren Genombanden, aber stärkeren mRNA-Banden der Mutanten R58G und 104AAA (Spuren 2 und 6 in Abb. 11B). Nach der Quantifizierung und Auswertung des Northernblots konnten diese als sogenannte Hi-T (*high-transcription rate*) Mutanten identifiziert werden, d.h. sie zeigten eine erhöhte Transkriptionsrate und eine niedrigere Replikationsrate als WT-M. Mutante 130AAA (Spur 7 in Abb. 11B) zeigte ebenfalls eine stärkere mRNA-Bande als WT-M, jedoch keine veränderte Genombande, was ebenfalls auf einen Hi-T Phänotyp hinweist (Abb. 11C). Die Mutante 47A zeigte im Vergleich zu WT-M keine Unterschiede, während 45 A durch eine schwache mRNA-Bande bei unveränderter Genom-Bande charakterisiert war (Spuren 4 u. 5 in Abb. 11B).

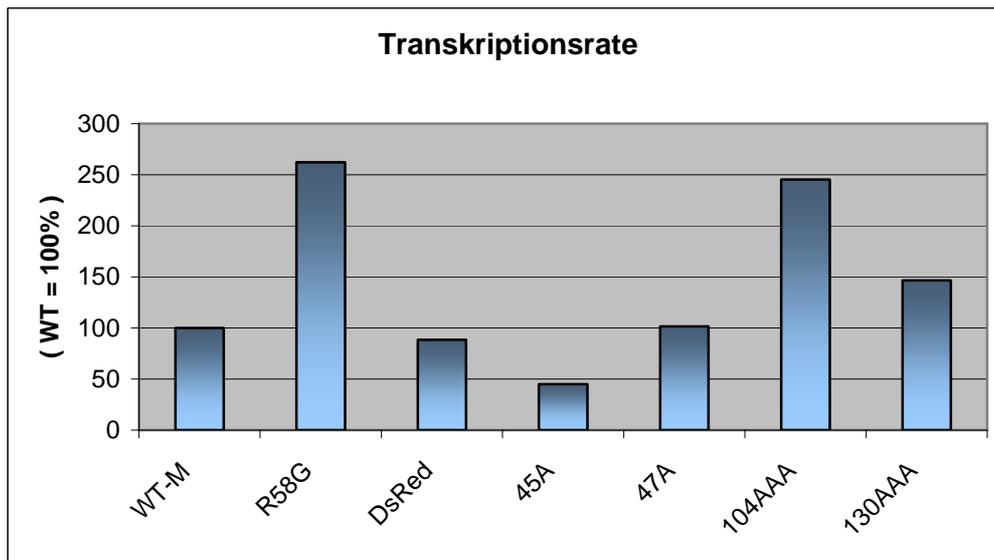
(A)



(B)



(C)



**Abbildung 11: (A) Schematische Darstellung der Komplementationsversuche zur Detektion von M-Mutationen, die die RNA-Syntheseregulation durch M beeinflussen.** NPgrL infizierte BSR T7/5-Zellen wurden mit mutagenisiertem pTIT-M\* Plasmid transfiziert und mit Vaccinia MVA T7 überinfiziert. Nach 16 Stunden erfolgte die Isolation und Analyse der virusspezifischen RNA. **(B) Nachweis genomischer Virus RNA und N mRNA im Northernblot.** Die in A isolierte RNA wurde in Northernblotanalysen mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten N-Gen spezifischen cDNA-Sonde mittels Phosphoimager detektiert. Dabei konnten Mutanten identifiziert werden, die im Vergleich zu WT-M Veränderungen im Verhältnis von Genom und Transkript aufwiesen. **(C) Graphische Darstellung der „Transkriptionsraten“.** Der Quotient aus den Hybridisierungssignalintensitäten für mRNA und Genom ( $\text{mRNA} / \text{Genom}$ ) wurde als Maß für die virale Transkriptionsaktivität berechnet. Dabei wurden die Werte für WT-M als 100% definiert und die Ergebnisse für die unterschiedlichen M-Mutationen relativ dazu angegeben. Es konnte bei den Mutanten R58G, 104AAA und 130AAA ein als Hi-T (*high transcription*) bezeichneter Phänotyp beobachtet werden.

Sämtliche Ergebnisse des gesamten Phänotypischen Screens auf Assemblyaktivität und RNA-Syntheseregulation wurden tabellarisch zusammengefasst (Tab. 4, S. 60). Es wurden insgesamt 5 Hi-T Mutationen identifiziert (rot unterlegt), von denen zwei die Fähigkeit beibehielten entweder nur geringfügig reduziert (34AAA: 82% der WT-Aktivität) oder sogar gesteigert (104AAA 193%) infektiöse Viruspartikel zu bilden (grün unterlegt). Zusätzlich wurden zwei potentielle Hi-R (*high-replication rate*) Mutationen identifiziert (hellblau unterlegt), von

denen zwei Mutation zu reduzierten infektiösen Virustitern führten (20AA: 17%; 196AAA: 60%). Im Falle der Mutationen, die keine oder sehr geringe Virusproduktion und eine normale Transkriptionsrate (N-T) aufwiesen (75AAA, 78AAA, 133AAA) waren die Matrixproteine offensichtlich in ihrer Funktion beim *Budding* der Viren defekt.

Mutation	Virusproduktion (WT=100%)	Protein- expression	Transkriptions- phänotyp
20AA	17%	Ja	Hi-R
34AAA	82% ± 9	Ja	Hi-T
75AAA	0%	Ja	N-T
78AAA	0%	Ja	N-T
81AA	86% ± 41	Ja	n.d.
84AAA	94% ± 2	Ja	N-T
87AAA	0%	Ja	n.d.
104AAA	193% ± 3	Ja	Hi-T
107AAA	0%	Ja	n.d.
110AAA	0%	Ja	n.d.
113AAA	0%	Nein	n.d.
119AAA	0%	Nein	n.d.
130AAA	0%	Ja	Hi-T
133AAA	4% ± 2	Ja	N-T
166AAA	0%	Ja	n.d.
181AAA	0%	Ja	Hi-T
184AAA	0%	Ja	Hi-T
193AAA	84% ± 9	Ja	N-T
196AAA	60% ± 39	Ja	Hi-R

**Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse des phänotypischen Screens auf Assembly- und RNA-Syntheseregulations-Aktivität.** Virustiter, Proteinexpression (s. Abb. 10) und Phänotyps in der Transkription (s. Abb. 11C). Hi-T (*high transcription*, rot unterlegt), Hi-R (*high replication*, blau unterlegt), N-T (*normal transcription*), n.d. keine Daten verfügbar. Die Mutationen, die einen Hi-T Phänotyp zeigten und infektiöse Viren produzieren konnten, sind grün unterlegt.

Um die Regionen, die eine Veränderung hervorriefen, detaillierter zu untersuchen, wurden in einer weiteren Mutageneserunde einzelne Aminosäuren ausgetauscht. Die Ergebnisse dieses phänotypischen Screens wurden ebenfalls tabellarisch zusammengefasst (Tab. 5). Es konnten 6 weitere potentielle Hi-T Mutanten (31A, 35AA, 99R, 104A, 164A und 165A) identifiziert werden (rot unterlegt), davon waren jedoch nur 3 in der Lage, infektiöse Viruspartikel zu bilden (35AA: 10%, 99R: 33% und 104A:260%, grün unterlegt).

Mutation	Virusproduktion (WT=100%)	Protein-expression	Transkriptionsphänotyp
31A	2% ± 2,6%	Ja	Hi-T
32A	0%	Ja	N-T
32RM	50% ± 11	Ja	N-T
33A	55% ± 32	Ja	N-T
35AA	10%	Ja	Hi-T
45A	94% ± 4	Ja	N-T
47A	73% ± 46	Ja	N-T
51A	5% ± 5	Ja	n.d.
52A	0%	Ja	n.d.
53A	0%	Ja	n.d.
55A	0%	Ja	N-T
64A	5% ± 5	Ja	N-T
67A	13% ± 11	Ja	N-T
99R	33%	Ja	Hi-T
104A	260% ± 55	Ja	Hi-T
132A	162% ± 45	Ja	N-T
133F	0%	Nein	n.d.
164A	0%	Ja	Hi-T
165A	0%	Nein	Hi-T
182A	71% ± 6	Ja	n.d.

**Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse des phänotypischen Screens der Mutanten mit Einzel-AA-Austausch auf Assembly- und RNA-Syntheseregulations-Aktivität.** Entsprechend der Tabelle 4A wurden die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst. Hi-T (*high transcription*, in rot dargestellt), N-T (*normal transcription*), n.d. keine Daten verfügbar. Die Mutanten, die einen Hi-T Phänotyp zeigten und Virus produzieren konnten, sind grün unterlegt.

Um die Regulation der RNA-Synthese untersuchen zu können, galt den Mutationen eine besondere Aufmerksamkeit, die in der RNA-Synthese auffällige Phänotypen zeigten und zudem fähig waren, die Freisetzung infektiöser Partikel zu vermitteln. Dies war die Voraussetzung für die Insertion der Mutationen in autonom replizierende rekombinante Viren.

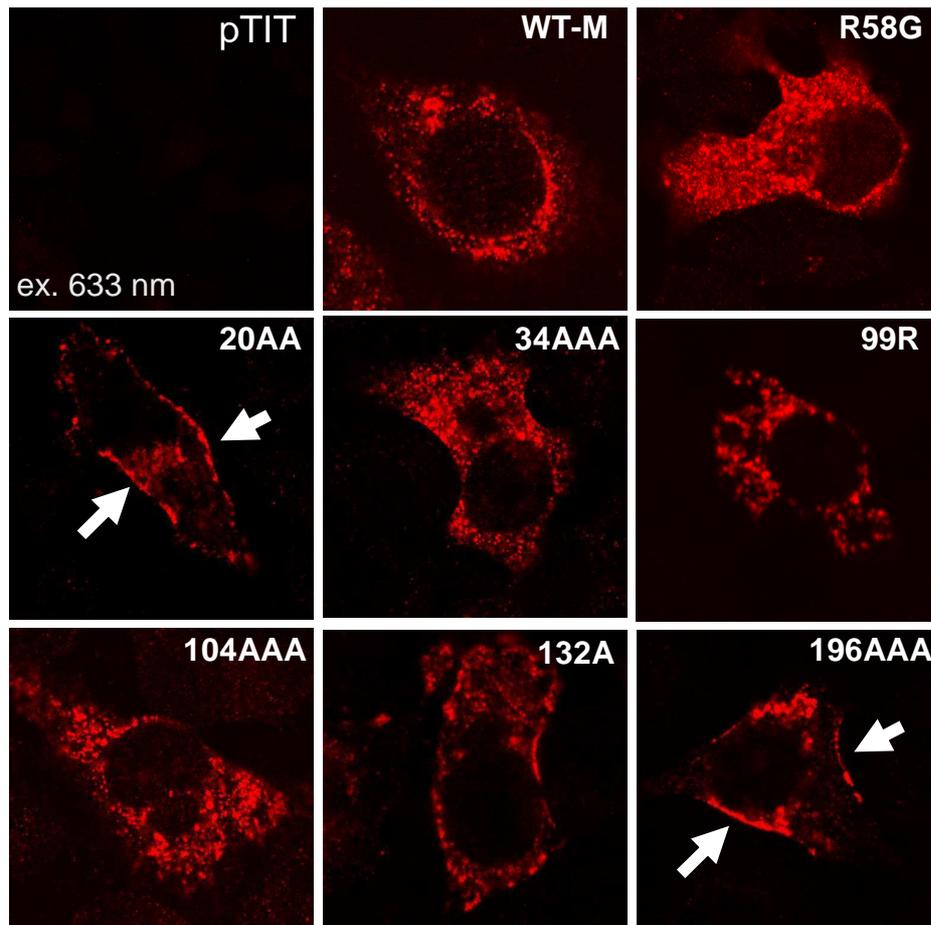
Veränderungen an den Positionen 31, 34, 84, 99, 104, 130, 164, 165 und 184 führten zu einem Hi-T-Phänotyp, an Positionen 20 und 196 zu einem Hi-R-Phänotyp. Im Falle von 34AAA und 104AAA konnte durch die zweite Mutagenserunde der Bereich, der für die Entstehung eines Hi-T Phänotyps verantwortlich ist, auf die Positionen 35AA und 104A eingegrenzt werden.

Da nicht in allen Fällen eine erfolgreiche Expression des Matrixproteins und/oder die Fähigkeit zur Bildung infektiöser Viruspartikel beobachtet werden konnte, wurden diese Mutationen nicht in weitere Analysen mit einbezogen, so z.B. 130AAA und 165A. Beide Mutationen wiesen zwar einen Hi-T Phänotyp aber keine und kaum M-Expression auf und können aufgrund dessen für die Untersuchung der RNA-Regulation nicht eingesetzt werden. Mutationen, die einen Defekt in der Virusfreisetzung aufwiesen, wurden ebenfalls aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da diese vermutlich einen Defekt in der Funktion des Matrixproteins als Strukturprotein hatten, nicht aber in der Funktion als RNA-Regulator. Somit waren diese Mutanten für die Zielsetzung dieser Arbeit ungeeignet.

M Mutationen, die in den transienten Untersuchungen zur RNA-Regulation einen Effekt auf die RNA-Synthese zeigten, wurden zusätzlich auf ihre intrazelluläre Verteilung hin untersucht. Auffällige Veränderungen könnten erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang der intrazellulären M-Lokalisation mit der Regulation der RNA-Synthese sein.

Dazu wurden die Expressionsplasmide für WT-M und für die ausgewählten Mutanten in BSR T7/5 Zellen transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion wurden die M-Proteine mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mit Hilfe des konfokalen Laser Scan Mikroskopes detektiert (Abb. 12). Dabei stellte sich heraus, dass die als Hi-T-Mutanten identifizierten M-Proteine (R58G, 34AAA, 99R, 104AAA) verstärkt vesikelähnliche Strukturen im Zytoplasma der transfizierten Zellen ausbildeten. Besonders interessant war die geradezu gegensätzliche Verteilung des Matrixproteins bei den als mögliche Hi-R- identifizierten Mutanten 20AA und 196AAA,

wo eine verstärkte Anlagerung an die Zytoplasmamembran und anderen membranösen Strukturen (weiße Pfeile) zu beobachten war. In WT-M oder N-T-Mutation 132A exprimierenden Zellen war das Matrixprotein eher mit größeren zytoplasmatisch lokalisierten Kompartimenten assoziiert.



**Abbildung 12: Verteilung des Matrixproteins in BSR T7/5-Zellen nach Transfektion mutierter M-Plasmide.** Die von transfizierten Plasmiden exprimierte, mutierte M-Proteine wurden nach immunologischer Färbung gegen M (M2D4, M1B3 1:200; Sekundärantikörper:  $\alpha$ -rabbit Alexa633 1:200) gefärbt und unter dem konfokalen Laser Scan Mikroskop (63x Öbektiv) untersucht. Der Leervektor pTIT diente als Negativkontrolle für die Immunfärbung. Die Hi-T Mutanten zeigten im Vergleich zu WT-M eine mehr zytoplasmatisch vesikuläre Verteilung. Die M Proteine der Hi-R Mutanten waren verstärkt mit der Zytoplasmamembran assoziiert (weiße Pfeile).

Um die Regulation der RNA-Synthese vergleichend untersuchen zu können, wurden von allen 3 Phänotypen, nämlich Hi-T, N-T und Hi-R Mutanten ausgewählt, die anschließend in rekombinante Viren eingebracht werden sollten (Tab. 6).

Mutation	Virus- produktion	Protein- expression	Transkriptions- phänotyp
20AA	Ja	Ja	Hi-R
34AAA	Ja	Ja	Hi-T
35AA	Ja	Ja	Hi-T
47A	Ja	Ja	N-T
99R	Ja	Ja	Hi-T
104AAA	Ja	Ja	Hi-T
132A	Ja	Ja	N-T
193AAA	Ja	Ja	N-T
196AAA	Ja	Ja	Hi-R

Tabelle 6: Zusammenfassung der M Mutanten, die für die Herstellung rekombinanter Viren ausgesucht wurden.

### 3.2 Herstellung rekombinanter Tollwutviren mit Mutationen in der M-Gensequenz

Transiente Komplementierungsexperimente, in denen eine Vielzahl unterschiedlicher Mutanten getestet werden können, sind für das primäre *Screenen* auf phänotypische Veränderungen geeignet. Ein Nachteil ist allerdings, dass die Expression der viralen Gene von transfizierten Plasmiden in der Höhe und im Verhältnis zu den übrigen Virusgenen verändert und evtl. variabel ist. Dies kann dazu

führen, dass dosisabhängige Funktionen wie die RNA-Synthese-Regulation nur sehr schwach ausgeprägt sind und in den Komplementierungsexperimenten eine relativ hohe Varianz aufweisen.

Aus diesem Grund und für die weitergehende Analyse der RNA-Syntheseregulation war eine Bestätigung der beobachteten Phänotype durch rekombinante Virusmutanten notwendig. Deshalb wurden rekombinante Tollwutviren hergestellt und anschließend untersucht. Dazu wurden die mutierten M-Gensequenzen in das Plasmid pSAD L16 (Schnell et al., 1994) überführt, das die vollständige Sequenz des Tollwutvirus SAD B19 (Conzelmann et al., 1990) als cDNA-Kopie enthält.

Zur Herstellung der rekombinanten Virusmutanten wurden Expressionsplasmide, die die für die virale RNA-Synthese essentiellen Virusproteine N, P und L unter der Kontrolle des T7 RNA-Polymerase Promotors kodieren (pTIT-N, pTIT-P und pTIT-L), zusammen mit den entsprechenden Gesamtklon-cDNAs in BSR T7/5-Zellen transfiziert. T7-RNA-Transkripte, die das vollständige Tollwutvirusantigenom enthalten, werden im Zytoplasma der transfizierten Zellen mit dem Nukleoprotein N zu einem Ribonukleoprotein (RNP) verpackt. Erst dann kann das RNP als Matrize für die ebenfalls von transfizierten Plasmiden exprimierte viruseigene Polymerase-L dienen. Nach einer Replikationsrunde und der anschließenden Expression aller Virusgene beginnt der autonome virale Zyklus und infektiöse Viren können aus dem Zellkulturüberstand gewonnen werden.

Mit Hilfe dieser sogenannten „reverse genetics“ Technologie konnten neun rekombinante Viren hergestellt werden, die dann für die weiteren Analysen verwendet wurden (Abb. 13).

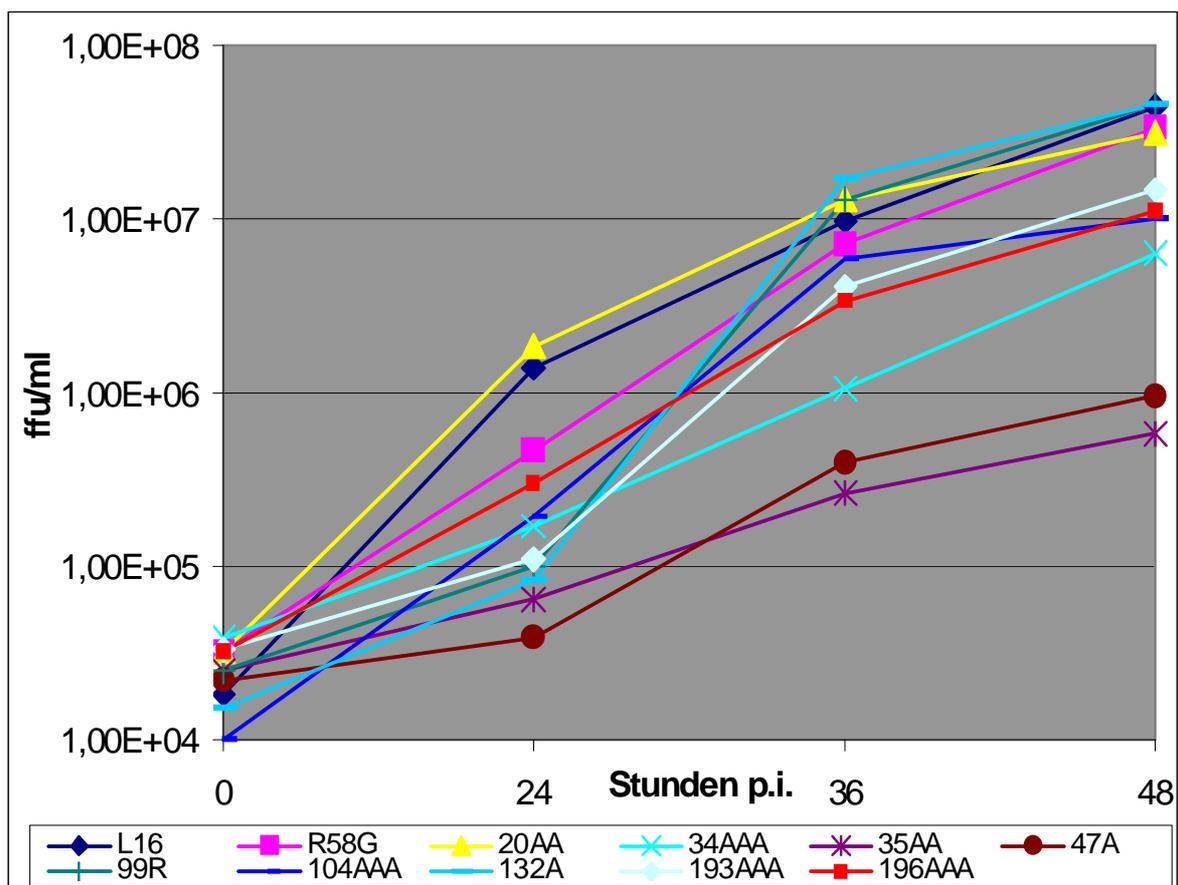
	1		55
SAD L16	MNLLRKIVKNRRDEDTQKSSPASAPLDDDDLWLPPEYVPLKELTGKKNMRNFCI		
20AA	-----AA-----		
34AAA	-----AAA-----		
35AA	-----AA-----		
47A	-----A-----		
R58G	-----		
99R	-----		
104AAA	-----		
132A	-----		
193AAA	-----		
196AAA	-----		
	56		110
SAD L16	NGRVKVCSPNGYSFRILRHILKSFDEIYSGNHRMIGLVKVVIGLALSGSPVPEGL		
20AA	-----		
34AAA	-----		
35AA	-----		
47A	-----		
R58G	--G-----		
99R	-----R-----		
104AAA	-----AAA-----		
132A	-----		
193AAA	-----		
196AAA	-----		
	111		165
SAD L16	NWVYKLRRTFIFQWADSRGPLEGEELEYSQEITWDDDETFVGLQIRVIAKQCHIQ		
20AA	-----		
34AAA	-----		
35AA	-----		
47A	-----		
R58G	-----		
99R	-----		
104AAA	-----		
132A	-----A-----		
193AAA	-----		
196AAA	-----		
	166		202
SAD L16	GRVWCINMNPRACQLWSDMSLQTORSEEDKDSSLLLE		
20AA	-----		
34AAA	-----		
35AA	-----		
47A	-----		
R58G	-----		
99R	-----		
104AAA	-----		
132A	-----		
193AAA	-----AAA-----		
196AAA	-----AAA-----		

**Abbildung 13: Darstellung der Proteinsequenz des Matrixproteins der rekombinanten Viren, die erfolgreich von cDNA-Plasmiden generiert werden konnten.** Mit Hilfe der „reverse genetics“ wurden rekombinante Viren mit den entsprechenden Mutationen hergestellt. Die eingebrachten Mutationen sind durch rote Buchstaben gekennzeichnet. Die Zahlen stellen die Position in der Proteinsequenz dar. R58G (Finke, 2003) wurde als Hi-T Positivkontrolle in allen Experimenten mitgeführt.

### 3.2.1 Wachstumsanalysen der Virusmutanten

Die Wachstumskinetik der Virusmutanten in infizierten Zellkulturen wurde mittels Wachstumskurven bestimmt. Dazu wurden BSR T7/5 Zellen mit einer MOI von 0,1 infiziert. Zellkulturüberstände wurden 24, 36 und 48 Stunden nach der Infektion geerntet und die infektiösen Virustiter (*focus forming units*, ffu) wurden durch Endpunkt titration für die jeweiligen Zeitpunkte bestimmt (Abb. 14).

Im Vergleich zum Wildtypvirus SAD L16 zeigten einige Mutanten eine verminderte Wachstumsrate. Beispielsweise führten die Mutationen 34AAA, 104AAA, 193AAA und 196AAA zu einer ~10-fachen Reduktion der infektiösen Titer. Für die Mutationen 47A und 35AA konnte ein nahezu 100-fach reduzierter infektiöser Virustiter bestimmt werden.



**Abbildung 14: Wachstum der rekombinanten Tollwutviren auf BSR T7/5-Zellen (n=3).** Nach der Infektion von BSR T7/5-Zellen (MOI = 0,1) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten die Zellkulturüberstände geerntet und der infektiöse Virustiter durch Endpunkt titration bestimmt.

### **3.2.2 Untersuchung der RNA-Synthese-Regulation der rekombinanten RV-Viren**

In früheren Arbeiten konnte für das Hi-T-Virus SAD R58G in Northern Hybridisierungen ein anderes Hybridisierungsmuster detektiert werden, als für das Wildtypvirus SAD L16. Während für SAD L16 größere Mengen genomischer RNA als für SAD R58G detektiert werden konnte, zeigte sich ein gegenteiliger Effekt für die mRNA. Diese war in SAD R58G deutlich stärker akkumuliert als in dem Wildtypvirus (Finke et al., 2003). Da für die mutierten Matrixproteine 34AAA, 35AA, 99R und 104AAA in den Komplementierungsexperimenten ähnliche Hybridisierungsmuster wie für R58G detektiert werden konnten (siehe Tab. 4 u. 5, S. 60 u. 61), sollte zur Bestätigung dieser Beobachtungen die RNA-Synthese der verschiedenen rekombinanten Viren in infizierten Zellen untersucht werden.

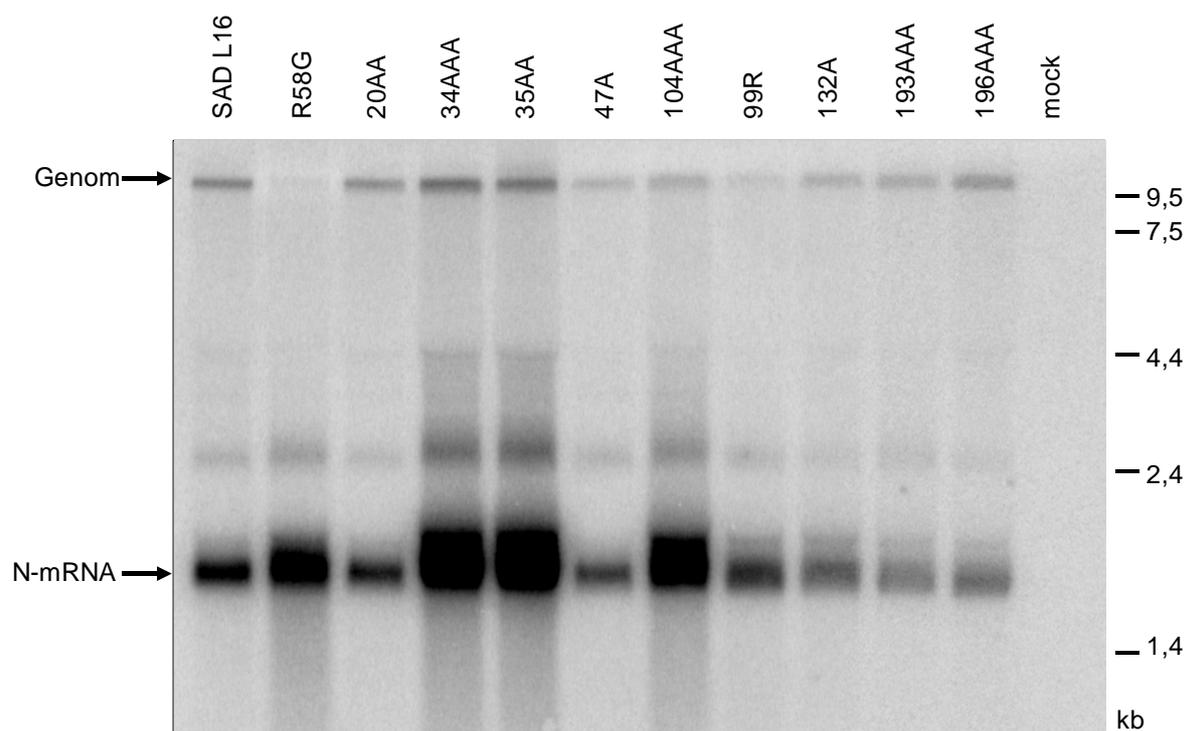
Dazu wurden unterschiedliche analytische Methoden angewendet. Aus infizierten Zellen isolierte RNA wurde dazu in denaturierenden Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und in Northern Hybridisierungen mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden analysiert, die sowohl mit dem Virusgenom (Replikation) als auch mit der viralen mRNA (Transkription) hybridisiert. Als zweite Methode für die Analyse der viralen RNA-Synthese wurde in dieser Arbeit eine quantitative *real time* PCR für das RV entwickelt (siehe Kap. 3.3).

#### **3.2.2.1 Quantifizierung der Virus-RNA-Akkumulierung mittels Northern Hybridisierung**

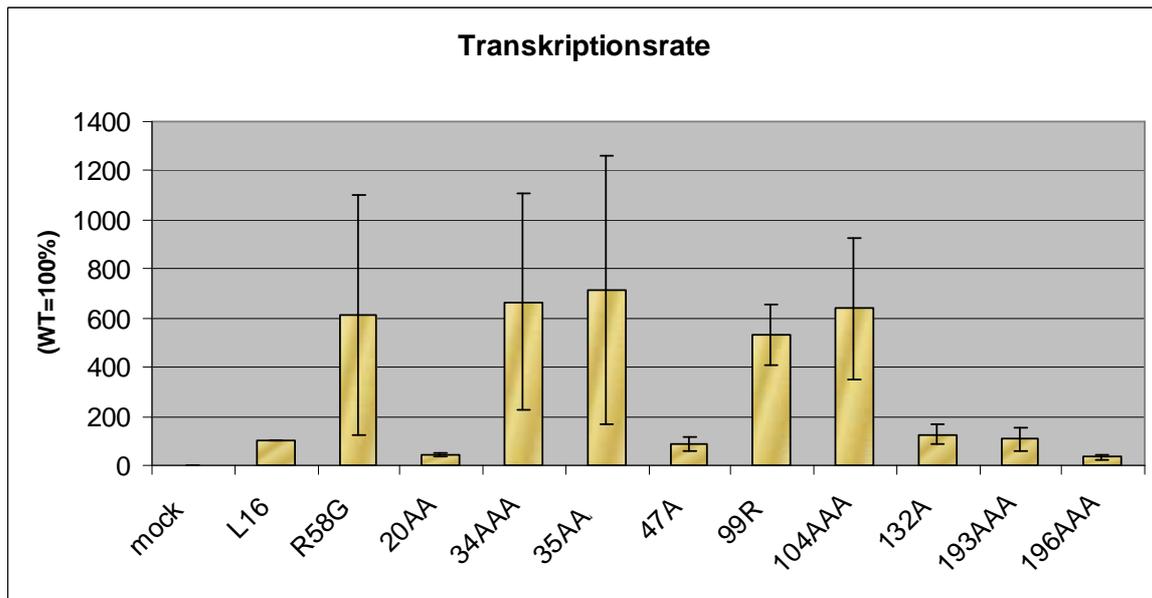
Zur Untersuchung der viralen RNA wurden BSR T7/5-Zellen mit den unterschiedlichen rekombinanten Viren infiziert und nach 24 Stunden die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert. In Northern Hybridisierungen wurden die mRNA und die genomische RNA durch eine N Gen spezifische cDNA Sonde detektiert. Als eine Hi-T Positivkontrolle und zur besseren Einschätzung der neu gewonnenen Hi-T Viren wurde in allen Experimenten die Mutante SADR58G mitgeführt. Wichtig war die Ermittlung der Verhältnisse von mRNA zur genomischen RNA. Dabei konnten die in den transienten Analysen (Kap. 3.1) gewonnenen Ergebnisse weitgehend bestätigt werden.

Die Mutanten SAD R58G, SAD 34AAA, SAD 35AA, SAD 99R und SAD 104AAA (Abb. 15) zeigten eine verglichen zum Wildtyp SAD L16 deutlich stärkere mRNA-Bande. Zusätzlich wiesen die Mutanten SAD R58G, SAD 99R und SAD 104AAA eine schwächere Genom-Bande auf.

Mit Hilfe einer Software (Imagequant 5.0) wurden die Intensitäten der Hybridisierungssignale quantifiziert und ausgewertet. Als Maß für die Transkriptionseffizienz diente das Verhältnis mRNA zur genomischen RNA. Vier Viren, SAD 34AAA, SAD 35AA, SAD 99R und SAD 104AAA, zeigten wie SAD R58G ein *high-transcription* (Hi-T) Phänotyp, SAD 20AA und SAD 196AAA ein *high-replication* (Hi-R) Phänotyp. Die restlichen Viren zeigten keine Besonderheiten (Abb.16).



**Abbildung 15: Northern Hybridisierung der Virus-RNA.** Nach der Hybridisierung mit einer N-Sonde konnte bei einem Vergleich der Mutanten SAD R58G, SAD 34AAA, SAD 35AA und SAD 104AAA zu SAD L16 eine deutliche stärkere mRNA-Bande detektiert werden. Für die Mutanten SAD 20AA und SAD 196AAA wurde eine schwächere mRNA-Bande detektiert.

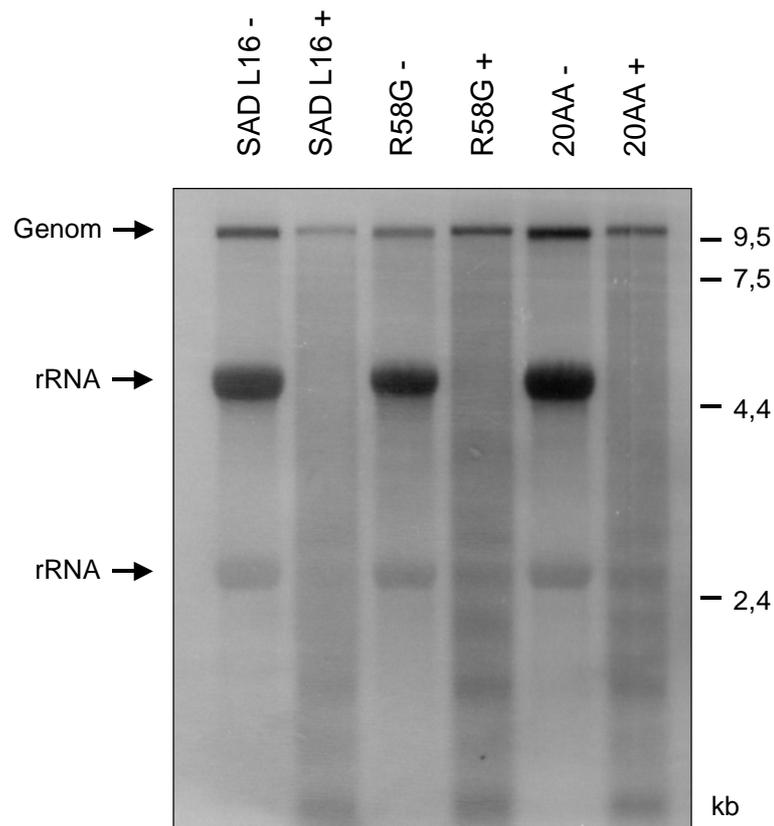


**Abbildung 16: Graphische Darstellung der Transkriptionsrate (n=3).** Basierend auf der Northern Hybridisierung wurden mit Hilfe des Phosphoimagers die Bandenstärken quantifiziert und ausgewertet. Das Verhältnis der Menge an mRNA zu der Menge an genomischer RNA wurde Hilfe einer Software (Imagequant 5.0) bestimmt und graphisch dargestellt. Als Richtwert wurde die Transkriptionsrate des Wildtypvirus SAD L16 auf 100% gesetzt. So konnten 4 Hi-T, 34AAA, 35AA, 99R und 104AAA, und 2 Hi-R Mutanten, 20AA und 196AAA, verifiziert werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Zusätzlich zur Verschiebung des Verhältnisses von mRNA und genomischer RNA in Hi-T Virus infizierten Zellen, konnten in Experimenten Hinweise darauf gefunden werden, dass beispielsweise die Hi-T Mutation R58G neben der gesteigerten Transkription eine deutliche Veränderung im Verhältnis von transkriptionsaktivem (-)-Strang Genom und transkriptionsinaktivem (+)-Strang Antigenom aufwies. Während das ursprüngliche Verhältnis von Genom zu Antigenom beim Wildtypvirus SAD L16 bei 1:49 liegt (Finke und Conzelmann, 1997), wurde für die Hi-T-Mutante R58G ein Verhältnis von 1:1 bestimmt (Finke, unveröffentlicht). Da das Verhältnis von Genom und Antigenom beim Tollwutvirus durch die Aktivitäten der terminalen Replikationspromotoren bestimmt wird, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass die RNA-Syntheseregulation durch das M-Protein über eine Regulation der Promotoraktivitäten erfolgt.

Aus diesem Grund wurde untersucht, ob auch die neu gewonnenen Hi-T Mutanten diesen Phänotyp aufweisen und ob es eine ähnliche, evtl. gegensätzliche Veränderung bei den Hi-R Mutanten gibt. Dazu wurde die RNA-Isolate aus

virusinfizierten Zellen nach Northern Blot mit radioaktiv markierten genom-, bzw. antigenomspezifischen ssRNA-Sonde untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die in diesen Experimenten verwendeten RNA-Sonden unspezifisch an die ribosomale RNA der infizierten Zellen binden. Um diesen störenden Hintergrund zu reduzieren, wurde vor der RNA-Isolation ein Nukleaseverdau durchgeführt. Die Genom- und Antigenom-RNA ist durch die Bildung der RNPs vor RNase-Verdau geschützt (Abb.17).

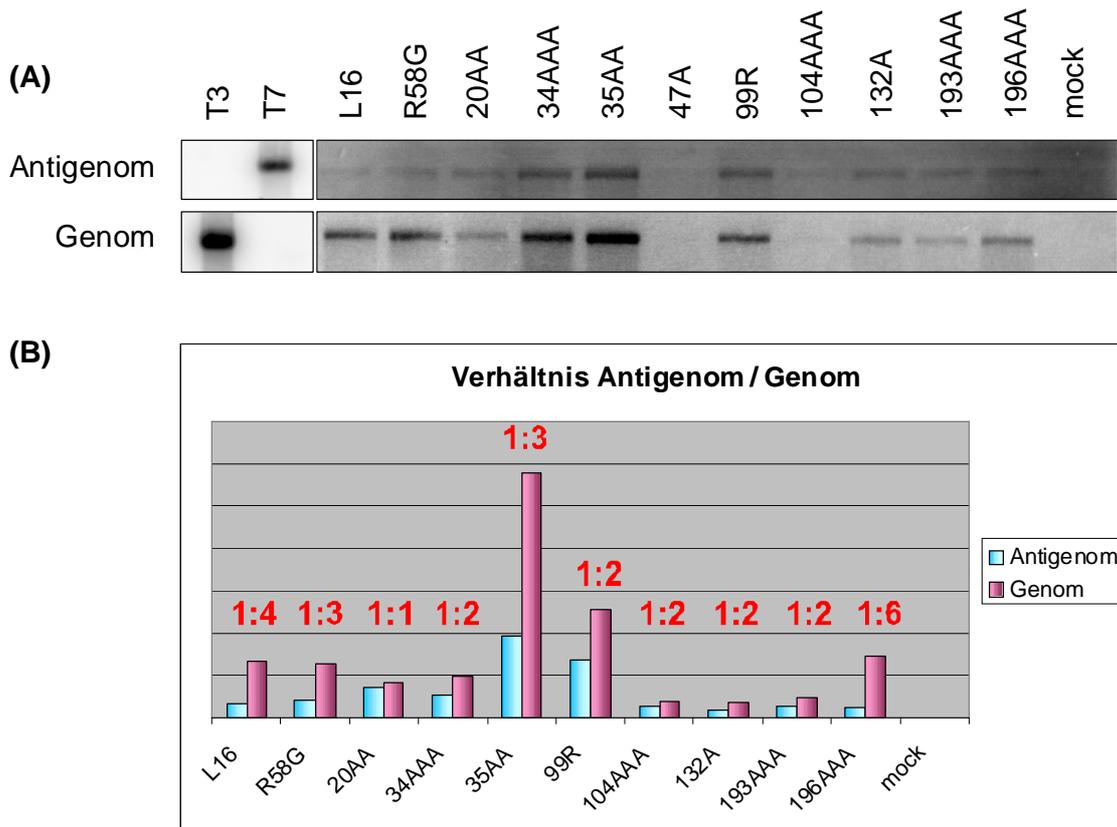


**Abbildung 17: Northern Hybridisierung von Nuklease unbehandelter und behandelter RNA.** Als Sonde wurde eine für das Genom spezifische RNA eingesetzt. Mit Hilfe der S1-Nuklease wurde der störende Hintergrund, verursacht durch die 18 S- und 28 S- rRNA, weitgehend beseitigt. Unbehandelte RNA wird durch ein -, behandelte RNA durch ein + gekennzeichnet.

Als Kontrolle der Strangspezifität der RNA-Sonden wurden neben der zu untersuchenden RNA, nicht-radioaktiv markierte *in vitro*-Transkripte (T7 und T3) aufgetragen (Abb. 18).

Die Mutanten SAD 20AA und SAD 104AAA zeigten ein nahezu 1:1 Verhältnis zwischen der Menge an Genom und Antigenom. Für die übrigen Mutanten konnte

festgestellt werden, dass mehr genomische RNA als antigenomische RNA detektiert wurde, jedoch ist der Unterschied im Verhältnis nicht so groß wie bei Wildtyp L16. Mit einem Verhältnis von ca. 1:4 (Antigenom:Genom) ist der Mengenunterschied bei L16 um mind. einen Faktor größer als bei den übrigen Viren. Aufgrund von sehr schwachen bis zu gar nicht detektierbaren Banden der Mutante SAD 47A, konnte keine quantitativen Aussagen gemacht werden (Abb. 18).



**18: (A) Bestimmung des Genom- und Antigenom-RNA Verhältnisses.** Northern Hybridisierung von Nuklease behandelte RNA mit genom-, bzw- antigenomspezifischen Sonden. Es konnten im Vergleich zu SAD L16 keine Veränderungen im Verhältnis des Genoms zum Antigenom festgestellt werden. Zur besseren Darstellung der Banden, wurden die Abbildungen in ihrer Intensität modifiziert. **(B)** Graphische Darstellung der Northern Hybridisierung von Genom und Antigenom (n=2). Für eine bessere Übersicht wurde mittels eines Programms (ImageQuant 5.0) die Northern Hybridisierung ausgewertet und die RNA-Mengen graphisch dargestellt. Da nur das Verhältnis der RNA-Mengen zueinander untersucht werden sollte, wurde keine absolute Quantifizierung von Genom- und Antigenom-RNA durchgeführt.

### 3.3 Etablierung einer Tollwutvirus-spezifischen quantitativen RT-PCR (RT-qPCR)

Die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) ist die Methode der Wahl, um kleinste Mengen an DNA zu detektieren. Bei der qPCR wird ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, welcher sich an dsDNA anlagert und mit Hilfe von UV-Licht angeregt wird. Die neu amplifizierte DNA kann so leicht über ihre Emission des interkalierten Fluoreszenzfarbstoffs detektiert und quantifiziert werden und ermöglicht eine Aussage über die Ausgangsmenge der DNA (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Das geschieht in der Regel mit dem Farbstoff SYBR<sup>®</sup>-green, der unspezifisch in die dsDNA interkaliert (Morrison et al., 1998). Möchte man allerdings bestimmte DNA-Abschnitte nachweisen, müssen sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden eingesetzt werden. Diese Methode basiert auf der FRET-eigenschaft (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) der an die Oligonukleotide gebundenen Farbstoffe. Bei einem maximalen Abstand von 1-5 Nukleotiden auf der Ziel-DNA binden kann ein Energietransfer des Donors auf den benachbarten Akzeptor resultieren und Licht emittiert werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridisierungssonden wurden so ausgesucht, dass ein Oligonukleotid den Donorfarbstoff am 3'-Ende gebunden hat (Fluorescein) und das andere am 5'-Ende den Akzeptorfarbstoff (z.B. LC Red 640 oder LC Red 705). Bei einer sequenzspezifischen Anlagerung der Sonden an die amplifizierte Ziel-DNA kann ein Energietransfer stattfinden und der Akzeptorfarbstoff wird angeregt. Die Akzeptorfluoreszenz steigt proportional mit der Konzentration komplementärer DNA. Durch ein Fluorimeter im LightCycler<sup>®</sup> wird nach jedem PCR-Zyklus die Fluoreszenz gemessen und so die Menge an amplifizierter DNA bestimmt. Die einzelnen Fluoreszenzwerte werden am Ende des Laufs aneinandergereiht und ergeben eine Amplifikationskurve. Die Quantifizierung der amplifizierten DNA erfolgt mit Hilfe des sogenannten CP-Werts (*Crossing Point*). Der CP-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt.

Im Idealfall erfolgt in 3,33 Zyklen eine Verzehnfachung der Ausgangsmenge. Um eine möglichst effiziente qPCR für das Tollwutvirus zu etablieren, wurden in dieser Arbeit verschiedenen Parameter, so z.B. Mg-Konzentration,

Annealingtemperatur und die Konzentration der Primer-, bzw. Hybridisierungssonden, optimiert.

### **3.3.1 Primerauswahl und Hybridisierungssonden**

#### **3.3.1.1 Auswahl der Zielsequenz für die qPCR**

Da die mRNA des Nukleoproteins entsprechend ihrer Position auf dem Virusgenom am häufigsten transkribiert wird, eignet sie sich besonders gut als die Zielsequenz für die Detektion viraler mRNA. Um Transkriptionsprodukte von Replikationsprodukten unterscheiden zu können wurden die Primer so gewählt, dass sie entweder selektiv mit (-)-Strang Genom RNA oder mit (+)-Strang Antigenom und mit (+)-Strang N-mRNA hybridisieren. Durch die weitaus größeren Mengen an mRNA konnte davon ausgegangen werden, dass durch die (+)-Strang erkennende Sonde vornehmlich mRNA detektiert wird. Die Polarität der nachgewiesenen RNA wurde durch die für die Reverse Transkription (RT) gewählten Primer (RV Nrev, bzw. RV Nfor) bestimmt. Die amplifizierte dsDNA wurde anschließend in die qPCR eingesetzt. Die Hybridisierungssonden wurden so ausgesucht, dass sie auf dem zu amplifizierenden Genabschnitt binden konnten (Abb. 19, grün und rot dargestellt). Als Donor wurde Fluorescein und als Akzeptor wurde LCRed-705 gewählt.



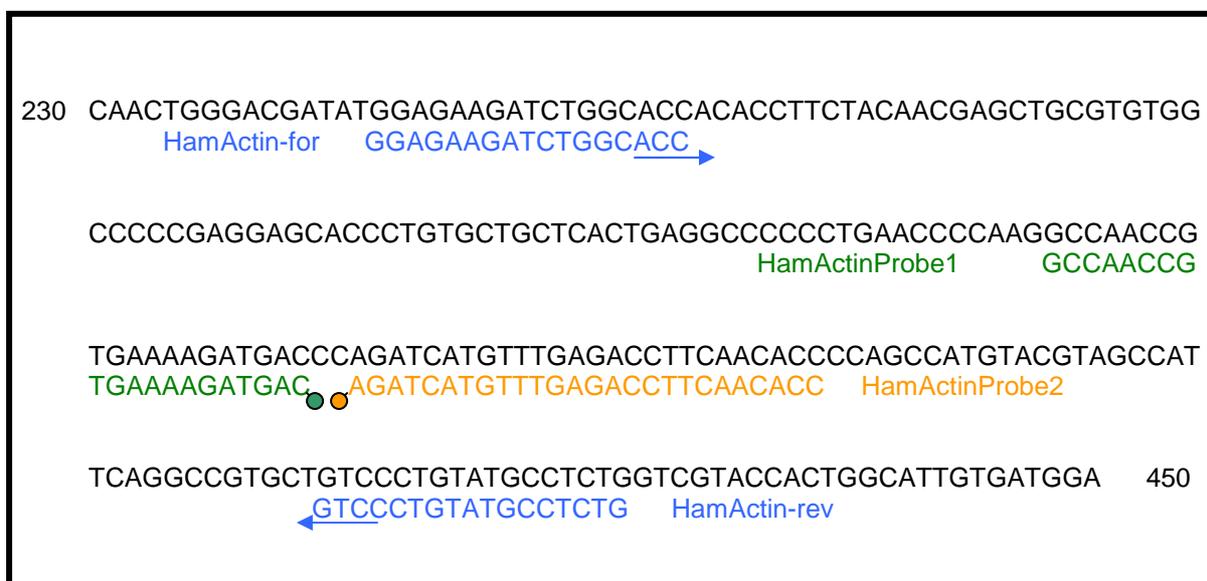
**Abbildung 19: Sequenzabschnitt des Nukleoproteins.** Gezeigt ist der Sequenzabschnitt von Position 170 bis 450. In blau dargestellt sind die Primer, die in der qPCR zur Amplifikation der dsDNA eingesetzt wurden. An dieser konnten anschließend die Hybridisierungssonden binden. Diese sind in rot (LCRed705-Farbstoff) und grün (Fluorescein-Farbstoff) dargestellt.

Um die optimale Primerkonzentration zu ermitteln, wurde eine Primertitration durchgeführt. Dazu wurden die Primer mit unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Kombinationen eingesetzt. Als *Template* diente die revers transkribierte cDNA einer RNA, die aus SAD L16 infizierten Zellen isoliert wurde. Zur Ermittlung der idealen Konzentration an Hybridisierungssonden wurde, wie oben beschrieben, vorgegangen. Die höchste Effizienz konnte bei einer Primerkonzentration von 0,5µM und einer Hybridisierungssonden-Konzentration von 0,4µM erreicht werden (Abb. 21).

### 3.3.1.2 β-Aktin

Als interne Kontrolle der Polymerasekettenreaktion können sogenannte *Housekeeping*-Gene eingesetzt werden. Diese Gene sind „hauseigene“ zelluläre Gene, die konstitutiv transkribiert werden und somit als Maß für die Effizienz der

Synthesereaktion genutzt werden können. Als *Housekeeping* Gen wurde das  $\beta$ -Aktin Gen des Hamsters (Abb. 20) ausgesucht, welches als Positivkontrolle für die RT-PCR und zum Mengenabgleich virusspezifischer RT-Produkte diente. Die Hybridisierungssonden dieser Reaktionen wurden mit Fluorescein als Donorfarbstoff und LCRed-640 als Akzeptorfarbstoff markiert. Durch die Wahl eines anderen Akzeptorfarbstoffs war es möglich eine Multiplex-RT-PCR durchzuführen, d.h. die N-mRNA-Amplifikation/Detektion konnte parallel zu der Aktin-mRNA-Amplifikation/Detektion in einem Reaktionsgefäß durchgeführt werden.



**Abbildung 20: Sequenzabschnitt des  $\beta$ -Aktins.** Gezeigt ist der Nucleinsäuresequenzabschnitt des  $\beta$ -Aktin Gens, der die Aminosäuren von 230 bis 450 entspricht. In blau dargestellt sind die Primer, die in der qPCR zur Amplifikation der dsDNA eingesetzt wurden. An dieser konnten anschließend die Hybridisierungssonden binden. Diese sind in orange (LCRed640-Farbstoff) und grün (Fluorescein-Farbstoff) dargestellt.

Um die qPCR zu optimieren, wurden wie bereits für die N-spezifische RT-Reaktion beschrieben, die Primer und Hybridisierungssonden des  $\beta$ -Aktins titriert. Die optimale Konzentration der Primer konnte bei  $0,5\mu\text{M}$  und die der Hybridisierungssonden bei  $0,4\mu\text{M}$  festgelegt werden und entsprach damit den ermittelten Konzentrationen der N-spezifischen qPCR. Die PCR zeigte so die höchste Effizienz (Abb. 21).

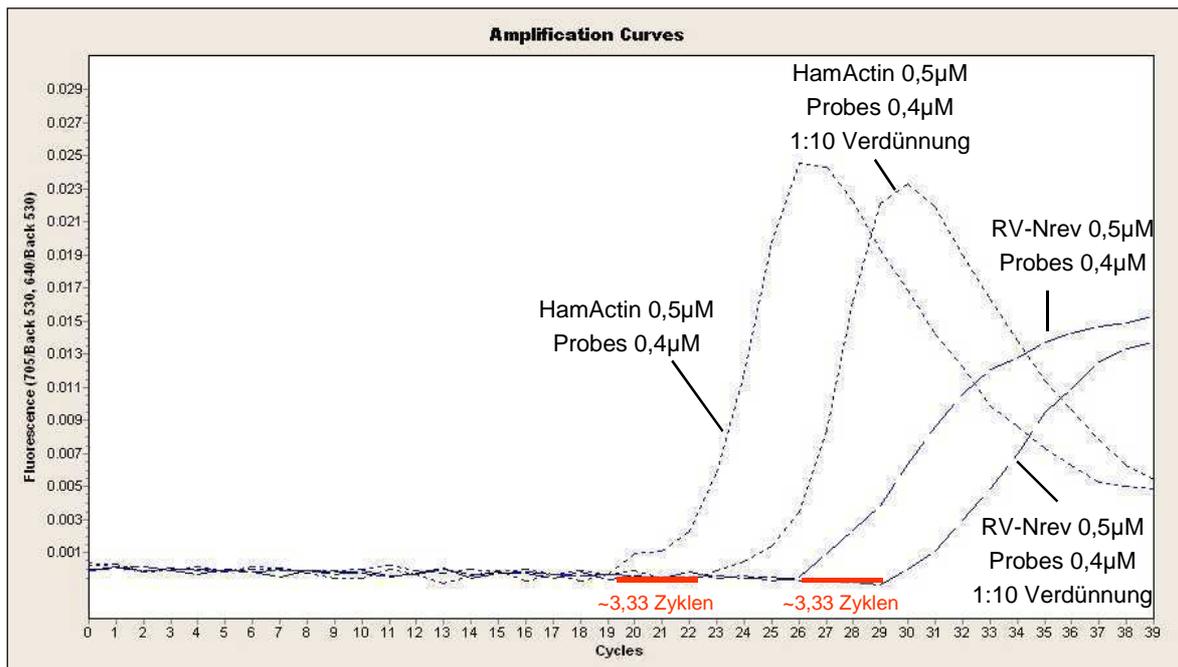
### 3.3.2 Annealingtemperatur

Die Annealingtemperatur (Hybridisierungstemperatur) ist wichtig für die Exaktheit einer PCR-Reaktion. Sie bestimmt ob und wie spezifisch die Primer an die Template-DNA hybridisieren. Um die Annealingtemperatur zu ermitteln, wurde die Temperatur ausgehend von 55 °C in jedem weiteren Experiment um 1 °C erhöht. Eine zu niedrige Annealingtemperatur resultiert in unspezifischen Bindungen der Primer und in der Synthese unspezifischer Genprodukte. Ein weiterer Effekt ist eine Ineffizienz der PCR, erkennbar an der größeren Zyklenzahl die benötigt wird, um eine Verzehnfachung der DNA-Menge zu bekommen. In der PCR mit einer Annealingtemperatur von 55 °C lag die Zyklenzahl statt bei 3,33 Zyklen bei etwa 5-6. Es konnte festgestellt werden, dass eine Annealingtemperatur von 58 °C die besten Ergebnisse produzierte (Abb. 21).

### 3.3.3 Mg<sup>2+</sup> Konzentration

Ein weiterer Faktor, der die Effizienz einer PCR beeinflussen kann, ist die Mg<sup>2+</sup> Konzentration. Zum einen dienen Magnesium-Ionen als Kofaktoren der Polymerase und zum anderen stabilisieren sie die spezifische Anlagerung der Primer an die Template-DNA. So kann eine zu niedrige Konzentration von Mg<sup>2+</sup>-Ionen zur Synthese unspezifischer PCR-Produkten führen.

In Folgendem sollte der Einfluss der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration auf die qPCR evaluiert werden. Dazu wurden mehrere Ansätze mit dem RV Nfor-Primer und dem RV Nrev-Primer mit unterschiedlichen Magnesiumkonzentrationen (3 mM – 4,5 mM) eingesetzt. Der CP-Wert liegt bei den Ansätzen mit dem RV Nfor-Primer bei CP 23 und mit dem RV Nrev-Primer bei CP 17. Es konnten jedoch keine Unterschiede bezüglich der Sensitivität oder der Primerspezifität beobachtet werden, so dass für weitere Versuche mit einer Konzentration von 3mM (entsprechend der Originalkonzentration des im Kit enthaltenen Puffers) weitergearbeitet wurde.



**Abbildung 21: Amplifikationskurve nach Optimierung der Annealingtemperatur und der Primerkonzentrationen.** Durch den geringen Gehalt der PCR-Produkte in den ersten Amplifikationszyklen wird die Hintergrundfluoreszenz nicht überschritten und die Amplifikationskurve entspricht der Basislinie. Die darauffolgende nahezu exponentielle Vermehrung der DNA wird durch den steilen Anstieg der Amplifikationskurve dargestellt. Diese nimmt im Anschluss durch den Substratverbrauch und der Enzymschöpfung ab. Da sich der CP-Wert der unverdünnten Probe um etwa 3,33 Zyklen zu dem CP-Wert der 1:10 Verdünnung unterscheidet, kann davon ausgegangen werden, dass die Effizienz beider qPCRs bei nahezu 100% liegt. Eine Auswertung mit Hilfe der Software ergab eine Effizienz von 96% für die Amplifikation des Genoms und 98% für die der RNA. Die optimale Primerkonzentration (RV-N und HamActin) liegt bei 0,5µM und die der HybridisationSonden bei 0,4µM. Als *Template* diente die cDNA einer reversen Transkription einer RNA-Isolation aus SAD L16 infizierten Zellen.

### 3.3.4 Standardkurven

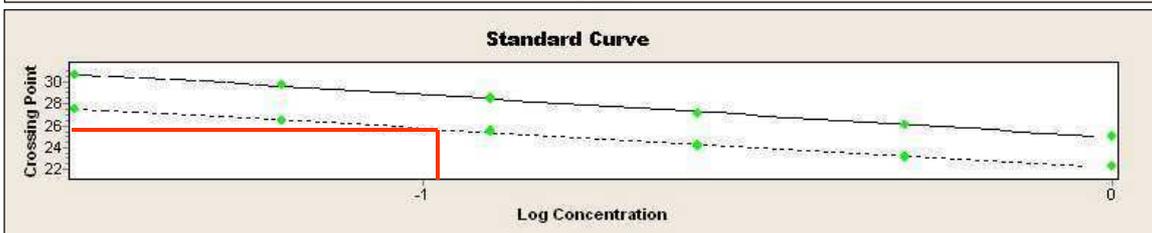
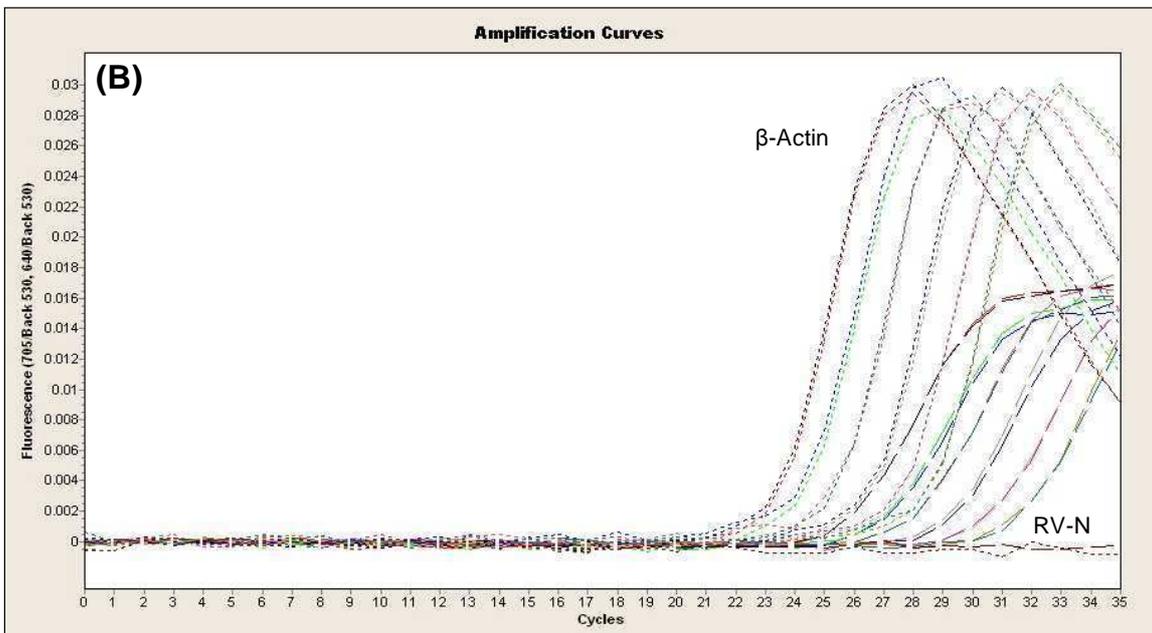
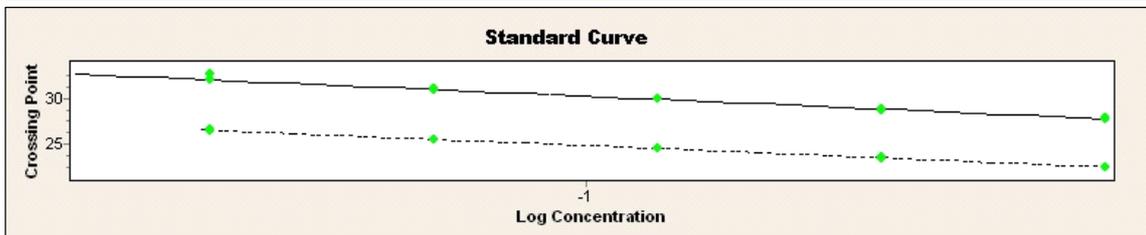
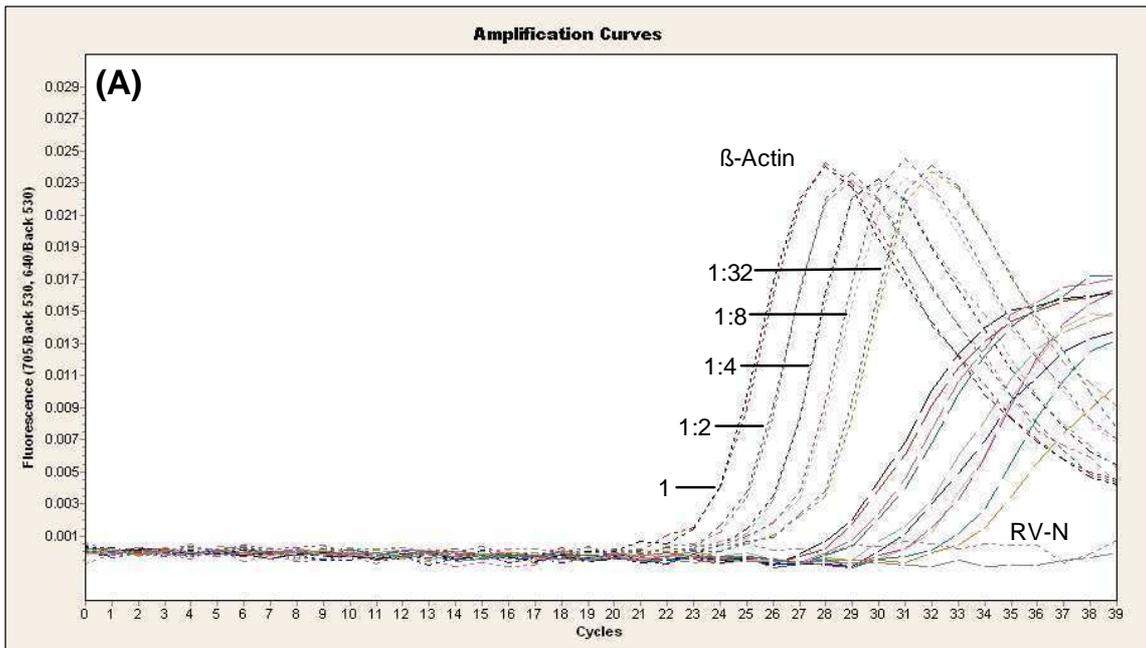
Mit Hilfe einer Standardkurve ist es möglich, die Mengen der PCR-Produkte zu quantifizieren. Zur Herstellung einer Standardkurve wird eine Verdünnungsreihe eines Standards mit bekannter Konzentration in der PCR-Reaktion eingesetzt. Die

ermittelten CP-Werte werden anschließend gegen die Logarithmische Konzentration der Standards aufgetragen. Solange ein Standard mit definierter Konzentration während des aktuellen Laufs mitgeführt wird, können mit Hilfe der Standardkurve die Konzentrationen anhand des CP-Wertes abgelesen werden.

Um eine absolute Quantifizierung zu ermöglichen, wurden Standardkurven für RV-N und  $\beta$ -Aktin erstellt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe RV-N und  $\beta$ -Aktin kodierender DNA angesetzt (1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:32, entsprechen 1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,25  $\mu$ g, 0,125  $\mu$ g und 0,3125  $\mu$ g Gesamt-DNA pro Ansatz) und in doppelten Ansätzen in die PCR-Reaktion eingesetzt. Die Reaktionen wurden jeweils mit den RV N (jeweils forward und reverse) und den  $\beta$ -Aktin-Primern durchgeführt. Die Standardkurve wurde mit Hilfe der Roche LightCycler®-Software 4.0 erstellt.

Die Kurven der 1:8 Verdünnung beginnen etwa 3 Zyklen nach der Kurve der Originalkonzentration zu steigen. Dies entspricht in etwa der Erwartung einer Verzehnfachung in 3,33 Zyklen (Abb. 22).

Die Effizienz der Standardkurve einer optimierten PCR sollte gleich 2 sein, da in einem Amplifikationszyklus die Menge der DNA verdoppelt werden sollte. Eine Auswertung mit Hilfe der Software ergab eine Effizienz von 1,87 (~94%) für die Amplifikation des Genoms und 1,96 (~98%) für die der RNA. Für die Quantifizierung wurden größere Mengen an N- und Aktin-DNA hergestellt, die zum einen zur Erstellung der Standardkurven dienten und zum anderen als definierte Standards in die Quantifizierungsläufe eingesetzt wurden. Mit Hilfe dieser Standardkurven war eine Quantifizierung des Genoms ((-)-Strang RNA) und der mRNA ((+)-Strang RNA) möglich, vorausgesetzt ein Standard dieser Standardkurve mit definierter Konzentration wurde in jedem Lauf mitgeführt.



**Abbildung 22: Standardkurven der qPCR. (A) für die Quantifizierung des Genoms (-)-Strang RNA. (B) für die Quantifizierung der mRNA (+)-Strang RNA.** Aus Tollwut-N-cDNA / Aktin-cDNA wurde eine Verdünnungsreihe (1, 1:2, 1:4, 1:8 und 1:32) erstellt, die zur Herstellung einer Standardkurve eingesetzt wurde. Dazu wurden jeweils die RV-N for-Primer oder die RV-N rev-Primer mit den Aktin-Primern in die Reaktion eingesetzt. Die ermittelten CP-Werte wurden gegen die Logarithmische Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Standardkurve konnten anschließend die Konzentrationen anhand des CP-Wertes abgelesen werden (rote Linie). Liegt der CP-Wert einer unverdünnten Probe um Faktor 3,33 unter dem CP-Wert einer 1:10 verdünnten Probe, ist die Effizienz einer qPCR nahezu 100%.

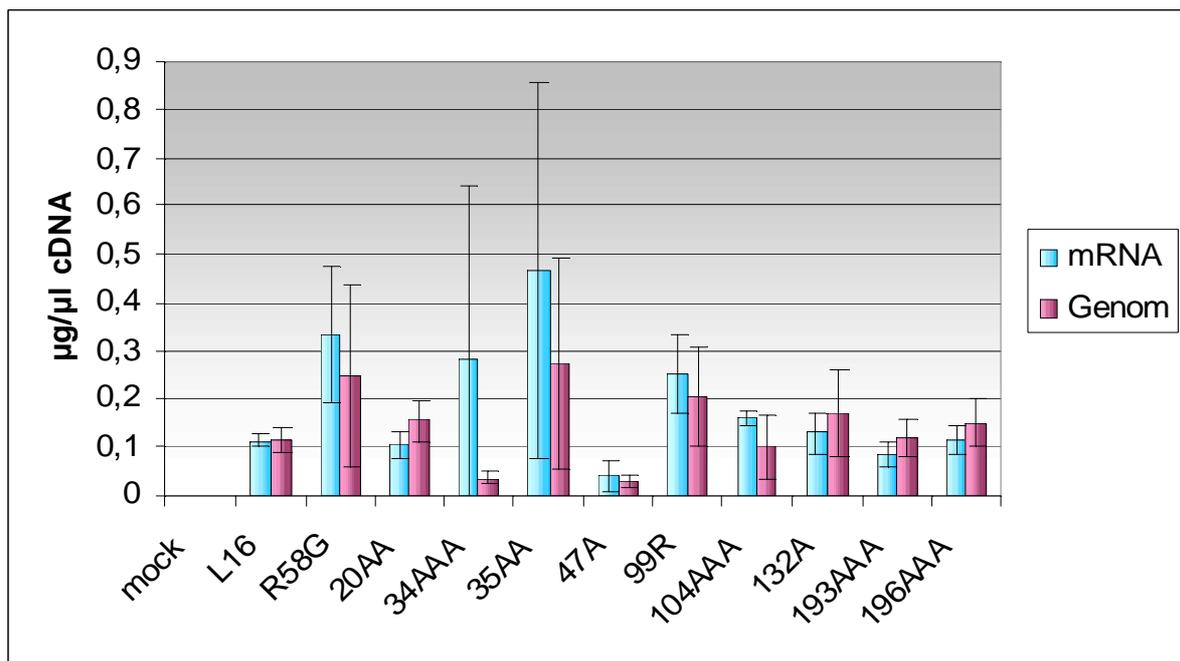
### 3.3.5 Quantifizierung der RV-RNA und des RV-Genoms

Um die Ergebnisse der Northern Hybridisierung zu bestätigen, wurde nach 24 Stunden die RNA infizierter BSR T7/5 Zellen isoliert, durch eine RT-PCR revers transkribiert und die so gewonnene cDNA mit Hilfe der etablierten qPCR quantifiziert. Da höhere Konzentrationen an DNA in einer qPCR dazu führen können, dass die Substratmengen zu schnell umgesetzt, bzw. verbraucht werden und zu falsche Ergebnisse führen, wurde die jeweilige cDNA 1:10 verdünnt. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe der erstellten Standardkurven und der entsprechenden Software (Roche LightCycler<sup>®</sup> Analysesystem 2.0) durchgeführt.

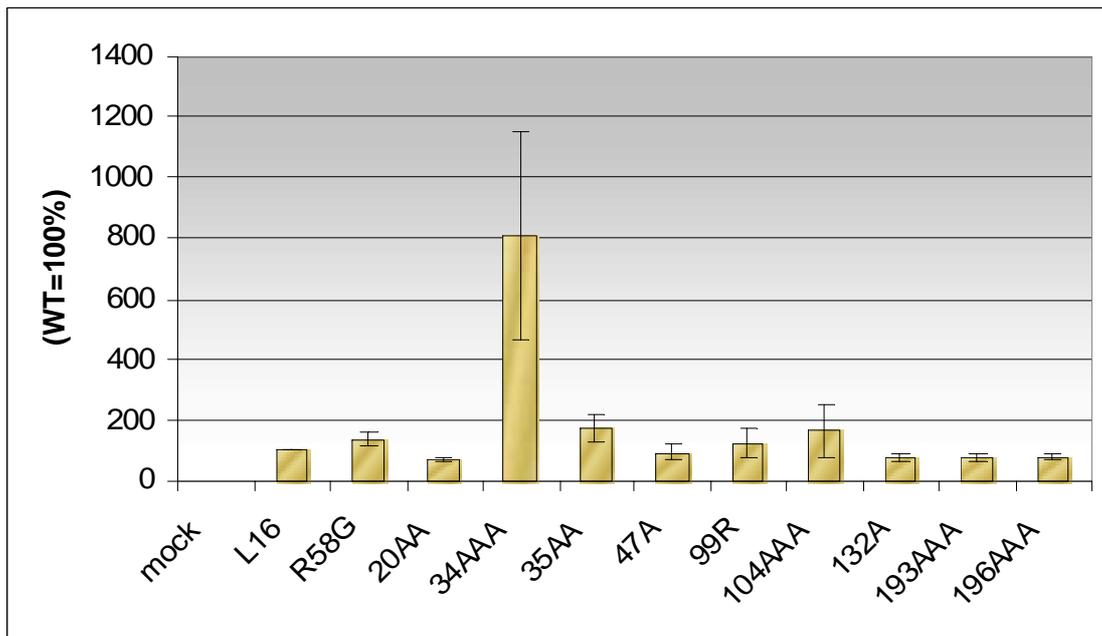
Die Ergebnisse der Northernhybridisierung ließen sich weitestgehend bestätigen. Die Hi-T Mutanten SAD R58G, SAD 34AAA, SAD 35AA, SAD 99R, SAD 104AAA zeigten in der quantitativen realtime-PCR (qPCR) den gleichen Phänotyp, wenn auch weit weniger ausgeprägt als in den Northern Hybridisierungen (Abb. 23). Mit Ausnahme von SAD 34AAA zeigen die Hi-T Mutanten in der qPCR eine um den Faktor 4 geringere Transkriptionsrate als in der Northern Hybridisierung (Abb. 24). Die Hi-R Mutanten SAD 20AA und SAD 196AAA zeigten ebenfalls den gleichen Phänotyp wie zuvor in den Northern Hybridisierungen, aber auch hier zeigte sich dieser Effekt weniger stark. Die qPCR zeigte einen um etwa Faktor 2 weniger starken Hi-R Phänotyp (Abb. 25).

Die Ergebnisse der Genom/Antigenom Analyse sollten ebenfalls durch die qPCR verifiziert werden. Da durch die Nukleasebehandlung die Aktin mRNA verdaut wurde, wurde in diesen Ansätzen nur RV-N Primer und Hybridisierungssonden eingesetzt. Da somit kein Abgleich mit Aktin möglich war, konnte nur eine relative Quantifizierung durchgeführt werden. Ebenso ist ein Vergleich der Mengen an

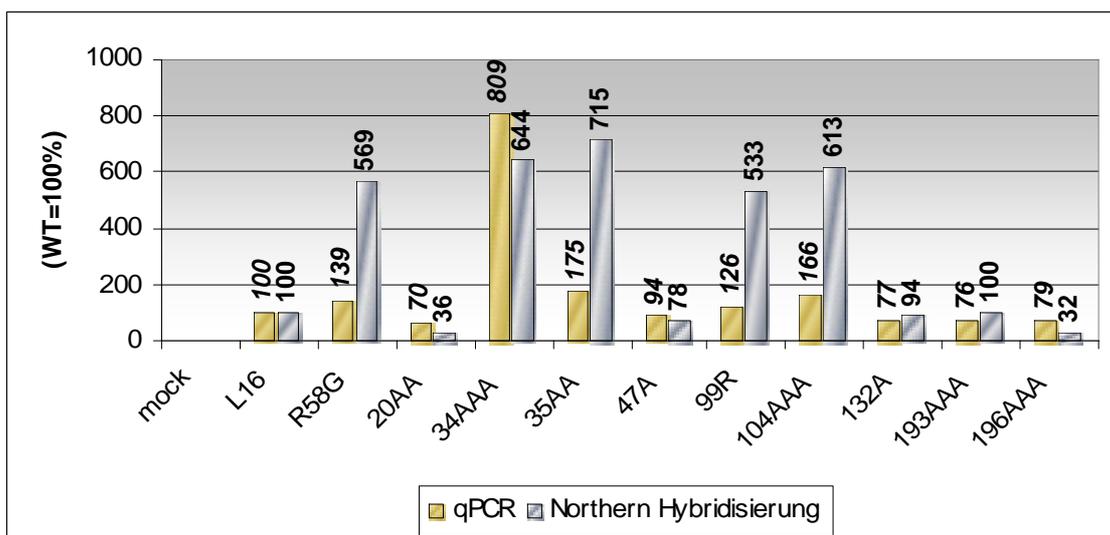
Genom und Antigenom zueinander nicht möglich, da durch die separaten Ansätze keine gleiche Effizienz der Reaktionen gewährleistet werden kann. Es wurde für SAD L16 und für die Mutanten eine weit höhere Menge an Genom als Antigenom detektiert (Abb.26), welches besonders im Falle der Hi-R Mutanten SAD 20AA, widersprüchlich zu den Ergebnissen der Northern Blots ist.



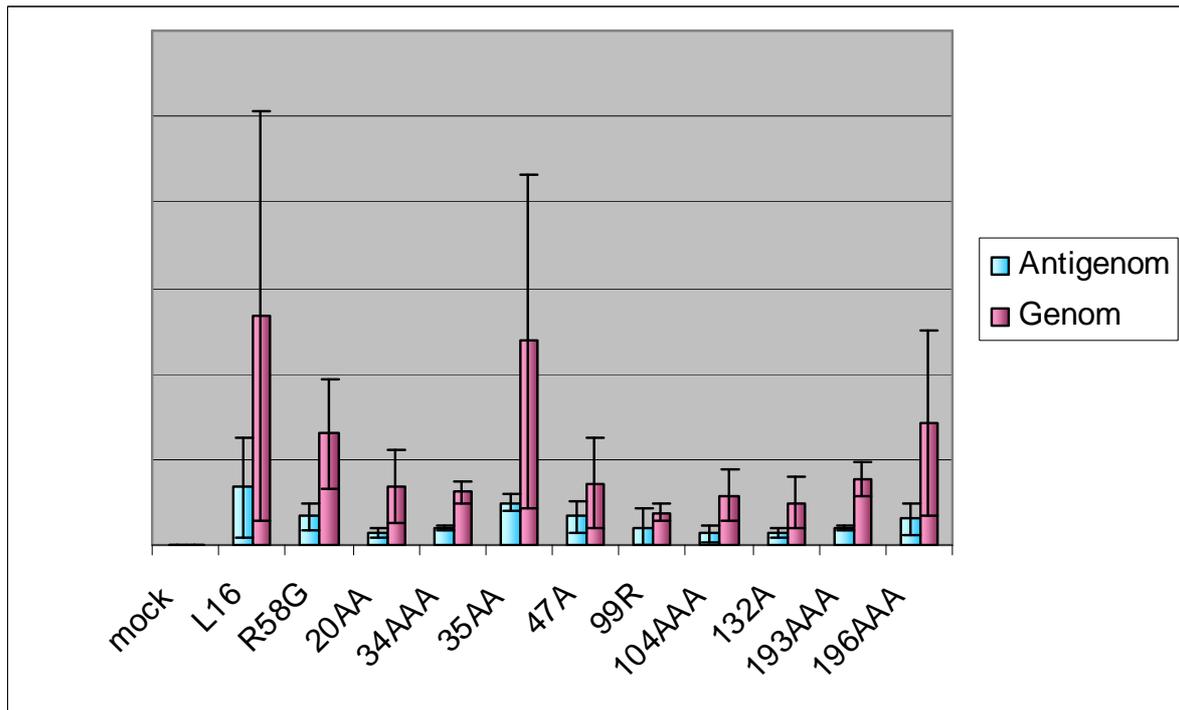
**Abbildung 23: Akkumulation von Genom- und Antigenomischer Virus-RNA in infizierten Zellen.** Zur Verifizierung der durch Northern Hybridisierungen erzielten Ergebnisse wurden sowohl virale (+)-Strang RNA (mRNA + Antigenom) und (-)-Strang RNA (Genom) der angezeigten Viren mittels qPCR quantifiziert. Die dabei erhaltenen Werte sind graphisch dargestellt. Dazu wurde die RNA durch eine RT-PCR revers transkribiert und die so gewonnen cDNA in der qPCR eingesetzt. Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der erstellten Standardkurven und der Software (Roche Light-Cycler® Software 4.0). Für den Mengenabgleich gegen eine zelluläre mRNA wurde parallel  $\beta$ -Aktin-mRNA detektiert. Pro Ansatz wurden drei Quantifizierungen durchgeführt.



**Abbildung 24: Transkriptionsrate.** Um das Verhältnis von mRNA-Akkumulation und RNA-Replikation darzustellen, wurden die gegen  $\beta$ -Aktin abgeglichenen Messwerte für die virale (+) und (-)-Strang RNA miteinander in Beziehung gesetzt. Dabei wurden die Werte für die (+)-Strang-RNA durch die für die (-)-Strang-RNA dividiert. Da der überwiegende Teil der viralen RNA aus mRNA besteht, kann bei der (+)-Strang RNA der Anteil an Antigenom vernachlässigt werden und der Quotient gibt die Akkumulation von mRNA relativ zur Genomischen RNA wieder.



**Abbildung 25: Vergleich der Transkriptionsraten qPCR und Northern Hybridisierung.** Wenn auch der Phänotyp aller Mutanten durch die qPCR bestätigt werden konnten, so zeigte sich dieser weniger ausgeprägt. Verglichen wurde jeweils der Mittelwert dreier Quantifizierungen von qPCR und NB.



**Abbildung 26: qPCR Nuklease-verdauter VirusRNA.** Zur Ermittlung der genomischen RNA-Menge verglichen zur antigenomischen RNA-Menge wurde die nukleasebehandelte RNA wie in Abb. 21 beschrieben in eine qPCR eingesetzt. Ein Abgleich mit Aktin war nicht möglich, da diese mRNA durch den Nukleaseverdau abgebaut wurde. Aus diesem Grund können nur die Mengen der genomischen und der antigenomischen RNA zueinander verglichen werden.

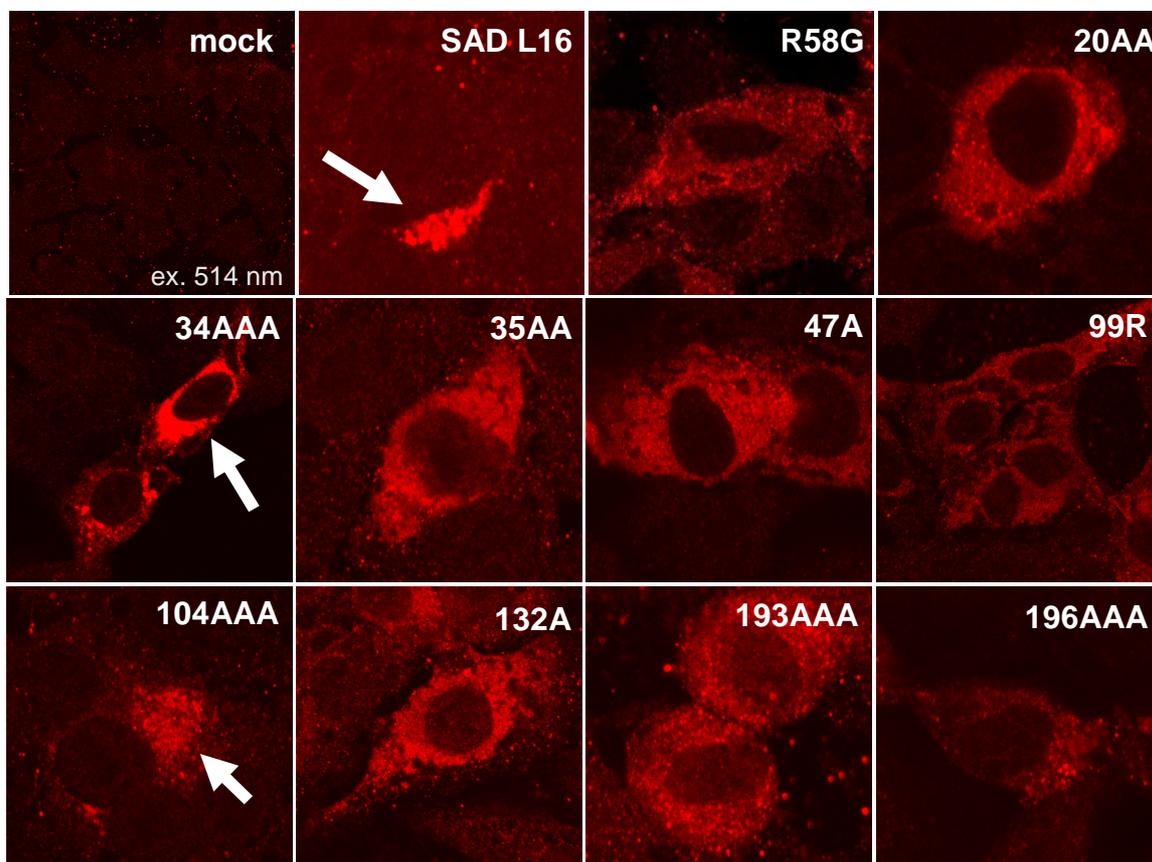
### 3.4 Intrazellulären Lokalisation der mutierten M-Proteine in virusinfizierten Zellen

#### 3.4.1 Immunfluoreszenz

In den Versuchen, in denen mutierte M-Proteine transient in plasmidtransfizierten Zellen exprimiert wurden, konnte in Immunfluoreszenzaufnahmen beobachtet werden, dass die vermeintlichen Hi-T Mutanten eine diffusere Verteilung des M-Proteins im Zytoplasma der Zelle, die putativen Hi-R Mutanten dagegen eine verstärkte Anlagerung an die äußere Zellmembran aufwiesen (siehe Abb. 12, S. 65). Da die unterschiedliche intrazelluläre Verteilung ein möglicher Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen M-Proteinverteilung und RNA-Regulation sein könnte, wird untersucht, ob sich diese

Beobachtung im viralen Kontext, d.h. in Anwesenheit aller Virusproteine, bestätigen lässt. Dazu wurden verschiedene Zelllinien mit den unterschiedlichen rekombinanten Virusmutanten infiziert und nach 24 Stunden Inkubation mit Hilfe der Immunfluoreszenz mikroskopisch untersucht.

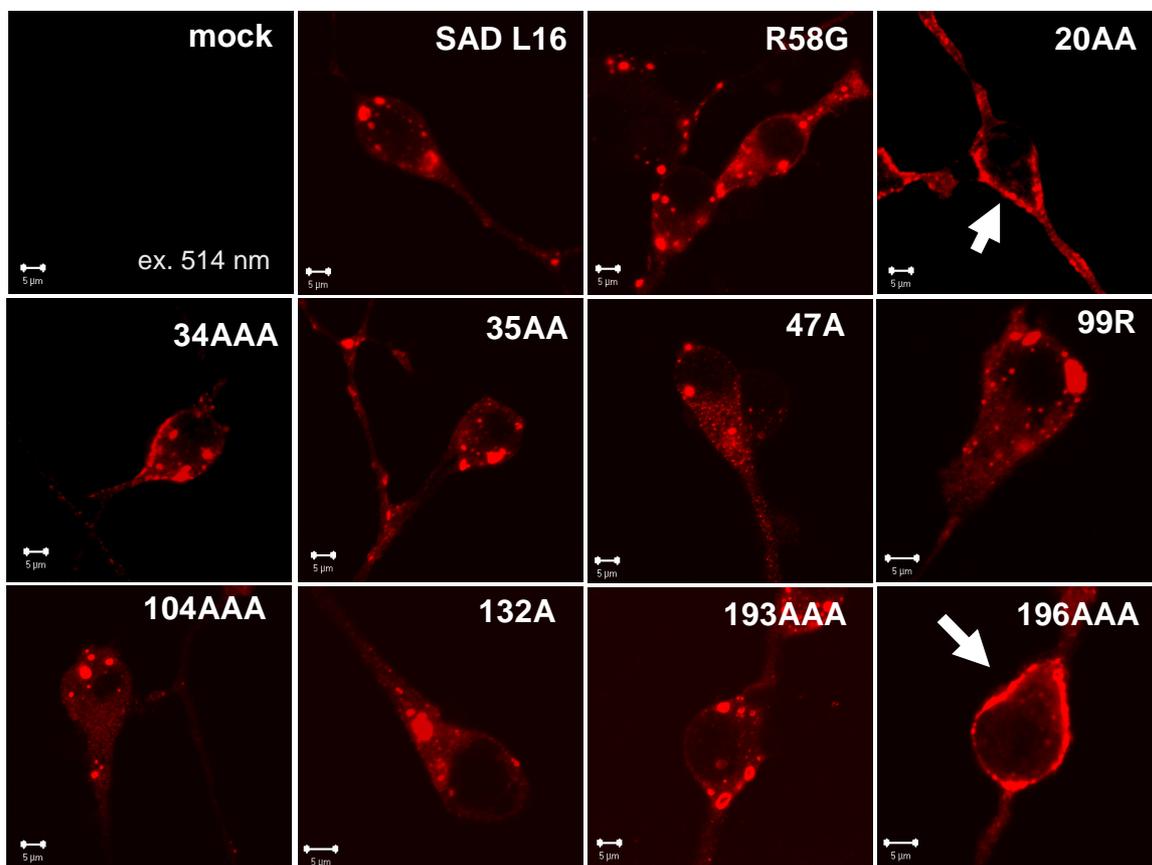
Es konnte nach einer Infektion von BSR T7/5-Zellen keine markanten Unterschiede der intrazellulären M-Verteilung zwischen den Mutanten und dem Wildtyp SAD L16 beobachtet werden. In allen Zellen war die Verteilung des Matrixproteins mehr oder weniger diffus. Möglicherweise unterdrücken dominante Komplexbildung des M Proteins mit anderen Proteinen die markante M-Verteilung. Eine typische Anlagerung um den Golgi- oder ER-ähnlichen Strukturen konnte vereinzelt beobachtet werden (weiße Pfeile, Abb. 27).



**Abbildung 27:** Immunfluoreszenzaufnahmen von virusinfizierten BSR T7/5-Zellen (63x Ölobjektiv, 2fach digitaler Zoom (ohne 99R)). 24 Stunden nach Infektion (MOI=1) wurden die Zellen mit 0,3 % PFA fixiert und mit spezifischem M-Antikörpern (M2D4 und M1B3 1:200; Sekundärantikörper:  $\alpha$ -rabbit Alexa633 1:200) gefärbt.

Da es sich bei Tollwut um ein neurotropes Virus handelt, wurden neben den BSR T7/5-Zellen in vitro ausdifferenzierte NS20Y Zellen infiziert. NS20Y-Zellen sind

murine Neuroblastomzellen, die durch Butyryl-cAMP-Behandlung zu neuronähnlichen Zellen differenziert werden können (siehe Kap. 2.2.4.4). Nach Infektion der NS20Y Zellen mit den rekombinanten Viren wurden die intrazelluläre Verteilung des viralen M-Proteins mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Hi-T Mutanten wiesen, ähnlich wie in den BSR T7/5-Zellen, keine klare Veränderung der intrazellulären M-Lokalisation im Vergleich zum Wildtyp auf. In den mit den vermeintlichen Hi-R Mutanten (20AA und 196AAA) infizierten Zellen konnte dagegen eine verstärkte Anlagerung an die Zytoplasmamembran-ähnliche Strukturen beobachtet werden (weiße Pfeile, Abb. 28), wie es bereits in den Versuchen mit transient exprimierten M-Proteinen gezeigt werden konnte.

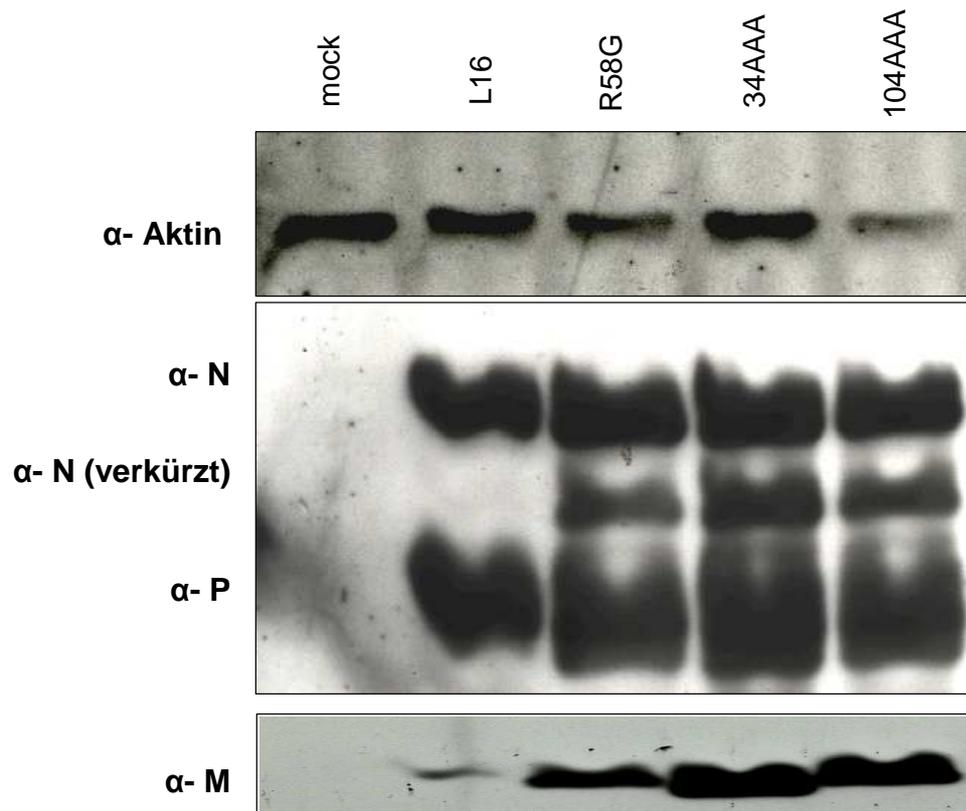


**Abbildung 28: Immunfluoreszenzaufnahmen von virusinfizierten ausdifferenzierten NS20Y Zellen (63x Öljektiv).** NS20Y Zellen wurden mit den angegebenen Virusmutanten (MOI=1) infiziert und 24 Stunden nach Infektion mit 0,3 % PFA fixiert und mit spezifischem M-Antikörpern (M2D4 und M1B3 1:200; Sekundärantikörper:  $\alpha$ -rabbit Alexa633 1:200) gefärbt. Eine signifikante Umverteilung des Matrixproteins an die Zytoplasmamembran konnte bei den Hi-R Mutanten beobachtet werden (weiße Pfeile).

### 3.5 Überexpression von viralen Proteinen und die Induktion eines zytopathischen Effektes

Auf der Ebene der Transkription konnten für die Virusmutanten SAD R58G, SAD 34AAA und SAD 104AAA in Northern Hybridisierungen (Abb. 15) und real-time PCR Quantifizierungen (Abb. 23) eine 6 bis 8 -fach erhöhte Menge an Transkripten gezeigt werden. Aus dieser erhöhten mRNA-Konzentration ließ sich schließen, dass die als Hi-T identifizierten Mutanten eine verstärkte Proteinexpression aufweisen sollten. Um dies zu untersuchen, wurden die Hi-T Virusmutanten hinsichtlich ihrer Proteinexpression in infizierten Zellen charakterisiert.

Dazu wurden BSR T7/5-Zellen mit einer MOI von 1 infiziert, nach 24 Stunden lysiert und das Proteinlysate nach SDS-PAGE und Westernblot mit RV-Protein spezifischen Seren untersucht. Es war zu beobachten, dass die Hi-T Mutanten SAD R58G, SAD 34AAA und SAD 104AAA verglichen zum Wildtyp SAD L16 bei den verkürzten N-Proteinen und M-Proteinen eine erhöhte Proteinexpression aufwiesen. Die Signale der N- und P Proteine liegen im gesättigten Detektionsbereich, so dass ein Unterschied in der Proteinexpression hier nicht zu erkennen war. Durch die distale Position des M-Gens im Genom wird M weniger stark exprimiert als N und P. Dadurch ist der Unterschied in der Expression hier am deutlichsten zu erkennen. Im Vergleich zu den nicht infizierten Zellen (mock) bzw. zu den Zellen, die mit den Viren SAD L16, SAD R58G und SAD 34AAA infiziert waren, war das Signal für Aktin in Zellen, die mit der Mutante SAD 104AAA infiziert waren, deutlich schwächer. Dies ist vermutlich auf einen starken zytopathischen Effekt (CPE) dieser Virusmutante zurückzuführen (Abb. 29).



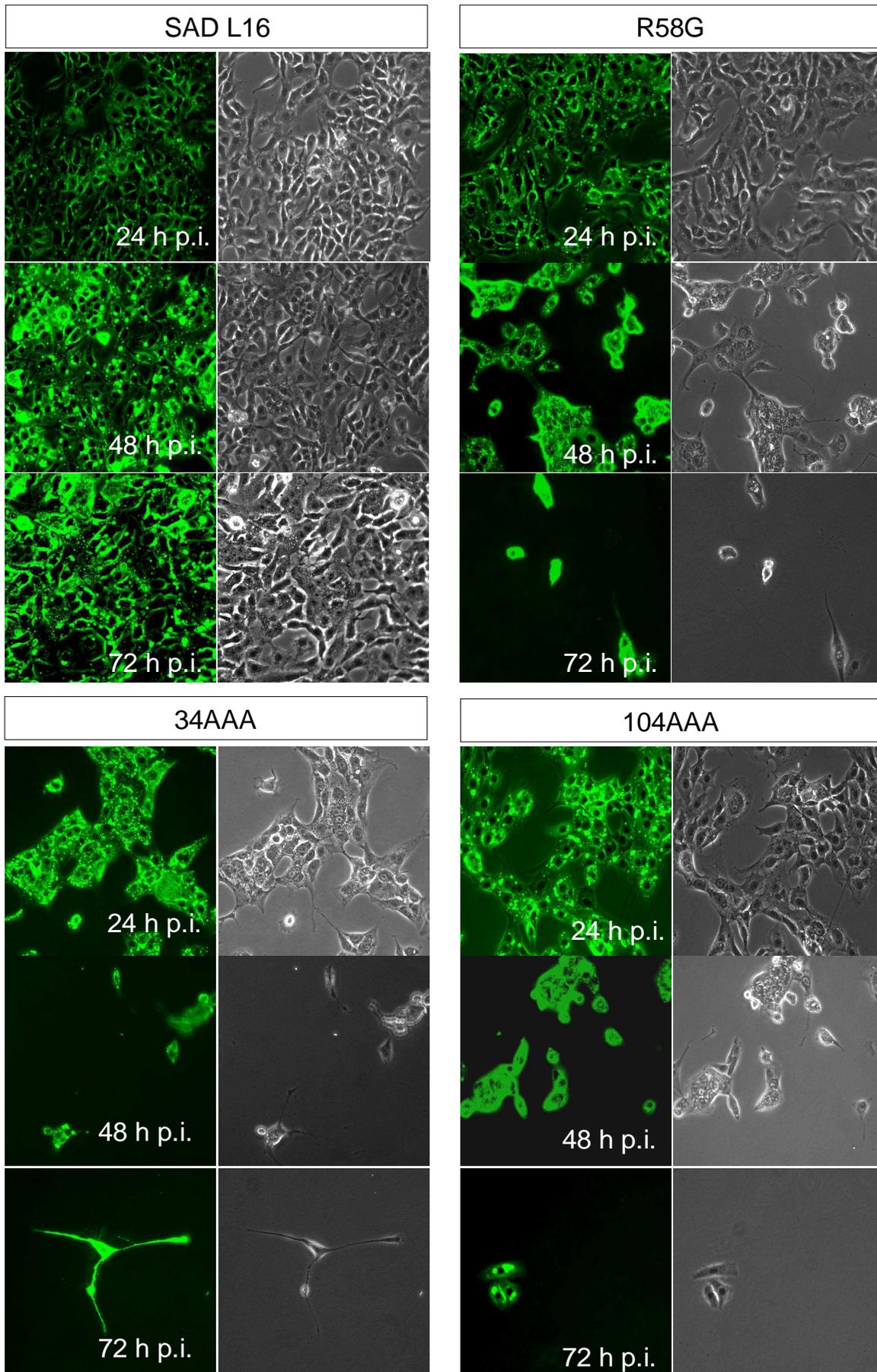
**Abbildung 29: Erhöhte Proteinexpression der Hi-T Mutanten.** 24 Stunden nach der Infektion von BSR T7/5-Zellen wurden die Zellen lysiert und im Westernblot mit RV N-, P- und M-spezifischen Seren analysiert. Im Vergleich zu SAD L16 zeigten die Hi-T Mutanten R58G, 34AAA und 104AAA eine stärkere Genexpression, was vor allem am Auftreten eines Signals auf der Höhe von N-terminal verkürztem N-Protein und deutlich stärkeren Signalen für das M-Protein sichtbar wird. Die schwächere Aktinbande in Zellextrakten aus 104AAA-infizierten Zellen ist auf einen zytopathischen Effekt (CPE) zurückzuführen.

Diese Beobachtung eines zytopathischen Effekts (CPE) als Folge der erhöhten Proteinexpression war besonders interessant und wurde weiter untersucht. Dazu wurden BSR T7/5-Zellen mit SAD L16, SAD R58G, SAD 34AAA und SAD 104AAA mit einer MOI von 1 infiziert und 24, 48 und 72 Stunden p.i. mit Aceton fixiert und anschließend mit FITC-gekoppelten monoklonalen Antikörpern (Centacor<sup>®</sup>) immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert (Abb. 30A). Bereits 24 Stunden p.i. konnte mit Ausnahme von SAD L16 eine deutliche Abnahme der Zellen im Zellrasen beobachtet werden. Mit zunehmender Inkubationszeit verstärkte sich dieser Effekt

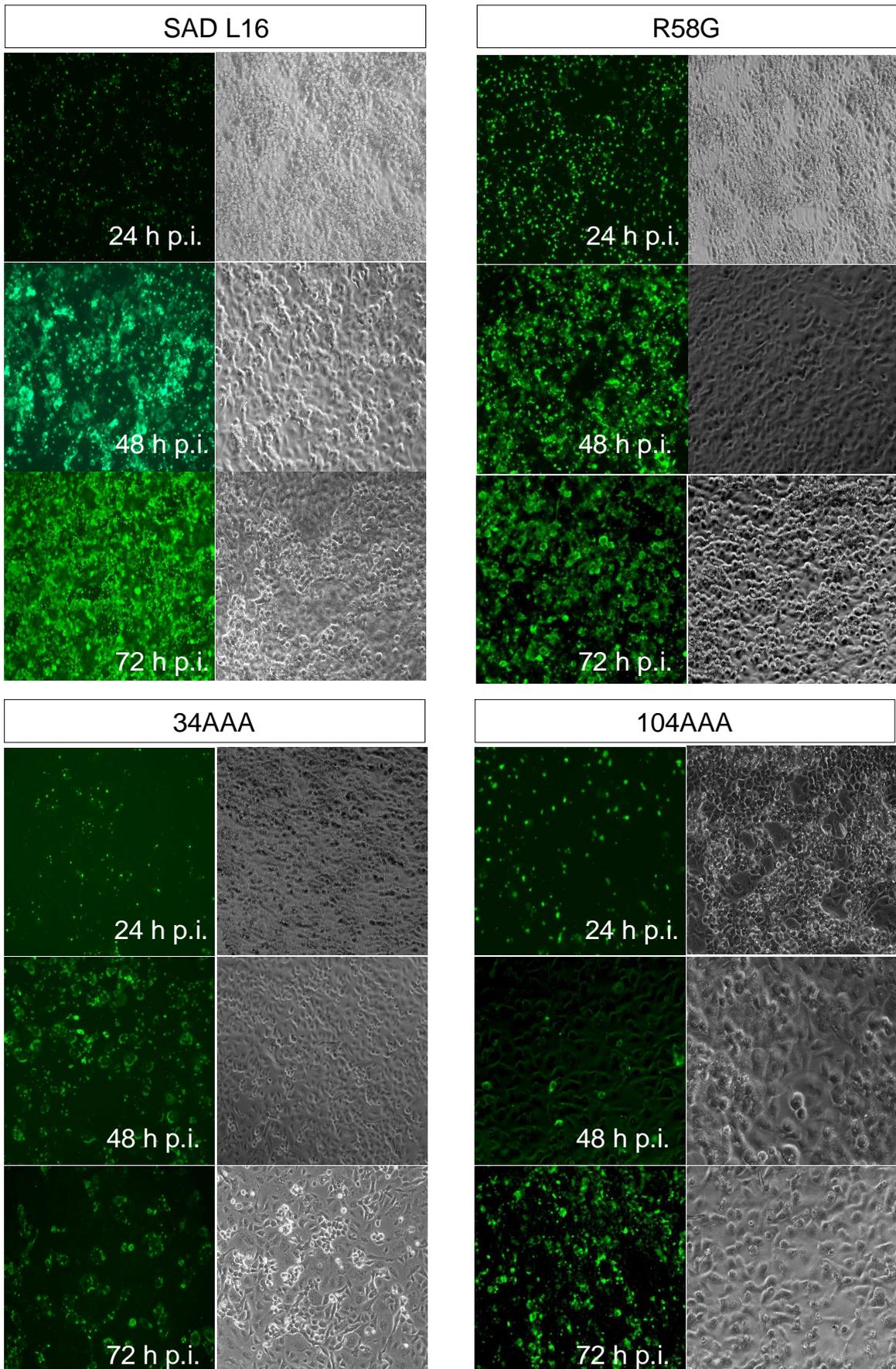
und 72 Stunden p.i. war der Zellrasen vollkommen zerstört. Im Gegensatz dazu zeigte SAD L16 keinen ausgeprägten zytopathischen Effekt.

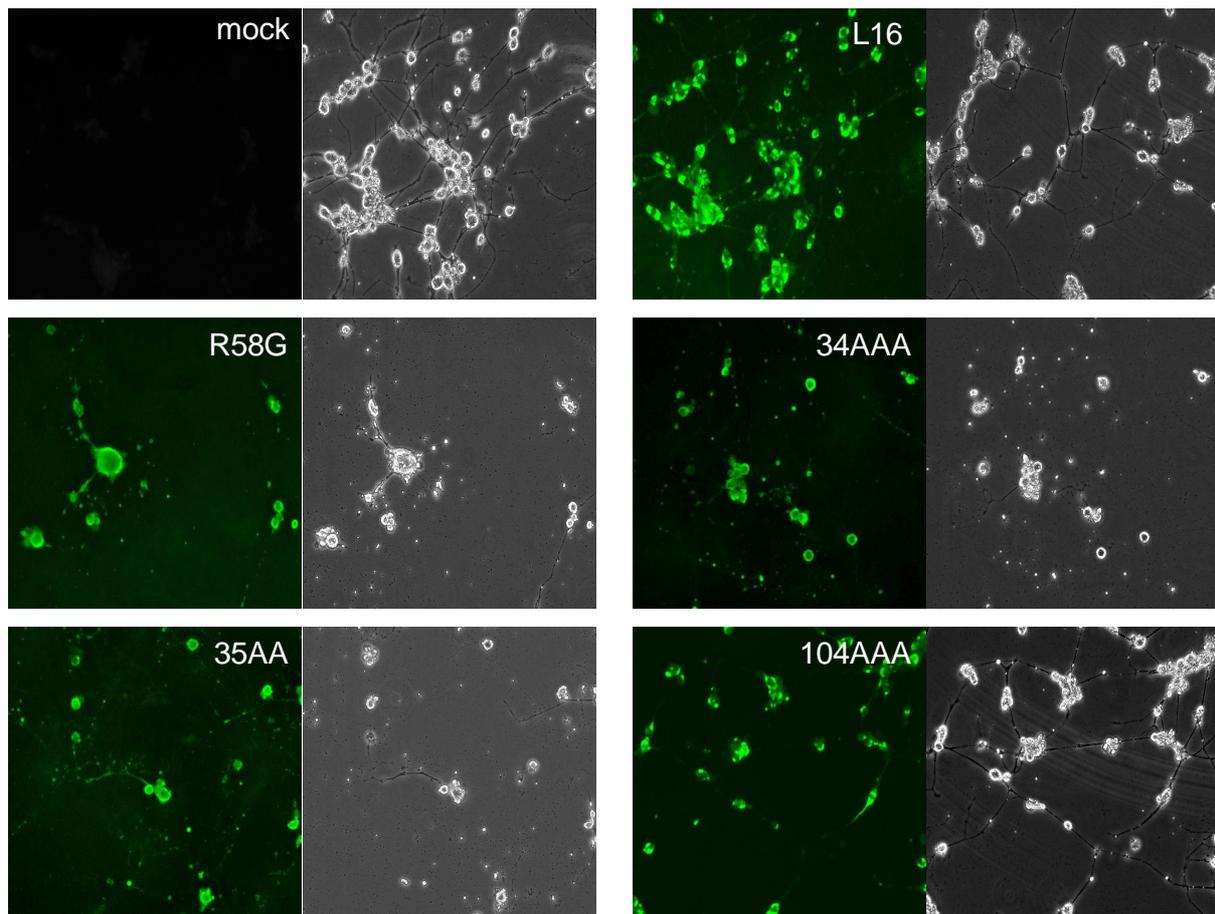
Zum Vergleich wurden HEp-2 Zellen, ebenfalls mit einer MOI von 1, mit den gleichen Viren infiziert. Bemerkenswert war die Beobachtung, dass die Hi-T Mutanten in dieser Zelllinie keinen CPE induzierten, und in ihrer Replikation stark attenuiert waren (beispielhaft für die Mutanten R58G, 34AAA und 104AAA dargestellt). Während nach 24 Stunden in den BSR T7/5-Zellen weitestgehend alle Zellen infiziert waren, konnte dies bei HEp-2-Zellen nicht beobachtet werden. Auch nach 48 und 72 Stunden zeigten die HEp-2-Zellen in der Immunfluoreszenz deutlich weniger Virus. Nur für vereinzelte Zellen konnte eine Infektion nachgewiesen werden (Abb.30B). Dies wird vor allem bei den mit Mutante 104AAA infizierten Zellen deutlich, in denen nach 72 Stunden p.i. kaum Virus nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurden in vitro ausdifferenzierte, neuronale NS20Y Zellen infiziert. Die Inkubationszeit wurde im Vergleich zu BSR T7/5 und HEp-2-Zellen auf 5 Tage verlängert. Dabei wurde beobachtet, dass die nicht infizierten, sowie die mit L16 und der Hi-T-Mutante 104AAA infizierten NS20Y-Zellen kaum morphologische Veränderungen, d.h. Degeneration der Neuriten, aufwiesen, während die mit den Hi-T Mutanten 34AAA, 35AA und R58G infizierten Zellen abgerundet waren und keine für ausdifferenzierte NS20Y-Zellen typische Neuriten mehr hatten (Abb. 30C). Im Gegensatz zu BSR-T7/5 Zellen, in denen alle getesteten Hi-T-Mutante einen zytopathischen Effekt induzierten, war die Hi-T-Mutante 104AAA in den ausdifferenzierten Neuroblastomzellen nicht in der Lage einen entsprechenden CPE zu induzieren.

(A) BSR T7/5



(B) HEp-2



**(C) NS20Y**

**Abbildung 30: CPE der Hi-T Mutanten auf verschiedene Zelllinien. Phasenkontrastaufnahmen bei 20facher Vergrößerung (HEp-2-Zellen 10fach) mit Antikörperfärbung gegen RV-N (Centocor®).** (A) BSR T7/5-Zellen. Bereits nach 24 Stunden konnte auf den infizierten BSR T7/5-Zellen ein CPE beobachtet werden, der nach 72 Stunden eine komplette Vernichtung des Zellrasens verursachte. Wildtyp SAD L16 zeigte diesen Phänotyp nicht. (B) HEp-2-Zellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich ein solcher Effekt auf HEp-2-Zellen nicht. Die Hi-T Viren zeigten sich in ihrer Replikation stark attenuiert. (C) Ausdifferenzierte NS20Y-Zellen. Nach 125 Std. Infektion von ausdifferenzierten NS20Y konnte ein CPE bei den Hi-T Mutanten 34AAA, 35AA und R58G beobachtet werden. Dies war besonders deutlich an den abgerundeten Zellen zu erkennen, deren Fortsätze zerstört waren. Die Mutante 104AAA bildete eine Ausnahme, sie zeigte keinen CPE.

## 3.6 Interferoninduktion durch Hi-T Mutanten

### 3.6.1 STAT-1 Phosphorylierung durch Hi-T-Virusmutanten

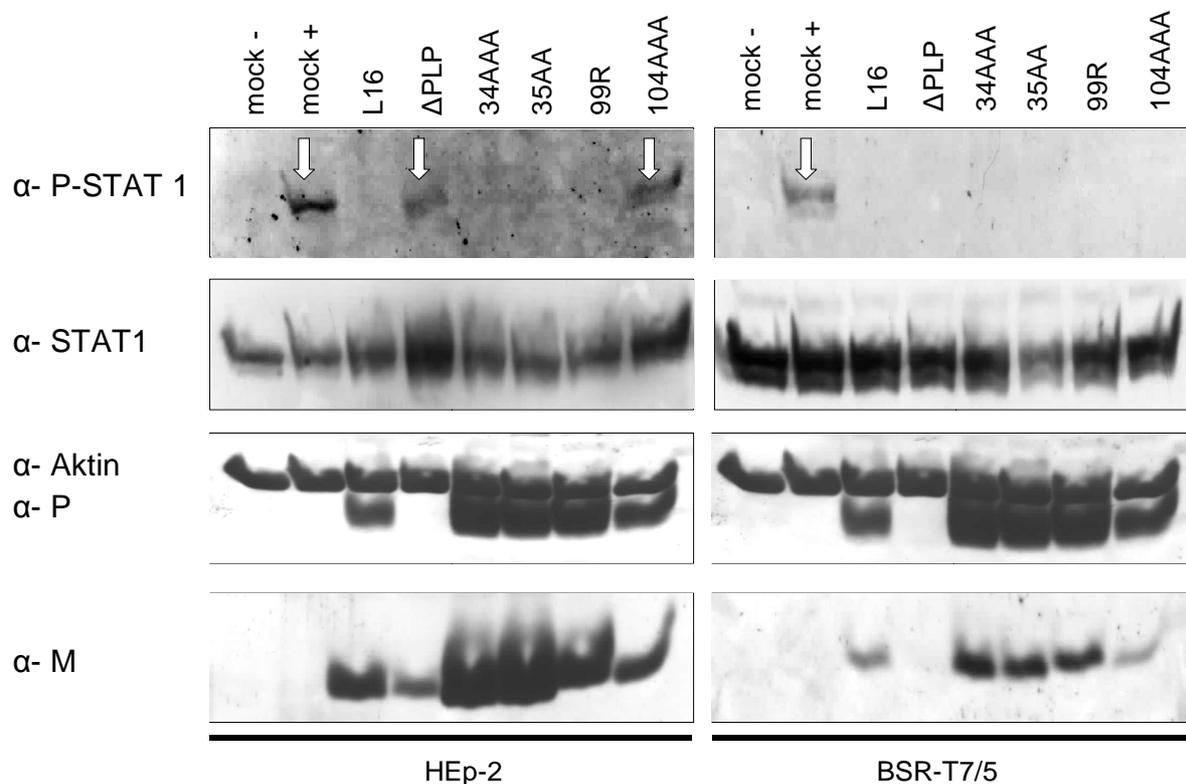
Den meisten Viren ist es gelungen, die Abwehrmechanismen der Wirtszelle, das Interferon (IFN)-System, zu umgehen. Meist geschieht dies über Virusproteine, die als IFN-Antagonisten fungieren. Sie können als Inhibitor für die IFN-Produktion oder für die Wirkung des IFN wirken. Für das Tollwutvirus konnte gezeigt werden, dass das Phosphoprotein in der Signalkaskade des Interferons interveniert und so verhindert, dass das Immunsystem aktiviert wird (Brzózka et al., 2005) bzw. die Typ-I-IFN abhängige Expression antiviraler Gene blockiert wird. (Brzózka et al., 2006).

Vergleicht man die in Abb. 30B gezeigten virusinfizierten HEp-2-Zellen mit den entsprechenden BSR T7/5-Zellen, so fällt auf, dass in den mit Hi-T Mutanten SAD 34AAA und insbesondere SAD 104AAA infizierten HEp-2-Zellen deutlich weniger Virusprotein nachgewiesen werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass diese Hi-T Mutanten in ihrer Replikation attenuiert sind. Basierend auf dem Befund, dass das ebenfalls in HEp2-Zellen attenuierte Virus  $\Delta$ PLP Interferon induziert (Brzózka et al., 2005) wurde untersucht, ob in diesem Fall die Virusinhibition der Hi-T Mutanten ebenfalls auf die Induktion des Interferons zurückzuführen ist. Grund dafür könnte die Überexpression viraler mRNAs sein, die dann die Abwehrmechanismen der Zelle aktivieren.

Dazu wurden jeweils BSR T7/5- und Hep-2-Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert (MOI=1). Nach 24 und 48 Stunden Inkubation wurden die infizierten Zellen lysiert und mittels Westernblotanalysen auf die Induktion von Interferon-abhängigen Signalketten hin untersucht. Als Indikator der Interferoninduktion diente das STAT1-Protein, welches durch Induktion des Interferontyp I-Signalweges phosphoryliert wird und somit durch einen P(phospho)-STAT1-Antikörper detektiert werden konnte.

Da BSR T7/5-Zellen einen Defekt bezüglich der Interferon- $\beta$  Induktion haben, d. h. nicht in der Lage sind, nach Virusinfektion die Interferon- $\beta$  Genexpression zu induzieren, aber dennoch auf die Zugabe exogenen Interferons reagieren, wurden die BSR-T7/5 Zellen als Negativkontrolle für die virusinduzierte Aktivierung Interferon-abhängiger Signalkaskaden verwendet. Als Positivkontrolle wurden nichtinfizierte Zellen 30 min vor ihrer Ernte mit 1000 U Interferon behandelt.

Zusätzliche dazu wurde mit dem  $\Delta$ PLP-Virus infiziert, da für dieses Virus bereits nachgewiesen werden konnte, dass es die Interferon- $\beta$ -Genexpression induziert (Brzózka et al., 2006; Brzózka et al., 2005). Nach Infektion der Zellen mit den Hi-T Mutanten konnte in den HEp-2-Zellen im Falle von Mutante SAD 104AAA und  $\Delta$ PLP phosphoryliertes STAT-1 (PSTAT-1) detektiert werden. Ebenso zeigten die mit Interferon stimulierte Kontrolle (mock +) pSTAT-1. Die restlichen Hi-T Mutanten SAD 34AAA, SAD 35AA und SAD 99R zeigten keinen solchen Effekt. Auf den BSR T7/5-Zellen konnte nur für die mit Interferon stimulierte Kontrolle (mock+) pSTAT-1 detektiert werden. Um zu verifizieren, dass sowohl in HEp-2 als auch in BSR T7/5 gleiche Mengen an unphosphoryliertem STAT-1 vorliegen, wurde im Westernblot zusätzlich gegen das STAT-1-Protein gefärbt (Abb. 31).

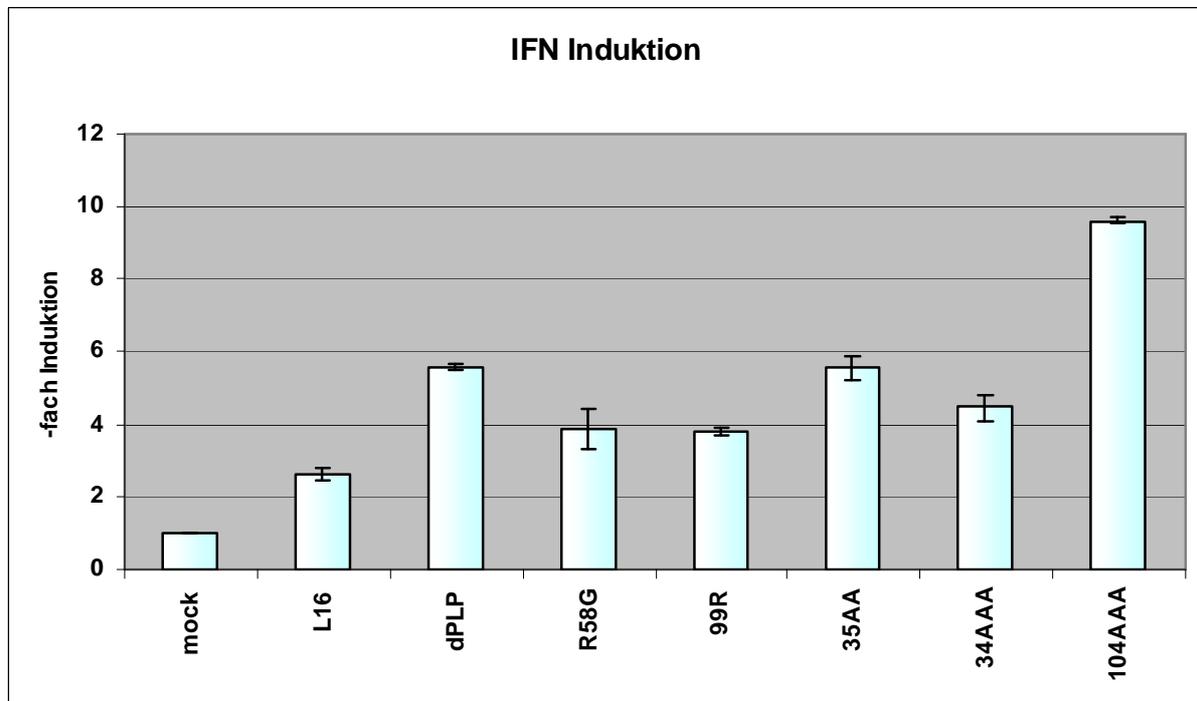


**Abbildung 31: Untersuchung auf Interferoninduktion der Hi-T Mutanten in BSR T7/5- und HEp2-Zellen.** 24 Stunden nach Infektion wurden Lysate der mit den angegebenen Viren infizierten Zellen in Westernblotanalysen untersucht. Als Positivkontrolle wurden jeweils eine Mock-Kontrolle 30 min vor der Ernte mit 1000 U Interferon stimuliert (= mock +). In HEp-2-Zellen, die mit der Hi-T Mutante 104AAA und mit  $\Delta$ PLP infiziert waren, konnte phosphoryliertes STAT-1 (pSTAT-1) nachgewiesen werden. Die mit Interferon stimulierten Kontrollen in BSR T7/5-Zellen und HEp-2 zeigten ebenfalls pSTAT-1 (weiße Pfeile). Zum Nachweis der Infektion wurden zusätzlich die viralen Proteine P und M detektiert.

### 3.6.2 Luciferase Assay

Um die Ergebnisse der Westernblotanalysen zu verifizieren und um zusätzlich die direkte Induktion der IFN-Genexpression zu zeigen, wurden duale Luciferaseassays durchgeführt. Dazu wurden HEK 293T Zellen mit einem Reporterplasmid (0,5 µg), das das Luciferase-Gen unter Kontrolle des IFN $\beta$ -Promotors enthält (pISREluc125) transfiziert. Als interne Kontrolle erfolgte parallel dazu die Transfektion des pCMV-RL Plasmids (10ng), welches für die Renilla-Luciferase kodiert. 24 Stunden nach der DNA-Transfektion wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Viren (MOI=1) überinfiziert und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen lysiert und die IFN $\beta$ -abhängige Reporterexpression bestimmt. Als Positivkontrolle dienten  $\Delta$ PLP infizierte Zellen.

Die Hi-T Mutante SAD 104AAA zeigte verglichen zu SAD L16 eine annähernd 5-fach höhere Reporteraktivität. Für  $\Delta$ PLP und SAD 35AA konnte im Vergleich zu SAD L16 eine etwa 2,5-fach höhere Aktivierung des IFN Promotors beobachtet werden. Die Mutanten SAD R58G, SAD 99R und SAD 34AAA zeigten eine etwa 2-fache Induktion (Abb. 32). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Ursache der Virusinhibition der Hi-T Mutanten in den HEp-2-Zellen wie bereits für  $\Delta$ PLP bekannt, in der Interferoninduktion liegt. Diese verhinderte, dass die Viren in großen Mengen replizieren konnten. Besonders auffällig war diese Beobachtung bei Zellen, die mit der Mutante SAD 104AAA infiziert waren. Dies ist ein Hinweis darauf, warum diese Mutation keinen CPE in NS20Y Zellen zur Folge hatte.

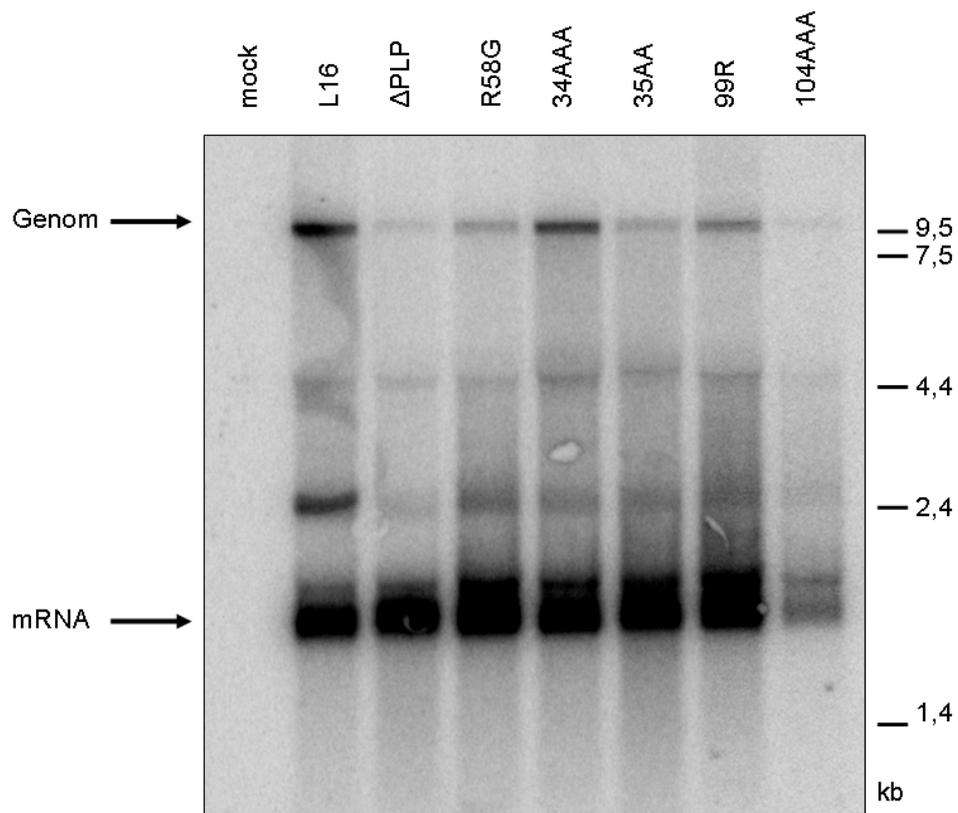


**Abbildung 32: Durchschnittliche Interferoninduktionsrate der Hi-T Mutanten auf HEK 293T-Zellen (n=3).** 24 Stunden nach Transfektion des pSREluc125 und pCMV-RL wurden die Zellen mit Virus überinfiziert. Diese wurden nach weiteren 24 Stunden lysiert und in einem dualen Luciferase-Assay getestet. Für die Hi-T Mutante 104AAA konnte abgeglichen mit L16 eine 5fache Interferoninduktion beobachtet werden.  $\Delta$ PLP und 35AA zeigten eine etwa 2,5fache Induktion. R58G, 34AAA und 99R wiesen eine 2fach höhere Induktion auf. Die Ergebnisse wurden gegen die Renilla-Luciferase-Aktivität abgeglichen.

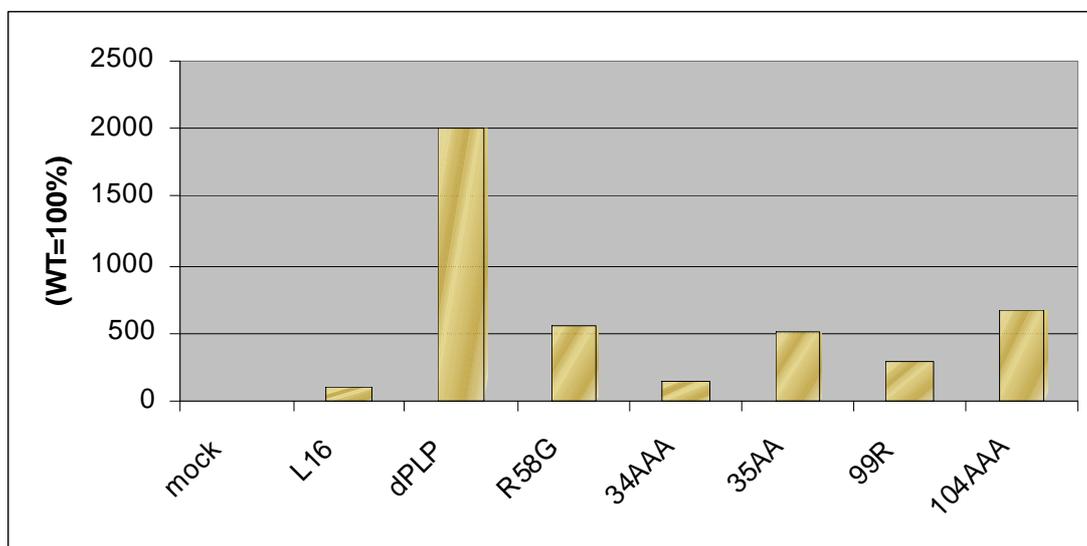
Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Transkriptionsrate und Interferoninduktion erkennen zu können, und um die Infektion zu bestätigen, wurde parallel zu dem Luciferaseassay aus virusinfizierte HEK 293T Zellen 24 Stunden p.i. RNA isoliert und mittels Northernhybridisierung analysiert. Anschließend erfolgte mit Hilfe einer Software (Imagequant 5.0) die Auswertung der Transkriptionseffizienz. Dazu wurden die Bandenstärken der mRNA und der genomischen RNA quantifiziert und in Verhältnis zueinander gesetzt. Das Wildtypvirus SAD L16 wurde auf 100% gesetzt.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Hi-T Mutanten konnte für das  $\Delta$ PLP Virus ebenfalls ein sehr starker Hi-T Phänotyp beobachtet werden (Abb. 33).

(A)



(B)



**Abbildung 33:(A) Northernblot zur Expressionskontrolle.** Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen Transkriptionseffizienz und Interferoninduktion zu erkennen war und als zusätzliche Kontrolle für die erfolgreiche Infektion und Genexpression wurde aus virusinfizierten HEK 293T-Zellen RNA isoliert und mit einer radioaktivmarkierten N-Sonde detektiert. **(B)** Transkriptionseffizienz der untersuchten RNA. Die Intensität der mRNA- und Genom-Banden wurden wie in Abb.11 beschrieben ermittelt. Das Wildtypvirus SAD L16 wurde als Referenzwert auf 100% gesetzt. Es konnte für ΔPLP (2000%) und 104AAA (670%) eine sehr hohe Transkriptionsrate verzeichnet werden.

### 3.7 Untersuchungen zur Interaktion von Tollwut M und P Proteine

Mit dem Befund der Interferon-Induktion durch Hi-T Mutanten lag die Vermutung nahe, dass der virale Interferonantagonist, das Phosphoprotein P und das Matrixprotein sich funktionell beeinflussen. Aus diesem Grund war es von besonderem Interesse, zu untersuchen, ob M und P direkt miteinander interagieren. Das Zusammenwirken des Matrixproteins mit P und ein daraus resultierender indirekter Einfluss auf die Polymerase könnte somit eine Erklärung für die RNA-Syntheseregulation sein.

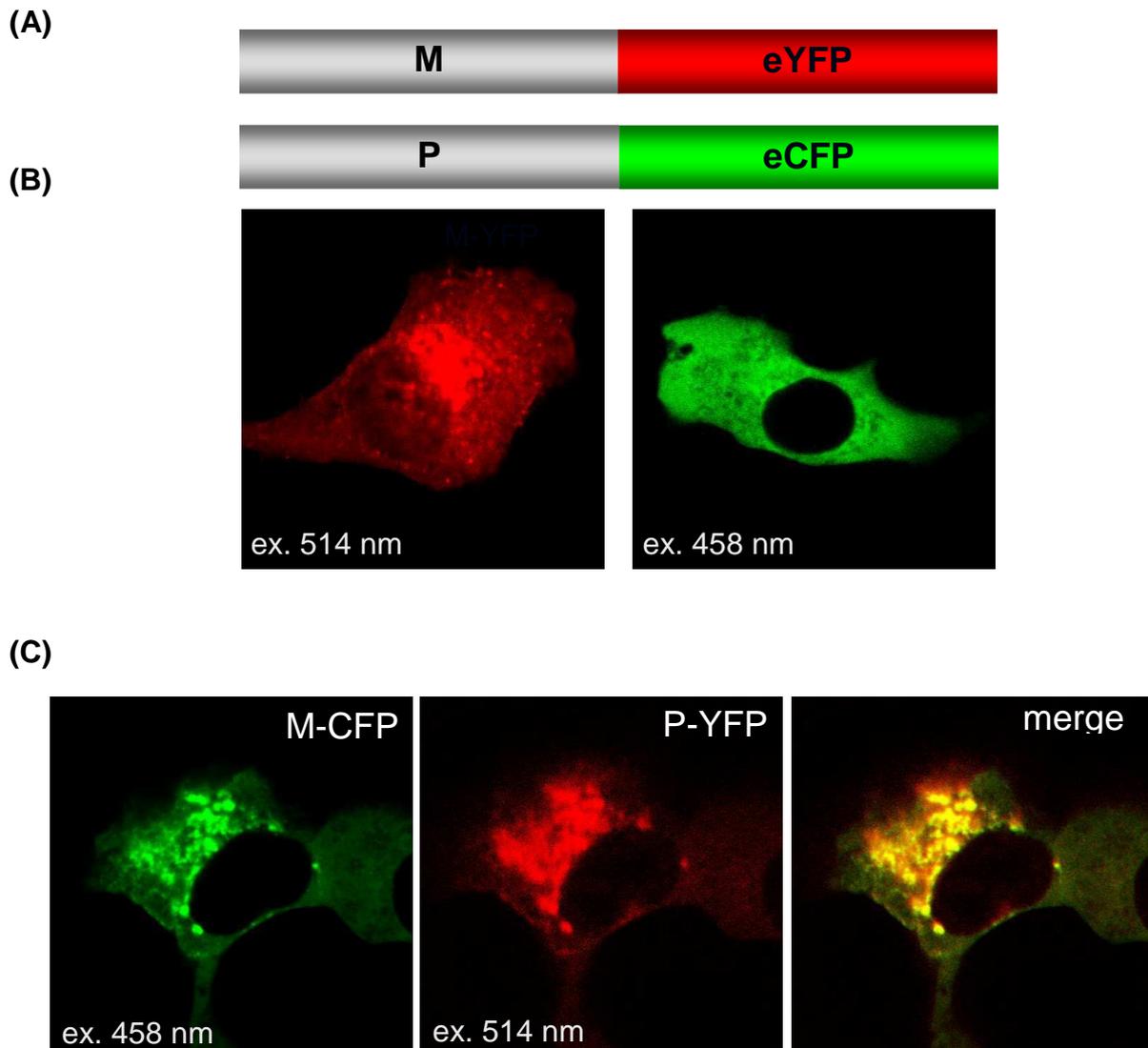
#### 3.7.1 Fluoreszierende Tollwut M und P Fusionsproteine

Der erste Schritt zur Untersuchung einer möglichen M P Interaktion war die Herstellung von Fusionsproteinen mit fluoreszierenden Proteinen. Dies sollte die mikroskopischen Analysen vereinfachen. Dazu wurden das Matrixprotein und das Phosphoprotein N-terminal mit den Reporterproteinsequenzen für eCFP (enhanced Cyan Fluorescent Protein) und eYFP (enhanced Yellow Fluorescent Protein) fusioniert und in Expressionsplasmiden für Säugerzellen kloniert (Abb. 34A). Die so entstandenen Konstrukte wurden in BSR T7/5-Zellen transfiziert und diese 24 Stunden später mit PFA fixiert. Anschließend wurde mit dem Laser Konfokal Mikroskop (LSM) die intrazelluläre Verteilung der Proteine untersucht. Für das M-YFP konnte eine vesikuläre Verteilung im Zytoplasma der Zelle beobachtet werden. Besonders in Golgi-ähnlichen Bereichen war eine Akkumulierung des M-YFP-Fusionsproteins detektierbar. Das P-CFP dagegen war gleichmäßiger im Zytoplasma der Zelle verteilt (Abb. 34B).

Mit Hilfe von Transfektionsanalysen wurde weiterhin bestimmt, ob und wie sich die Verteilung von M und P in ko-exprimierenden Zellen verändert. Dazu wurden BSR T7/5-Zellen 24 Stunden nach Kotransfektion der Plasmide (jeweils 2,5µg), die M-YFP und P-CFP kodieren, mit PFA fixiert und im Laser Konfokal Mikroskop analysiert.

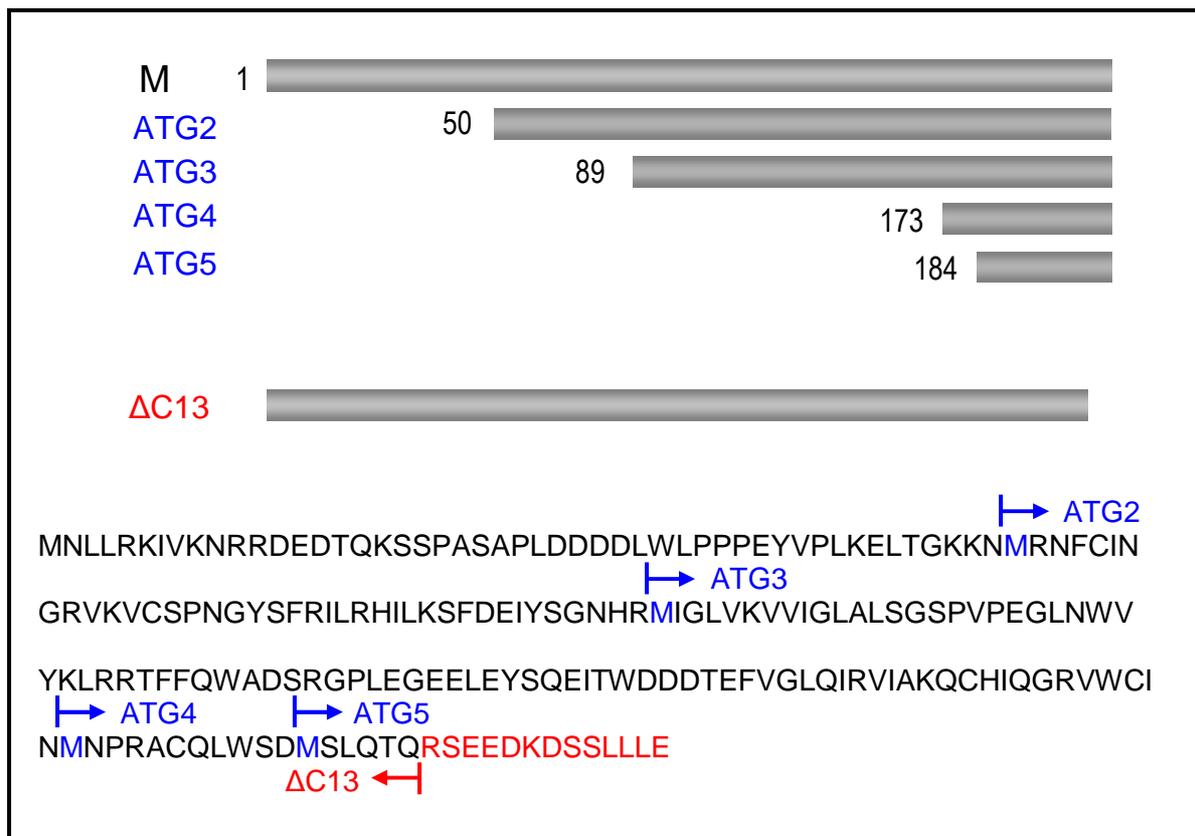
Erste Ergebnisse zeigten eine Kolo-kalisation von M-CFP mit P-YFP. Verglichen zu der Einzelexpression von P-CFP (siehe Abb. 34B), ist eine

Umverteilung des Phosphoproteins zu M-ähnlichen Strukturen erkennbar (Abb. 34C). Dies ist ein klarer Hinweis für eine mögliche Interaktion beider Proteine.



**Abbildung 34:** (A) Schematische Darstellung der fluoreszenzmarkierten Proteine M und P. Das Matrixprotein und das Phosphoprotein wurden an den N-terminalen Ende mit jeweils eYFP oder eCFP markiert. (B) Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proteine in BSR T7/5-Zellen. 24 Stunden nach Transfektion in BSR T7/5-Zellen wurden die Zellen mit PFA fixiert und im Laser Konfokal Mikroskop (LSM) betrachtet. Das Matrixprotein ist in kleinen vesikelähnlichen Strukturen um den Zellkern und an Golgi-ähnlichen Strukturen verteilt. Das Phosphoprotein zeigt eine diffuse zytoplasmatische Verteilung. (C) Kolokalisation von M-CFP und P-YFP nach Transfektion in BSR T7/5-Zellen (63x Öljektiv). Um eine Umverteilung der fluoreszenzmarkierten Proteine beobachten zu können, wurden BSR T7/5-Zellen mit M-CFP und P-YFP kotransfiziert, 24 Stunden später wurden die Zellen fixiert und mit dem Laser Konfokal Mikroskop aufgenommen. Es erfolgte eine klare Umstrukturierung des P-Proteins zu ähnlichen Strukturen wie die des Matrixproteins.

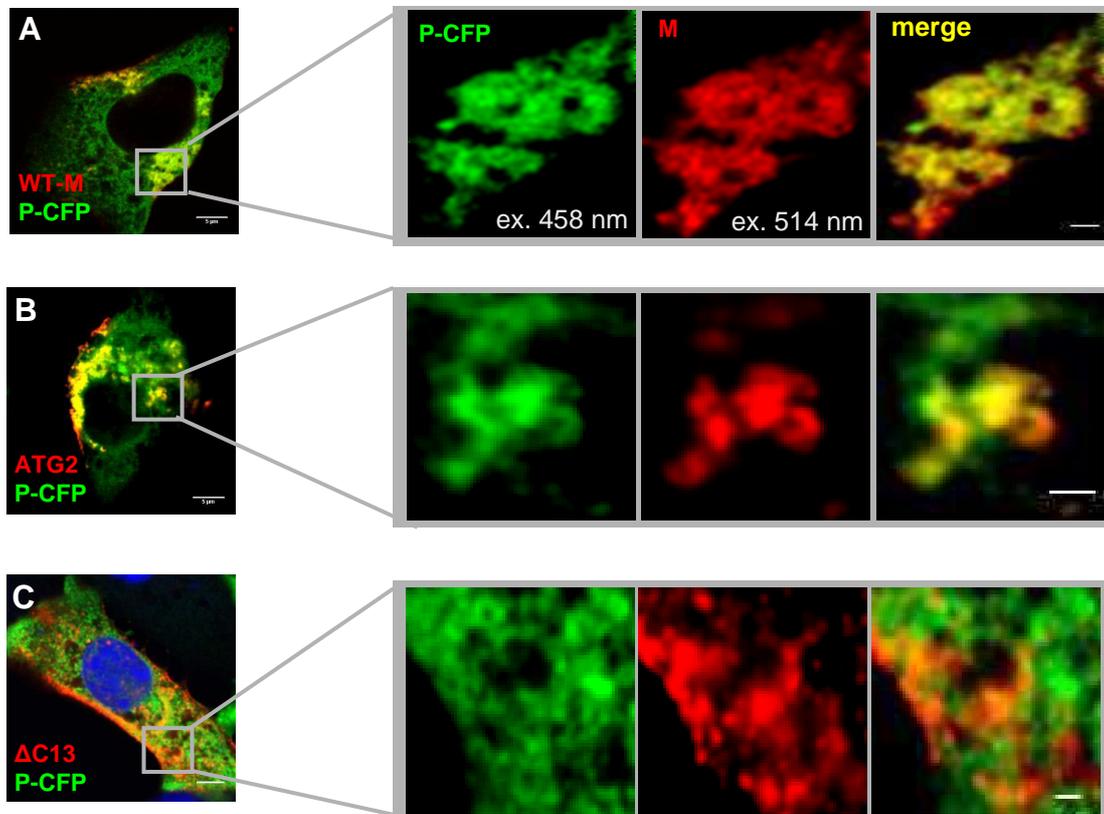
Zur anschließenden Eingrenzung des Bereichs der möglichen Interaktion wurden M-Deletionsmutanten eingesetzt. Die M-Plasmide pTIT-MATG2, pTIT-MATG3, pTIT-MATG4 und pTITM-ATG5 kodieren Matrixproteine, die N-terminal verkürzt sind. Die Translationsinitiation erfolgte vom jeweils nächsten Startkodon (ATG) der für M kodierenden Sequenz. Zusätzlich wurde das am C-terminalen Ende um 13 Aminosäuren gekürzte  $\Delta C13$  für weitere Versuche hinzugezogen (Abb. 35).



**Abbildung 35: Schematische Darstellung der verkürzten Matrixproteine.** In der Aminosäuresequenz sind die Initiationskodons ATG2, ATG3, ATG4 und ATG5 in blau dargestellt. Die C-terminale Verkürzung  $\Delta C13$  ist in rot gekennzeichnet.

BSR T7/5-Zellen wurden entweder mit pTIT WT-M, pTIT ATG2, pTIT ATG3 oder pTIT  $\Delta C13$  zusammen mit P-CFP kotransfiziert, nach 24 Stunden mit PFA fixiert und nach einer Immunfärbung gegen das Matrixprotein mikroskopisch analysiert. Die N-terminal verkürzten M-Proteine verhielten sich ähnlich dem WT-M und zeigten Kolokalisation mit P-CFP. Hingegen konnte diese Beobachtung bei der C-terminalen Verkürzung nicht mehr gemacht werden (Abb. 36).

Die hier gezeigten Ergebnisse sprechen für die Kolokalisation von Matrixprotein und Phosphoprotein.



**Abbildung 36: Kolokalisation des Phosphoproteins mit verkürztem Matrixprotein (63x Ölobjektiv).** Nach Kotransfektion von P-CFP mit WT-M, ATG2 oder  $\Delta C13$ , wurden die BSR T7/5-Zellen fixiert und mit Hilfe des Mikroskops analysiert. Ein vergrößerter Ausschnitt der Präparate zeigte eine Kolokalisation des (A) Matrixproteins und des (B) ATG2 mit dem P-CFP. Es konnte für M und P eine ähnliche strukturelle Verteilung identifiziert werden. Dies konnte durch die Überlagerung der Aufnahmen (merge) deutlich erkannt werden. Im Falle des (C) C-terminal verkürzten M-Proteins ( $\Delta C13$ ) konnten keine strukturellen Überlagerungen beobachtet werden. Eine Kolokalisation der beiden Proteine lag nicht vor.

## Kapitel 4: Diskussion

### 4.1 Regulation der RNA-Synthese durch das Matrixprotein

Das Tollwutvirus stellt ein gutes Modellsystem für die Grundlagenforschung der *Mononegavirales* dar. Zum einen ist der Umgang mit dem Tollwutvirus durch die Verfügbarkeit von Impfstoffen sicher, zum anderen ist der Aufbau des Virus durch die geringe Anzahl an Proteinen verhältnismäßig überschaubar. Die grundlegenden Funktionen der einzelnen Proteine bei der Virusreplikation von Rhabdoviren wurden schon recht früh erkannt (Banerjee, 1987). Diese Erkenntnisse schließlich machten es möglich, „reverse genetics“ Systeme zu entwickeln, mit deren Hilfe gezielt Modifikationen in rekombinante Rhabdoviren eingebracht werden können (Schnell et al., 1994). Dadurch bot sich nicht nur die Möglichkeit, Oberflächenproteine zu verändern oder auszutauschen, sondern auch die Einbringung und erfolgreiche Expression von Fremdgenen wurde möglich (Mebatsion et al., 1996). Somit eröffnete sich eine ganz neue Perspektive: der Einsatz des Tollwutvirus als viraler Vektor.

Ein wichtiger Aspekt für eine zweckmäßige Anwendung eines Virus als Vektor ist die Möglichkeit, das eingebrachte Gen in seiner Expression zu regulieren. Hier zeigte sich eine Eigenschaft der *Mononegavirales* als besonders vorteilhaft. Die graduelle Expression der Virusgene in Folge des typischen Transkriptionsgradienten (siehe Kap.1, Abb. 7) erlaubte es, die Expressionsrate einzelner Gene zu beeinflussen. Die Höhe der Fremdgenexpression wird durch die Insertionsstelle auf dem Virusgenom bestimmt. Jedoch bleibt das Virus durch die Einbringung fremder Gene nicht unbeeinflusst. Die distal kodierten Proteine werden in noch geringeren Mengen als üblich synthetisiert und dies hat Auswirkungen auf die gesamte Effizienz der Genexpression (Wertz et al., 1998, Ball et al., 1999, Flanagan et al., 2000). Es wäre deshalb von Vorteil, einen anderen Weg zu finden, der es erlaubt die Expression der Gene zu beeinflussen.

Eine Möglichkeit bietet sich durch den Befund, dass das Matrixprotein einen regulatorischen Effekt auf die RNA-Synthese ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Deletion des Matrixproteins eine erhöhte Transkription zur Folge hatte (Finke and Conzelmann, 2003). Der genaue Mechanismus dieser Regulation ist

jedoch nach wie vor ungeklärt. Ziel dieser Arbeit war es, eine Mutationsanalyse durchzuführen, um die Rolle des Matrixproteins bei der Virusreplikation, d.h. der Regulation der RNA-Synthese durch das Matrixprotein zu untersuchen. Damit sollten zum einen grundlegende Mechanismen der Virusreplikation aufgeklärt werden. Zusätzlich wäre eine Anwendung der gezielten Manipulation der viralen Regulationsmechanismen in Tollwutvirus-basierten viralen Vektoren denkbar.

## 4.2 Das Matrixprotein als Mediator der RNA-Synthese?

Die am besten untersuchte Funktion des Matrixproteins ist seine Rolle in der Bildung von Viruspartikel. Es kondensiert die Ribonukleoproteinkomplexe (RNPs) in kompakte Strukturen und leitet so den Prozess der Virionenbildung und -freisetzung ein (Mebatsion et al., 1999). Die RNPs werden dabei von Matrixprotein umgeben. In dieser Form, so wird angenommen, sind die RNP-assoziierten Polymerasekomplexe „eingefroren“, d.h. RNA-Syntheseprozesse finden in kondensierten RNPs nicht mehr statt. Aus diesem Grund wird vermutet, dass das Matrixprotein nur vor der Kondensierung des RNPs seine zweite Funktion als Regulator der RNA-Synthese erfüllen kann (Finke and Conzelmann, 2003). Um diese Funktion genauer zu untersuchen, wurden Mutationsanalysen durchgeführt. Dies geschah in ersten Schritten über die Erstellung einer Plasmidbank, die Matrixprotein cDNAs mit unterschiedlichen Mutationen beinhaltet. Mit Hilfe der kodierten Proteine konnten in Komplementationsanalysen RNA-Synthese, Infektiosität und Proteinexpression schnell und leicht ermittelt werden. Hauptaugenmerk dieser Untersuchungen war ein veränderter Phänotyp der Mutanten hinsichtlich der RNA-Synthese, ein klarer Hinweis für eine modifizierte Regulation. Aber ebenso von Bedeutung war die Expression der Matrixproteine. Für die Analysen war es wichtig, dass ausgeschlossen werden konnte, dass ein Hi-T Phänotyp auf die Nichtanwesenheit des Matrixproteins zurückzuführen ist. Da speziell die RNA-Regulation untersucht werden sollte, wurden Mutationen, die einen Defekt in der Viruspartikelbildung aufwiesen aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Vermutlich führten in einzelnen Fällen die eingebrachten Mutationen zu falsch gefalteten M Proteinen, die vorzeitig degradierten und somit nicht detektiert werden konnten. Insgesamt wurden 39 verschiedene M-Proteinmutationen hergestellt, davon zeigten 11 in

Komplementationsanalysen einen Hi-T Phänotyp und 2 einen Hi-R Phänotyp (siehe Kap.3, Tab 4 u. 5). Jedoch konnten nur bei 5 Hi-T Mutationen, 34AAA, 104AAA, 35AA, 99R und 104A, eine Viruspartikelbildung beobachtet werden, so dass die restlichen Hi-T Mutationen nicht weiter in die Analysen einbezogen wurden. Die Hi-R Mutationen, 20AA und 196AAA, zeigten keinen Defekt in der Viruspartikelbildung.

Nach dieser Vorauswahl der Mutanten wurden schließlich rekombinante Viren erstellt, die für die eigentlichen Untersuchungen eingesetzt wurden. Die Integration der Mutationen in das SAD L16 Virus diente dazu, deren Wirkung im kompletten viralen Kontext untersuchen zu können, da z.B. dosisabhängige Effekte in den Komplementationsanalysen nicht erkennbar wären. Es konnten neun rekombinante Viren isoliert werden. Davon waren 4 Hi-Transkription (Hi-T) Mutanten SAD 34AAA, SAD 35AA, SAD 99R und SAD 104AAA, die in ihrer Transkriptionsrate mit bis zu 700% weit über der des Wildtypvirus lagen (siehe Kap. 3, Abb. 15 und Abb. 16). Für diese Viren konnte eine deutliche Zunahme der mRNA-Menge beobachtet werden, während die Mengen an Genom reduziert waren. Alle Hi-T Mutanten zeigten in den Northern- und Westernblotanalysen eine insgesamt höhere Menge an intrazellulärer RNA und Virusproteinen. Dies resultierte aber nicht in insgesamt höheren Virustitern, was vermutlich auf erhöhte zytopathische Effekte der Hi-T Mutanten zurückzuführen ist. Besonders stark ausgeprägt zeigte sich dieser Effekt bei den Mutanten SAD 34AAA und SAD 35AA (siehe Kap. 3, Abb. 30), die den infizierten Zellrasen schnell zerstörten. Die Wachstumskurven der zwei Hi-T Mutanten SAD 34AAA und SAD 35AA zeigten einen 10- (34AAA) bis zu 100- (35AA) fach geringeren Virustiter als das Wildtypvirus SAD L16. Dies spricht für eine schnelle Ausbreitung des Virus und somit nicht für einen Defekt in der *Budding*-Aktivität des Matrixproteins, wie für eine spezielle Mutante postuliert wurde (Schnell et al., 2008). Zudem konnten Defekte in *Budding* durch die transienten Komplementationsexperimente ausgeschlossen werden. Schnell et al. (2008) beschrieben eine Mutante mit einer Mutation im PPEY-Motif (M35S) des Matrixproteins, die eine im Verhältnis zum Genom erhöhte Menge an mRNA aufwies. Die Mutante zeigte zusätzlich einen geringeren Virustiter (verglichen zur Wildtypvariante des Tollwutvirus RV SPBN) und in der Immunfärbung waren kleinere Foci zu erkennen. Daraus wurde geschlossen, dass das Matrixprotein in seiner *Budding*-funktion gestört war. Da die Virionen nicht aus der Wirtszelle freigesetzt werden konnten, stiegen die intrazelluläre Proteinmengen, die

möglicherweise eine Erhöhung der RNA-Mengen zur Folge hatten (Wirblich et al., 2008).

Zusätzlich zu den Hi-T Mutanten konnten 2 Hi-Replikation (Hi-R) Mutanten, SAD 20AA und SAD 196AAA, isoliert werden, die eine höhere Replikationsrate aufwiesen als das Wildtypvirus. Dies zeigte sich durch die verglichen zum Wildtypvirus SAD L16 größere Mengen an Genom und geringere Mengen an mRNA. Die restlichen Viren, SAD 47A, SAD 132A und SAD 193AAA, zeigten keine oder nur geringe phänotypische Veränderungen. Die Mengen der mRNA und des Genoms waren ähnlich hoch wie des Wildtypvirus. Diese Ergebnisse unterstützen die Theorie, dass das Matrixprotein an der Regulation der RNA-Synthese beteiligt ist. Vergleichende Analysen zwischen Wildtypvirus und Mutanten sollten Aufschluss über den Mechanismus geben.

#### **4.2.1 Die Lokalisation der Transkriptions-, bzw. Replikationsmaschinerie hat möglicherweise einen Einfluss auf die Regulation der RNA-Synthese**

Für viele Positivstrang-Viren konnte gezeigt werden, dass die Replikationskomplexe in verschiedenen Membransystemen der Wirtszelle eingebettet sind. Bei den Picorna- und Flaviviren sind sie in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, bei Togaviren in denen der Endosomen und Lysosomen und bei den Nodaviren in den der Mitochondrien zu finden (Salonen et al., 2005). Diese Einbettung steigert die Effizienz der Replikation, da die beteiligten Proteine, bzw. die RNA vermutlich gezielter miteinander interagieren können. Die Wahrscheinlichkeit, dass die einzelnen, dissoziierenden Komponenten frei im Zytoplasma aufeinander treffen, ist geringer. Proteine des Replikationskomplexes der Positivstrang-Viren bewirken aktiv, dass die Membran sich einstülpt oder Vesikel formt, die dadurch eine schützende Umgebung für die RNA-Replikation bildet (Salonen et al., 2005). Für verschiedene behüllte Viren konnte gezeigt werden, dass das Matrixprotein mit Wirtszellproteinen interagiert, die Bestandteile des *Vacuolar Protein Sorting* (VPS)-Signalwegs sind (Chen et al., 2008). Dies ist für NSV bisher nicht beschrieben, könnte aber vielleicht auch wichtig sein. In der Immunfluoreszenz der Komplementierungsversuche konnte für die Hi-T Mutanten SAD R58G, SAD 34AAA und SAD 104AAA eine deutlich diffusere Verteilung des Matrixproteins im

Zytoplasma beobachtet werden, wo hingegen die Hi-R Mutanten SAD 20AA und SAD 196AAA eine deutliche Anlagerung des Matrixproteins an der Zellmembran aufwiesen (siehe Kap.3, Abb.12). Es muss bei dieser Überlegung bedacht werden, dass das Tollwutvirus ein Negativ-Strang RNA-Virus ist, welches für die Prozesse der Replikation und Transkription die gleiche Polymerase einsetzt. Eine denkbare Theorie wäre, dass die Regulation der RNA-Synthese abhängig von der Lokalisation in der Zelle abläuft. Während die Transkription ein Prozess wäre, der vermehrt im Zytoplasma stattfindet, würde die Replikation, ähnlich wie bei den Positivstrang RNA-Viren eher an der Zellmembran ablaufen. Das Matrixprotein stellt das Bindeglied zwischen dem Ribonukleoproteinkomplex, welches die Viruspolymerase und die RNA beinhaltet, und der Zellmembran dar (Mebatsion, Weiland and Conzelmann, 1999). Möglicherweise wird diese Funktion des Matrixproteins in den Hi-T Mutanten geschwächt und die diffusere Verteilung begünstigt die Transkription. Eine verstärkte Anlagerung des Matrixproteins an die Membrane, wie sie bei den Hi-R Mutanten zu beobachtet war, würde eine vermehrte Replikation begünstigen. Da im viralen Kontext eine Vielzahl anderer Proteine an etlichen Interaktionen mitwirken, können solche Vorgänge, besonders im Zytoplasma, leicht maskiert werden und bleiben in der Immunfluoreszenz unentdeckt. Obwohl eine Regulation der RNA-Synthese durch die Lokalisation der Transkriptions-, bzw. Replikationsmaschinerie in der Zelle nicht weiter nachgewiesen werden konnte, ist die auffällige Umverteilung des Matrixproteins an entweder Zellmembran (Hi-R) oder diffus in der Zelle (Hi-T) ein wichtiger Hinweis für weitere Nachforschungen.

#### 4.2.2 Die Promotor- und Antigenompromotoraktivität der mutierten Viren

Bei der Replikation des Tollwutvirus wird aus der *Template*-RNA negativer Orientierung (Genom, Virus RNA) ein Zwischenprodukt positiver Orientierung (cRNA) gebildet, das Antigenom. Die Synthese dieses komplementären Strangs startet am Genompromotor (GP) der am 3'-Ende des (-)-Strang Genoms lokalisiert ist. Dieser Strang wird von der Polymerase an einem Stück abgelesen. Im nächsten Schritt setzt die Polymerase am Antigenompromotor an und es erfolgt die Synthese des neuen (-)-Strang Genoms. Für die Promotoren des Genoms und des Antigenoms konnte gezeigt werden, dass sie die Polymerase-Aktivität unterschiedlich steuern und damit

eine regulatorische Funktion in der Replikation, bzw. Transkription erfüllen. Der Antigenompromotor ist für die virale Polymerase ein stärkerer Promotor als der Genompromotor. So wird gewährleistet, dass der größte Teil der neusynthetisierten RNA Virusgenom ist, was für die Verpackung in neue infektiöse Virionen benötigt wird (Finke et al., 1997). Da die Promotoren einen Einfluss auf die RNA-Synthese haben, stellen sie neben der Polymerase selbst, potentielle Interaktionspunkte für das Matrixprotein dar. Ein Vergleich von Genom- und Antigenommengen zeigte bei der Hi-R Mutante SAD 20AA eine Verschiebung des Verhältnisses, so dass annähernd gleiche Mengen an Genom und Antigenom detektiert werden konnten (siehe Kap. 3 Abb. 18), gleichzeitig wurde die Transkription verringert. Zusammen mit dem Befund, dass die Mutante SAD 20AA eine bevorzugte Lokalisierung an der Zellmembran aufwies (siehe Kap. 3, Abb. 12), lässt dies auf einen möglichen Zusammenhang zwischen der Lokalisation des Matrixproteins und auf dessen Wirkung auf die jeweiligen Promotoren und das Verhältnis von Replikation und Transkription schließen. Eine stärkere Bindung durch das Matrixprotein an die Zellmembran könnte die Replikationsaktivität positiv beeinflussen. In diesem Fall wäre eine solche Umregulierung sinnvoll, da die Nähe zur Zellmembran eine günstige Voraussetzung für die Virionenfreisetzung darstellt. Man könnte demnach erwarten, dass der Virustiter der SAD 20AA Mutante verglichen zu L16 erhöht ist, dies konnte jedoch nicht beobachtet werden (siehe Kap.3, Abb. 14). Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die reduzierte Transkription, die zur Folge hat, dass auch weniger Proteine exprimiert werden können, ohne die keine Virionen gebildet werden können. Tatsächlich wies die Mutante SAD 20AA eine verminderte Proteinexpression auf (Daten nicht gezeigt).

Die Hi-T Mutante SAD 104AAA zeigte ebenfalls eine Veränderung des Genom-Antigenom-Verhältnisses, Genom und Antigenom werden in nahezu gleichen Mengen gebildet. Im Gegensatz zu der Hi-R Mutante SAD 20AA ist in diesem Fall eher die Abregulierung der Replikation die Ursache (siehe Kap. 3, Abb.18). Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten für die M Mutante 104AAA eine sehr diffuse Verteilung in der Zelle (siehe Kap. 3, Abb. 12). Würde, wie oben für SAD 20AA beschrieben, die Genompromotoraktivität durch eine Anlagerung des Matrixproteins an der Zellmembran verstärkt werden, könnte die diffuse Verteilung den gegenteiligen Effekt haben und den Antigenompromotor schwächen.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Regulation der RNA-Synthese könnte demnach die unterschiedliche Lokalisation der Transkriptions-, bzw. Replikationsmaschinerie (siehe Kap. 4.2.1), vermittelt durch das M Protein, an unterschiedlichen zellulären Membranen sein.

### **4.2.3 Das Matrixprotein und das Phosphoprotein regulieren zusammen die RNA-Synthese**

Tollwutviren, die kein Matrixprotein exprimieren, weisen einen Hi-T Phänotyp auf (Finke,S., Mueller-Waldeck,R., and Conzelmann,K.K., 2003). Zusätzlich dazu konnte kürzlich gezeigt werden, dass SAD  $\Delta$ PLP, ein Virus das nur geringe Mengen an P exprimieren kann, ebenfalls einen Hi-T Phänotyp aufweist (in dieser Arbeit und Brzózka, unveröffentlicht). Das Phosphoprotein wirkt als Kofaktor für die Virus-Polymerase und als Chaperon für die Verpackung der viralen RNA in N Proteine. Zudem ist es ein Inhibitor des Interferonsystems, was es dem Tollwutvirus ermöglicht, in der Wirtszelle zu überleben (Brzózka et al., 2005, 2006). Da die Hi-T Mutante 104AAA nicht nur eine Veränderung in der RNA-Synthese aufwies, sondern auch Interferon induzierte, ist anzunehmen, dass dies auf ein Zusammenspiel von Matrixprotein und Phosphoprotein zurückzuführen ist.

Erste Komplementierungsassays zeigten eine deutliche Umverteilung des P Proteins nach Koexpression von M. Die diffuse Verteilung von P wird durch eine Interaktion von M in M-ähnliche Strukturen verändert. Zusätzlich konnte durch die Markierung von M und P mit Fluoreszenzproteinen eine deutliche Kolo­kalisierung zwischen M und P beobachtet werden (siehe Kap. 3, Abb. 34). Vermutlich wird die Regulation der RNA-Synthese unter anderem durch ein Zusammenspiel von M und P bestimmt.

Um den Bereich der Interaktion einzugrenzen, wurden sowohl N-terminal verkürzte Matrixproteine, sowie ein C-terminal verkürztes M konstruiert und in weiteren Komplementierungsassays eingesetzt. Während die N-terminal verkürzten Mutanten weiterhin Kolo­kalisierung zwischen M und P aufwiesen, konnte dies bei der C-terminal verkürzten Mutante nicht mehr beobachtet werden (siehe Kap. 3, Abb. 36). Die Interaktionsdomäne liegt demnach am C-terminalen Ende des Matrixproteins.

Möglicherweise spielt beim Prozess der RNA-Syntheseregulation der Einfluss der M und P Interaktion auf die Konformation und damit deren Affinität zu den Promotoren der Polymerase eine entscheidende Rolle. Durch die Bindung des M-P Komplexes könnte die Konformation der Polymerase zu Gunsten der Replikation verändert werden. M-P Komplexe dienen möglicherweise als Signal dafür, dass genügend Proteine vorhanden sind. Eine unnötige Transkription wäre für die Wirtszelle und somit für das Virus eine Energieverschwendung. Fehlt eines der Proteine, kann keine M-P Interaktion stattfinden und die Polymerase nimmt die Form einer Transkriptase an. Somit könnte eine Defizienz an M und P Protein aufgehoben werden.

Vermutlich verloren die Hi-T Mutanten entweder die Fähigkeit, exakt mit dem Phosphoprotein zu interagieren oder sie waren in ihrer eigenen Konformation so verändert, dass sie keine Wirkung auf die Polymerase zeigen konnten, was eine erhöhte Transkriptaseaktivität zur Folge haben könnte. Im Gegensatz dazu müssten nach dieser Theorie die Hi-R Mutanten eine besonders stabile Form der Interaktion des M-P Komplexes mit der Polymerase aufweisen, damit diese vermehrt als Replikase aktiv wird.

Um diese Hypothese zu beweisen, sollte die Interaktion zwischen M und P biochemisch durch Koimmunpräzipitation nachgewiesen werden. Da das Matrixprotein andere Proteine unspezifisch bindet, war es allerdings trotz Modifikation zahlreicher Faktoren im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich ein aussagekräftiges Ergebnis zu erzielen.

#### **4.2.4 Die indirekte Regulation der RNA-Synthese über das Nukleoprotein**

Erst kürzlich wurde mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen geklärt, wie das Nukleoprotein die Virus-RNA ummantelt. In dieser Form ist die virale RNA vor der Erkennung durch das Immunsystem der Wirtszelle geschützt. Damit die Virus-Polymerase Zugang zu der RNA hat, muss sich das Nukleoprotein durch eine Konformationsveränderung öffnen (Albertini et al., 2006; Green et al., 2006, Albertini et al., 2008). Eine denkbare Theorie ist, dass M-P Komplexe Auswirkungen auf das Nukleoprotein haben und so die RNA-Synthese regulieren. Die Polymerase könnte mit Hilfe des Komplexes die geöffnete Struktur des Nukleoproteins stabilisieren und leichter die Gesamt-RNA ablesen. In diesem Fall wäre eine stärkere Bindung des

Komplexes, wie es für die Hi-R Mutanten zutreffen könnte, eine Erklärung für eine gesteigerte Replikationsrate. Der M-P Komplex könnte durch die Mutation im Matrixprotein stabilisiert werden und das Nukleoprotein effizienter im geöffneten Zustand halten. Die Hi-T Mutanten dagegen könnten diese Fähigkeit verloren haben. Somit wäre die Konformationsänderung des Nukleoproteins als indirekter Effekt des Matrixproteins die Ursache für eine veränderte RNA-Synthese Regulation. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten deuten auf einen solchen Mechanismus hin. Ein Beweis für diese Theorie konnte allerdings nicht erbracht werden, da eine aussagekräftige direkte Analyse der M-P-Interaktion mit Hilfe von Koimmunpräzipitationsexperimenten nicht möglich war.

### 4.3 Tollwutvirus und Interferoninduktion

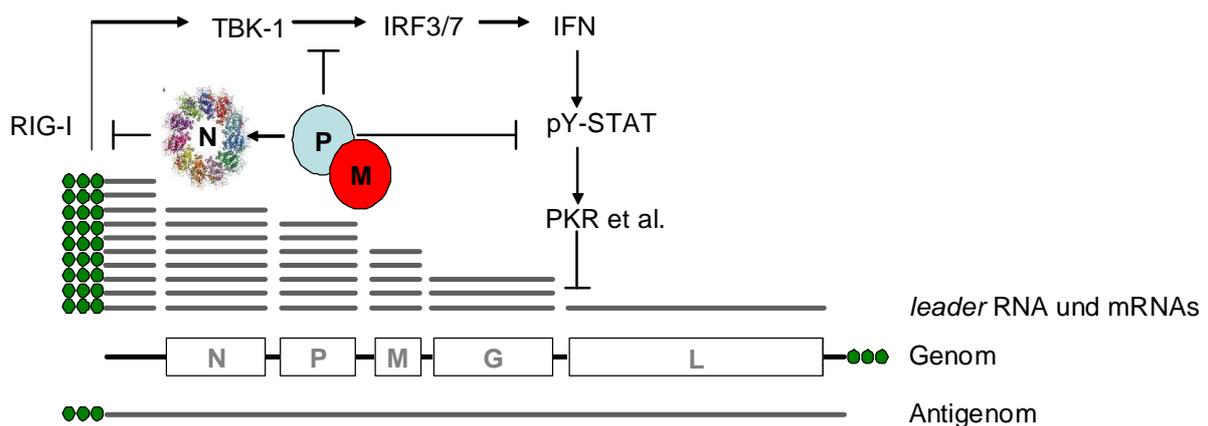
Ob ein Virus erfolgreich in der Wirtszelle repliziert, hängt unter anderem davon ab, wie gut es sich vor antiviralen Abwehrmechanismen der infizierten Zellen schützen kann. Das Tollwutvirus erreicht dies mit Hilfe des Phosphoproteins, es ist in der Lage, die Signalkaskade einer Interferoninduktion an 2 Stellen zu unterbrechen (Brzózka et al., 2005, 2006).

Bei den Untersuchungen der Hi-T Mutanten waren neben der erhöhten Transkriptionsrate auch eine erhöhte Proteinexpression zu beobachten (siehe Kap. 3, Abb. 29). Vermutlich verursachte diese hohe Konzentration an exprimierten Proteinen in BSR T7/5-Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) (siehe Kap. 3, Abb. 30A).

Die Beobachtungen, dass die interferonkompetente Zelllinie HEp-2 nach Virusinfektion keinen CPE aufwies und die Hi-T Viren in der Replikation deutlich attenuiert waren (siehe Kap.3, Abb. 30B), war Anlass für weitere Untersuchungen hinsichtlich der Interferoninduktion. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Hi-T Mutante SAD 104AAA nicht mehr mit der Interferoninduktion interferieren konnte und damit die zelluläre Abwehrreaktion aktiviert wurde. Die erhöhten Mengen an viralen mRNA Molekülen können nicht die Ursache dieser Induktion sein, da die restlichen Hi-T Mutanten, 34AAA, 35AA und 99R, keinen solchen Effekt aufwiesen (siehe Kap. 3, Abb. 31). Die aus der erhöhten Transkription resultierende vermehrte Expression des Interferonantagonisten Phosphoprotein (P) könnte einer gesteigerten Interferoninduktion durch höhere virale mRNA-Mengen entgegenwirken.

Neben der einfachen Erhöhung der absoluten P Protein Konzentration in virusinfizierten Zellen könnten die in dieser Arbeit gefundenen Hinweise auf die Existenz eines regulatorischen M-P Komplexes auch auf eine direkte Beteiligung der M-P-Komplexe an der interferonantagonistischen Wirkung von P hindeuten.

Eine M/P Interaktion wäre in der Mutante SAD 104AAA vermutlich verstärkt, was P an einer Interferenz mit IFN hindern würde. Die übrigen Hi-T Mutanten waren nicht in der Lage die Induktion der zellulären Interferonantwort zu unterbinden. Mögliche Wirkungen der M-P Komplexe auf die Interferoninduktion sind in Abbildung 37 zusammengefasst.



**Abbildung 37: Modell der Inhibition der Interferoninduktion durch Phosphoprotein und Matrixprotein.** Durch die Enkapsidierung der RNA durch das Nukleoprotein wird sie nicht durch den zellulären Rezeptor RIG-I erkannt. Das Phosphoprotein inhibiert die Phosphorylierung von IRF3/7 durch TBK-1 und die Translokation des pY-STAT1 in den Zellkern und kann so eine Interferonabwehr der Zelle verhindern (Brzozka et al., 2005, 2006). Eine Konformationsänderung des Nukleoproteins durch die Bindung eines defekten M-P Komplexes könnte verursachen, dass das Nukleoprotein sich nicht mehr schützend um die RNA legen könnte. Sie wäre vor der Erkennung durch RIG-I nicht sicher. Weiterhin könnten M-P Komplexe die Aktivität des P direkt inhibieren. Ein defektes Matrixprotein könnte auch die Konformation des Phosphoproteins derart verändern, dass es seine Funktion als Inhibitor nicht mehr erfüllen kann.

## 4.4 Quantitative PCR (qPCR)

Bisher wurden aufgrund der geringen Mengen an RNA radioaktiv markierte DNA-Sonden oder direkt radioaktive RNAs zur Quantifizierung eingesetzt. Mit der Einführung einer neuen Methode, der quantitativen PCR, steht nun eine genauere, leichter handhabbare und aus sicherheitsaspekten bessere Methode zur Verfügung. Mit ihrer Hilfe können nach einer RT-Reaktion die Mengen einer spezifischen RNA bestimmt werden und erlauben den Vergleich der RNA-Syntheserate eines Virus. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die qPCR für die Quantifizierung von Virus-RNA etabliert.

Für eine erfolgreiche qPCR müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Nicht nur die Sequenzen der ausgesuchten Primer und Hybridisierungsproben müssen stimmen, auch deren Konzentration ist relevant. Größere Mengen an DNA lassen sich z.B. nicht quantifizieren, wenn der Vorrat an Primern und/oder Hybridisierungsproben bereits nach wenigen Zyklen erschöpft ist. Die spezifische Bindung der Primer und Hybridisierungssonden an die DNA kann nur durch die richtige Annealingtemperatur erfolgen. Sonst werden durch unspezifische Hybridisierungsereignisse falsche DNA-Bereiche amplifiziert und können ein falsch-positives Signal ergeben. Ein weiterer Faktor ist die in dem Reaktionspuffer vorhandene Magnesiumkonzentration. Die  $Mg^{2+}$ -Ionen stabilisieren die spezifische Anlagerung der Primer an die Template-DNA. Die anschließende Quantifizierung erfolgt mit Hilfe der erstellten Standardkurve.

Durch Modifikation der einzelnen Faktoren konnte eine nahezu 100%-ig effektive qPCR etabliert werden. Dies konnte an der Verzehnfachung der DNA-Menge in etwa 3,33 Zyklen festgemacht werden. Mit der quantitativen PCR konnte in dieser Arbeit eine wichtige Methode für die weitergehende Analyse der viralen RNA-Akkumulation in infizierten Zellen entwickelt werden. Allerdings schienen die Absolutwerte und die Verhältnisse der RNAs sehr stark abzuweichen von den Ergebnissen der Northernblotanalysen. Eine weitere Optimierung könnte durch eine weitere Eichung der RNA Standards erreicht werden.

## 4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnten verschiedene Hinweise auf den Regulationsmechanismus des Matrixproteins auf die RNA-Synthese gefunden werden. Immunfluoreszenzaufnahmen zeigten, dass die Lokalisation des Matrixproteins in der Zelle relevant sein könnte. Weiterhin wurden Hinweise auf eine Interaktion und Koloalisation von M und P gefunden, die entweder für die Polymerasefunktion oder die Rekrutierung des M an die RNP Templates wichtig sein könnte. Beides bietet eine gute Grundlage für weitere Nachforschungen.

## Zusammenfassung

Das Matrixprotein (M) des Tollwutvirus (Rabies Virus; Genus *Lyssavirus*; Fam. *Rhabdoviridae*) erfüllt unterschiedliche Funktionen im viralen Zyklus. Zum einen fungiert es als Strukturprotein, das für die Kondensierung der Ribonukleoprotein Komplexe (RNP), die Assemblierung der Virushülle und das Knospen von Virionen verantwortlich ist. Zum anderen reguliert es die RNA-Synthese des Virus durch bisher unbekannte Mechanismen.

In dieser Arbeit wurde eine Bibliothek von M Protein Mutanten durch ortsgerechte Mutagenese hergestellt und deren Funktion beim Virus-Assembly und bei der Regulierung der RNA-Synthese untersucht. Mit Hilfe von Komplementationsexperimenten konnten zunächst solche Mutanten identifiziert werden, die hinsichtlich ihrer Funktion bei der Virusbildung intakt waren, die aber im Vergleich zum Wildtyp Virus deutliche Unterschiede bei der Regulierung der RNA-Synthese aufwiesen. Vier Mutanten mit Veränderungen in unterschiedlichen Bereichen des M Proteins wiesen den bereits als *high transcription* (Hi-T) bekannten Phänotyp auf, bei dem überproportional viele mRNAs synthetisiert werden. Zusätzlich konnten erstmals 2 Mutanten erzeugt werden, die zu einer erhöhten Produktion von Replikationsprodukten führten und die als *high replication* (Hi-R) bezeichnet wurden. Interessanterweise konnte mit Hilfe von Immunfluoreszenzaufnahmen infizierter Zellen Hinweise gefunden werden, dass Mutationen mit Effekten auf die RNA-Synthese zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation des M Proteins führen können. Hi-R M Proteine schienen verstärkt mit der Zytoplasmamembran assoziiert zu sein, während Hi-T M Proteine eher diffus oder vesikulär im Zytoplasma verteilt waren. Diese Ergebnisse liefern weitere Beweise für die Regulation der RNA-Synthese durch das M Protein.

Die relevanten Mutationen wurden in die Genome von rekombinanten Tollwutviren integriert, um die Phänotypen im viralen Kontext zu bestätigen und um Anhaltspunkte für die zugrunde liegenden Mechanismen zu erhalten. In der Tat konnten die Ergebnisse der *in trans*-Komplementierungstests bestätigt werden. Um zu untersuchen, in welchem Maße die RNA-Synthese durch die eingebrachte Mutation beeinflusst wird, wurden Northern Hybridisierungen durchgeführt und zusätzlich eine quantitative RT-PCR (qPCR) zur Bestimmung der RNA Mengen etabliert. Die RNA-

Quantifizierungen zeigten im Vergleich zum Wildtypvirus SAD L16 für die Hi-T Mutanten eine deutliche Zunahme der mRNA-Mengen, während die Mengen an Genom reduziert waren. Es konnte eine Zunahme der Transkriptionsraten auf bis zu 700% beobachtet werden. Die Hi-R Mutanten hingegen zeigten eine erhöhte Replikationsrate. Die Erhöhung der Transkriptionsrate in Hi-T Mutanten wirkte sich nicht proportional auf die erzielten Virustiter aus, was vermutlich auf eine zu beobachtende erhöhten Zytotoxizität der Virusmutanten zurückzuführen ist.

Als möglicher Interaktionspartner für das M Protein konnte das Phosphoprotein identifiziert werden, das als Chaperon für die Enkapsidierung der viralen RNA, als Kofaktor für die virale Polymerase und als Interferon-Antagonist fungiert. Dies wird durch 2 unabhängige Befunde bestätigt. Zum einen nimmt das ansonsten gleichmäßig in der Zelle verteilte P Protein nach Ko-Expression des M Proteins dessen typische Verteilung an. Zum anderen war die Hi-T Mutante SAD 104AAA, im Gegensatz zum Wildtyp Virus nicht mehr in der Lage, die zelluläre Interferon Produktion zu unterdrücken, was auf eine Funktionsstörung des P Proteins durch die Bindung an das mutierte M Protein hinweist. Dies sind erste Hinweise auf eine Rolle des M Proteins bei der antiviralen Immunantwort.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass RNA-Syntheseregulation und Virus-*Assembly* in der Tat funktionell voneinander getrennt werden können und dass Effekte auf die RNA-Synthese durch Mutationen in unterschiedlichen Bereichen des M Proteins erzielt werden können. Die weitere Charakterisierung der Interaktion des M Proteins mit P, einer Komponente des Polymerase Komplexes, könnte die Basis eines mechanistischen Modells für die Regulierung der RNA Synthese liefern.

## Summary

The matrix protein (M) of the rabies virus (Genus *Lyssavirus*; Fam. *Rhabdoviridae*) has two different functions in the viral cycle. It is a structural protein, which is responsible for the condensation of the ribonucleoprotein complexes (RNPs), the assembly of the virions and the budding of the virus out of the host cell. And it also regulates the RNA-synthesis of the virus, of which the mechanisms are still unknown.

With the help of site-directed mutagenesis a library of M protein mutants was established and analyzed in their functions in virus assembly and RNA-synthesis regulation. Through complementation assays it was possible to identify those mutants, which were functional in virus assembly, but showed significant differences to the wild type rabies virus in regulation of the RNA-synthesis. Four mutants with mutations in different regions of the matrix protein showed a previously described high transcription (Hi-T) phenotype. They were synthesising high levels of mRNA. Additionally 2 mutants with a new phenotype could be created, which showed high levels of replication products and were therefore classified as high replication (Hi-R) viruses.

Interestingly when looking at the infected cells via immune fluorescence microscopy it could be found, that those mutations with effect on their RNA-synthesis showed an altered intracellular distribution of the M protein. Hi-R M proteins showed an increased association with cytoplasm membranes, whereas Hi-T M proteins showed a rather diffuse or vesicular distribution in the cell cytoplasm. These results are therefore further evidence that the regulation of RNA-synthesis is regulated by the matrix protein.

The relevant mutations were then integrated into recombinant rabies viruses to confirm the phenotypes in the whole viral context and to find indications for the regulation mechanisms. Indeed the results of the *in trans* complementation assays could be confirmed. In order to check how the mutations influence the RNA-synthesis, Northern Hybridisations were done and a qPCR established. These methods were used to quantify the RNA levels of the different viruses. Compared to the wild type virus SAD L16 the RNA quantification showed a significant increase of mRNA for the Hi-T mutants, whereas the genome RNA levels were decreased,

resulting in an increase of the transcription rate of up to 700%. In contrast the Hi-R mutants showed a higher genome RNA level, thus having a lower transcription rate. Although having a higher transcription rate, the Hi-T mutants did not result in higher virus titers, which is probably due to the high cytopathogenic effect of the virus mutants.

The phosphoprotein, which chaperones the encapsidation of viral RNA, is a cofactor for the viral polymerase and is an interferon antagonist, was identified as a possible interaction partner for the matrix protein. This has been confirmed by 2 independent results. First being the phosphoprotein, which when coexpressed with the matrix protein, shows a change of allocation within the host cell from being diffuse to forming M typical structures. Secondly the Hi-T mutant SAD 104AAA was not able of interfering with the cellular interferon production, as the wild type virus is capable of. This is probably caused through a functional disturbance of the P protein through M, thus possibly being the first evidence for the role of M in the antiviral immune response.

The results of this thesis show, that RNA-synthesis regulation and virus assembly are indeed functionally different. It could also be demonstrated and that different mutations in diverse areas of the m protein have an effect on the RNA-synthesis regulation. As the phosphoprotein is a component of the polymerase, further characterisation of the interaction with the matrix protein could be the base of the mechanism model for the regulation of the RNA-synthesis.

## Literaturverzeichnis

- Abraham, G. and Banerjee, A.K. (1976). Sequential transcription of the genes of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 1504-1508.
- Albertini, A.A., Schoehn, G., Weissenhorn, W., Ruigrok, R.W. (2008). Structural aspects of rabies virus replication. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Jan; 65(2): 282-94.
- Albertini, A.A., Wernimont, A.K., Muziol, T., Ravelli, R.B., Clapier, C.R., Schoehn, G., Weissenhorn, W., and Ruigrok, R.W. (2006). Crystal structure of the rabies virus nucleoprotein-RNA complex. *Science* 313, 360-363.
- Anilionis, A., Wunner, W.H., and Curtis, P.J. (1981). Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature* 294, 275-278.
- Arnheiter, H., Davis, N.L., Wertz, G., Schubert, M., and Lazzarini, R.A. (1985). Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis. *Cell* 41, 259-267.
- Ball, L.A., Pringle, C.R., Flanagan, B., Perepelitsa, V.P., Wertz, G.W. (1999). Phenotypic consequences of rearranging the P, M, and G genes of vesicular stomatitis virus. *J Virol.* 1999 Jun; 73(6): 4705-12.
- Ball, L.A. and White, C.N. (1976). Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73, 442-446.
- Banerjee, A.K. (1987a). The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* 48, 363-364.
- Banerjee, A.K. (1987b). Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol. Rev.* 51, 66-87.
- Barr, J., Chambers, P., Pringle, C.R., and Easton, A.J. (1991). Sequence of the major nucleocapsid protein gene of pneumonia virus of mice: sequence comparisons suggest structural homology between nucleocapsid proteins of pneumoviruses, paramyxoviruses, rhabdoviruses and filoviruses. *J Gen Virol* 72 ( Pt 3), 677-685.
- Basler, C.F., García-Sastre, A. (2002). Viruses and the type I interferon antiviral system: induction and evasion. *Int Rev Immunol.* 2002 Jul-Oct;21(4-5):305-37.
- Blumberg, B.M., Giorgi, C., and Kolakofsky, D. (1983). N protein of vesicular stomatitis virus selectively encapsidates leader RNA in vitro. *Cell* 32, 559-567.
- Blumberg, B.M., Leppert, M., and Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23, 837-845.
- Brzózka, K., Finke, S., and Conzelmann, K.K. (2005). Identification of the rabies virus alpha/beta interferon antagonist: phosphoprotein P interferes with phosphorylation of interferon regulatory factor 3. *J Virol* 79, 7673-7681.

- Brzózka, K., Finke, S., and Conzelmann, K.K. (2006). Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. *J Virol* 80, 2675-2683.
- Brzózka, K. and Conzelmann, K.K. (2009). Rhabdoviruses and Mechanisms of Type I Interferon Antagonism. ASM Press, 211-227.
- Canter, D.M. and Perrault, J. (1996). Stabilization of vesicular stomatitis virus L polymerase protein by P protein binding: a small deletion in the C-terminal domain of L abrogates binding. *Virology* 219, 376-386.
- Carroll, A.R. and Wagner, R.R. (1979). Role of the membrane (M) protein in endogenous inhibition of in vitro transcription by vesicular stomatitis virus. *J Virol* 29, 134-142.
- Chen, B.J., Lamb, R.A. (2008). Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology*. 2008 Mar 15;372(2):221-32.
- Conzelmann, K.K., Cox, J.H., Schneider, L.G., and Thiel, H.J. (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 175, 485-499.
- Costa-Pereira, A.P., Williams, T.M., Strobl, B., Watling, D., Briscoe, J., and Kerr, I.M. (2002). The antiviral response to gamma interferon. *J Virol* 76, 9060-9068.
- Fearns, R., Peeples, M.E., and Collins, P.L. (1997). Increased expression of the N protein of respiratory syncytial virus stimulates minigenome replication but does not alter the balance between the synthesis of mRNA and antigenome. *Virology* 236, 188-201.
- Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2003). Dissociation of rabies virus matrix protein functions in regulation of viral RNA synthesis and virus assembly. *J Virol* 77, 12074-12082.
- Finke, S. and Conzelmann, K.K. (2005). Replication strategies of rabies virus. *Virus Res.* 111, 120-131.
- Finke, S., Mueller-Waldeck, R., and Conzelmann, K.K. (2003). Rabies virus matrix protein regulates the balance of virus transcription and replication. *J Gen Virol* 84, 1613-1621.
- Finke, S. and Conzelmann, K.K. (1997). Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J Virol* 71, 7281-7288.
- Fischbach, B., Niezgodna, M., El Feky, W.H., Orciari, L., Sanchez, E.Q., Likos, A., Klintmalm, G.B., Cardo, D., LeDuc, J., Chamberland, M.E., Jernigan, D.B., and Zaki, S.R. (2005). Transmission of rabies virus from an organ donor to four transplant recipients. *N. Engl. J Med.* 352, 1103-1111.
- Flanagan, E.B., Ball, L.A., Wertz, G.W. (2000). Moving the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus to promoter-proximal positions accelerates and enhances the protective immune response. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):7895-902.

- Freuling et al. (2008). Deutschland ist tollwutfrei! Forschungsreport des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz. 34-38.
- Fu, Z.F., Zheng, Y., Wunner, W.H., Koprowski, H., and Dietzschold, B. (1994). Both the N- and the C-terminal domains of the nominal phosphoprotein of rabies virus are involved in binding to the nucleoprotein. *Virology* 200, 590-597.
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Nov; 83(21):8122-6
- Green, T.J., Zhang, X., Wertz, G.W., Luo, M. (2006). Structure of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein-RNA complex. *Science*. 2006 Jul 21; 313(5785):357-60. Epub 2006 Jun 15.
- Goodbourn, S., Didcock, L., and Randall, R.E. (2000). Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 81, 2341-2364.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y)* 10, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y)* 11, 1026-1030.
- Iverson, L.E. and Rose, J.K. (1981). Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23, 477-484.
- Jähnichen, S. (2006) Hybridization Sonden for Light Cyclers. Wikipedia, Stichwort: realtime PCR, LightCycler Sonden . 2006,Ref Type: Magazine Article
- Johnson, N., Phillpotts, R., and Fooks, A.R. (2006). Airborne transmission of lyssaviruses. *J Med. Microbiol.* 55, 785-790.
- Kurilla, M.G., Piwnica-Worms, H., and Keene, J.D. (1982). Rapid and transient localization of the leader RNA of vesicular stomatitis virus in the nuclei of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 5240-5244.
- Lafon, M. (2004). Subversive neuroinvasive strategy of rabies virus. *Arch Virol Suppl.* (18):149-59
- Lahaye ,X., Vidy, A., Pomier, C., Obiang, L., Harper, F., Gaudin, Y., Blondel, D. (2009). Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus infected cells: evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol*. 2009 Jun 3. [Epub ahead of print]
- Lentz, T.L., Burrage, T.G., Smith, A.L., and Tignor, G.H. (1983). The acetylcholine receptor as a cellular receptor for rabies virus. *Yale J Biol. Med.* 56, 315-322.

- Lin, R., Heylbroeck, C., Pitha, P.M., and Hiscott, J. (1998). Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. *Mol. Cell Biol.* *18*, 2986-2996.
- Lin, R., Mamane, Y., and Hiscott, J. (1999). Structural and functional analysis of interferon regulatory factor 3: localization of the transactivation and autoinhibitory domains. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2465-2474.
- Markotter, W., Kuzmin, I., Rupprecht, C. E. Randles J., Sabeta, C. T., Wandeler, A. I., and Nel, L. H. Isolation of Lagos Bat Virus from Water Mongoose. *Emerging Infectious Diseases* . 2006a.
- Markotter, W., Randles, J., Rupprecht, C.E., Sabeta, C.T., Taylor, P.J., Wandeler, A.I., and Nel, L.H. (2006b). Lagos bat virus, South Africa. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 504-506.
- Mavrakis, M., Mehoulas, S., Real, E., Iseni, F., Blondel, D., Tordo, N., and Ruigrok, R.W. (2006). Rabies virus chaperone: identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. *Virology* *349*, 422-429.
- McGowan, J.J., Emerson, S.U., and Wagner, R.R. (1982). The plus-strand leader RNA of VSV inhibits DNA-dependent transcription of adenovirus and SV40 genes in a soluble whole-cell extract. *Cell* *28*, 325-333.
- Mebatsion, T., Konig, M., and Conzelmann, K.K. (1996). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* *84*, 941-951.
- Mebatsion, T., Weiland, F., and Conzelmann, K.K. (1999). Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *J Virol* *73*, 242-250.
- Meier, E., Kunz, G., Haller, O., and Arnheiter, H. (1990). Activity of rat Mx proteins against a rhabdovirus. *J Virol* *64*, 6263-6269.
- Morrison, T.B., Weis, J.J., and Wittwer, C.T. (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* *24*, 954-8, 960, 962.
- Muller, T., Selhorst, T., and Potzsch, C. (2005). Fox rabies in Germany - an update. *Euro. Surveill* *10*, 229-231.
- Murphy, F.A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A., and Summers, M. D. (1995) *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses. Sixth Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses.* New York: Springer Verlag.
- Poch, O., Blumberg, B.M., Bougueleret, L., and Tordo, N. (1990). Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* *71* ( Pt 5), 1153-1162.

- Rojjanaporn Pulmanusahakul, Jianwei Li, Matthias J. Schnell, and Bernhard Dietzschold. The Glycoprotein and the Matrix Protein of Rabies Virus Affect Pathogenicity by Regulating Viral Replication and Facilitating Cell-to-Cell Spread. *J Virol.* 2008 Mar;82(5):2330-8.
- Samuel, C.E. (2001). Antiviral actions of interferons. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 778-809, table.
- Salonen, A., Ahola, T., and Kaariainen, L. (2005). Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 285, 139-173.
- Sarkar, S.N. and Sen, G.C. (2004). Novel functions of proteins encoded by viral stress-inducible genes. *Pharmacol. Ther.* 103, 245-259.
- Schankin, C.J., Birnbaum, T., Linn, J., Bruning, R., Kretzschmar, H.A., Straube, A., and Krebs, B. (2005). A fatal encephalitis. *Lancet* 365, 358.
- Schnell, M.J., Mebatsion, T., and Conzelmann, K.K. (1994). Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J* 13, 4195-4203.
- Srinivasan, A., Burton, E.C., Kuehnert, M.J., Rupprecht, C., Sutker, W.L., Ksiazek, T.G., Paddock, C.D., Guarner, J., Shieh, W.J., Goldsmith, C., Hanlon, C.A., Zoretic, J., Staeheli, P. (1990). Interferon-induced proteins and the antiviral state. *Adv. Virus Res.* 38, 147-200.
- Tan, G.S., Preuss, M.A., Williams, J.C., Schnell, M.J. (2007). The dynein light chain 8 binding motif of rabies virus phosphoprotein promotes efficient viral transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 24;104(17):7229-34.
- Thoulouze, M.I., Lafage, M., Schachner, M., Hartmann, U., Cremer, H., and Lafon, M. (1998). The neural cell adhesion molecule is a receptor for rabies virus. *J Virol* 72, 7181-7190.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., and Keith, G. (1986a). Primary structure of leader RNA and nucleoprotein genes of the rabies genome: segmented homology with VSV. *Nucleic Acids Res.* 14, 2671-2683.
- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., and Rougeon, F. (1986b). Walking along the rabies genome: is the large G-L intergenic region a remnant gene? *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 3914-3918.
- Tordo, N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F. (1988). Completion of the rabies virus genome sequence determination: highly conserved domains among the L (polymerase) proteins of unsegmented negative-strand RNA viruses. *Virology.* Aug;165(2):565-76
- Tuffereau, C., Benejean, J., Alfonso, A.M., Flamand, A., and Fishman, M.C. (1998a). Neuronal cell surface molecules mediate specific binding to rabies virus glycoprotein expressed by a recombinant baculovirus on the surfaces of lepidopteran cells. *J Virol* 72, 1085-1091.

- Tuffereau, C., Benejean, J., Blondel, D., Kieffer, B., and Flamand, A. (1998b). Low-affinity nerve-growth factor receptor (P75<sup>NTR</sup>) can serve as a receptor for rabies virus. *EMBO J* 17, 7250-7259.
- Warrell, M.J. and Warrell, D.A. (2004). Rabies and other lyssavirus diseases. *Lancet* 363, 959-969.
- Weck, P.K. and Wagner, R.R. (1979). Transcription of vesicular stomatitis virus is required to shut off cellular RNA synthesis. *J Virol* 30, 410-413.
- Wertz, G.W., Perepelitsa, V.P., Ball, L.A. (1998). Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Mar 31;95(7):3501-6.
- Willoughby, R.E., Jr., Tieves, K.S., Hoffman, G.M., Ghanayem, N.S., Amlie-Lefond, C.M., Schwabe, M.J., Chusid, M.J., and Rupprecht, C.E. (2005). Survival after treatment of rabies with induction of coma. *N. Engl. J Med.* 352, 2508-2514.
- Wirblich, C., Tan, G.S., Papaneri, A., Godlewski, P.J., Orenstein, J.M., Harty, R.N., Schnell, M.J.. (2008). PPEY motif within the rabies virus (RV) matrix protein is essential for efficient virion release and RV pathogenicity. *J Virol*. 2008 Jul 30. [Epub ahead of print]
- Yoneyama, M., Suhara, W., and Fujita, T. (2002). Control of IRF-3 activation by phosphorylation. *J Interferon Cytokine Res.* 22, 73-76.
- Yoneyama, M., SuhFara, W., Fukuhara, Y., Fukuda, M., Nishida, E., and Fujita, T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *EMBO J* 17, 1087-1095.

## Danksagung

Meinen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Klaus Conzelmann, der es mir ermöglicht hat, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen. Außerdem auch vielen Dank für die Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Für die hervorragende Betreuung während der ganzen Zeit möchte ich mich bei Herrn Dr. Stefan Finke bedanken. Danke auch für die interessante Themenstellung und die stete Diskussionsbereitschaft in dieser Zeit.

Ganz besonderen Dank an das gesamte Tollwut Team für die tolle Arbeitsatmosphäre, die stete Hilfsbereitschaft und die lustigen Nutella-Pausen! Besonders möchte ich mich bei Nadin Hagendorf bedanken, die mit ihrem „Goldenen Touch“ so manches möglich gemacht hat, nicht zu vergessen ihre leckeren Kuchen! Vielen Dank auch an meine „Leidensgenossin“ Adriane Marschallek, für ihre aufmunternden Worte, wenn mal wieder was nicht klappen wollte.

Weiterhin danke ich meinem Freund Werner, der während der ganzen Zeit eine große Unterstützung für mich war.

## Lebenslauf

---

Christine Schnellhammer

Diplom Biologin

\*07.September 1976 in Bad Kreuznach

### Schulbildung

1983 – 1985	Grundschule Merxheim
1985 – 1987	Deutsche Schule, Wichita Falls, Texas, USA
1987 – 1989	Notre Dame Middle School, Wichita Falls, Texas, USA
1989 – 1991	Staatliche Gymnasium Bad Sobernheim
1991 – 1994	Gymnasium Kirn a.d. Nahe
1994 – 1997	Göttenbachgymnasium, Idar-Oberstein
06/1997	Abitur

### Hochschulbildung

1998	Beginn des Biologiestudiums an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
08/2000	Vordiplom in Biologie (Fächer:Zoologie, Botanik, Mikrobiologie, Genetik, Chemie, Mathematik)
2000-2002	Hauptstudium an der TU Kaiserslautern
08/2003	Diplom in Biologie (Fächer:Genetik, Zoologie, Biochemie)

### Tätigkeiten

07/2001-09/2001	Auslandspraktikum an der University of Strathclyde, Glasgow, U.K.
01/2007-10/2008	Clinical Research Associate, PPD Germany GmbH&Co.KG, München
seit 05/2009	Praxis-Kolleg Betriebswirtschaft und Management Zertifikatslehrgang der Hochschule München (ATV GmbH)

## Promotion

11/2003-12/2006 Beginn der Promotion am Max von Pettenkofer-Institut der LMU ^  
München bei Prof. Dr. Klaus K. Conzelmann

Thema: Funktionelle Analyse des Matrixproteins des Tollwutvirus

08/2009 Einreichen der Dissertation zum Dr. rer. hum. biol.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt habe. Ich habe mich außer der angegebenen Hilfsmittel keiner weiteren Hilfsmittel bedient und habe alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter der Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Ich habe bisher keine Dissertation eingereicht und keine Doktorprüfung abgelegt. Die hier vorliegende Dissertation ist nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung des akademischen Grades eingereicht worden.

München, den

(Christine Schnellhammer)