Dissertation der
Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
zur Erlangung des Dr. rer. nat.

Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 des Respiratorischen Synzytialvirus mit Proteinen der Wirtszelle

vorgelegt von
Michael Wolff
am 19.01.2004

Erstgutachter: Prof. Dr. Jörg Overmann
Zweitgutachter: PD Dr. Brian Salmons
Sondergutachter: Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann
Tag der mündlichen Prüfung: 07.07.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
1.1 Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) 3
1.2 Organisation, Transkription und Replikation des RSV Genoms 4
1.3 Virusproteine 5
1.3.1 Proteine der Virushülle 6
1.3.2 Proteine des RNP-Komplexes 8
1.3.3 Weitere Virusproteine 9
1.4 Replikationszyklus 10
1.5 Epidemiologie 11
1.6 Pathologie und Immunität 12
1.7 Eigenschaften der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 14
1.7.1 Rekombinante Systeme zur Analyse von RSV Proteinen 16
1.7.2 NS1 und NS2 Proteine sind Interferonantagonisten 17
1.7.3 Lokalisation der BRSV NS-Proteine nach Infektion 19
2. Zielsetzung der Arbeit 22
3. Material und Methoden 23
3.1 Material 23
3.1.1 Chemikalien 23
3.1.2 Verbrauchsmaterialien 23
3.1.3 Enzyme 23
3.1.4 Serologische Reagenzien 24
3.1.5 Polyklonales Peptidserum gegen MM-1 aus Kaninchen 24
3.1.6 Zellkulturmedien und Puffer 25
3.1.7 Sonstige Puffer 25
3.1.8 Kommerziell erhältliche „Kits“ 25
3.1.9 Weitere Reagenzien 26
3.1.10 Nukleinsäuren, Virusstämme, Bakterien, Hefen, Zellen 26
3.1.11 Zelllinien 33
3.2 Methoden 34
3.2.1 Arbeiten mit DNA 34
3.2.2 Arbeiten mit RNA 37
3.2.3 Arbeiten mit Proteinen 40
3.2.4 Zellkultur 43
3.2.5 Arbeiten mit Viren 46
3.2.6 Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*) 49
3.2.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli* 51
3.2.8 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) 54
3.2.9 Herstellung rekombinanter Plasmide 61
4. Ergebnisse 74

4.1 Protein-Protein Interaktion viraler NS-Proteine 74
4.1.1 Das Prinzip des “Yeast Two Hybrid” Systems (Y2H) 74
4.1.2 Etablierung des Y2H Systems für virale NS-Proteine 75
4.1.3 Interaktion der NS-Proteine in Hefezellen 77
4.2 Interaktion der NS-Proteine mit Proteinen der Wirtszelle 79
4.2.1 Identifizierung zellulärer Bindungspartner für BRSV NS1 79
4.2.2 Charakterisierung der Interaktion identifizierter zellulärer Proteine mit NS-Proteinen 83
4.2.3 Interaktion viraler NS-Proteine mit CDK4BP ($p34^{SEI-1}$, TRIP-Br1) 84
4.2.4 Interaktion viraler NS-Proteine mit β-COPI 88
4.2.5 Interaktion viraler NS-Proteine mit RanBP16 92
4.2.6 Interaktion viraler NS-Proteine mit MM-1 98
4.2.7 Einfluss der Zellteilung auf BRSV Wachstum 106
4.2.8 Interaktion viraler NS-Proteine mit der nukleären DEAD Box Helikase p68 107
4.3 Etablierung eines BRSV Expressionssystems zur Modulation zellulärer Proteinkonzentrationen nach Infektion 113
4.3.1 Expression des EGFP Gens durch BRSV 114
4.3.2 Expression der MM-1 RNAs durch BRSV 115
4.3.3 Modifizierte BRSV mit zusätzlichem p68 Gen 115
4.3.4 Reduktion zellulärer Proteinkonzentration durch RNA Interferenz (RNAi) 124
4.3.5 Reduktion von p68 in HeLa Zellen durch siRNA (pSUPER) 126
4.3.6 Einfluss der p68 Proteinkonzentration auf das Viruswachstum 126
5. Diskussion 128
5.1 Protein-Protein Interaktion der NS-Proteine 128
5.2 Interaktion der NS-Proteine mit Proteinen der Wirtszelle 130
5.2.1 Interaktion der NS-Proteine mit CDK4BP 131
5.2.2 Interaktion der NS-Proteine mit β-COPI 133
5.2.3 Interaktion der NS-Proteine mit RanBP16 136
5.2.4 Interaktion der RSV NS-Proteine mit MM-1 138
5.2.5 Interaktion der RSV NS-Proteine mit der DEAD Box Helikase p68 141
5.3 Einfluss zellulärer Proteine auf die BRSV Replikation 143
5.4 Bedeutung der Protein-Interaktionen für den BRSV Replikations- zyklus 146
5.5 Einfluss der NS1/NS2 Gengrenze auf die BRSV Replikation in MDBK Zellen 148
Zusammenfassung 149
Summary 151
Literaturverzeichnis 153
Veröffentlichungen 163
Lebenslauf 164
Danksagung 166
Anhang 168

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1 Darstellung des Respiratorischen Synzytialvirus (RSV). ... 3
Abb. 2 Schematische Darstellung der Replikation und Transkription des RSV Genoms. ... 5
Abb. 3 Vergleich der NS1- und NS2-Proteine der Pneumoviren HRSV, BRSV und PVM. ... 15
Abb. 4 BRSV NS1/2 vermittelte Interferonresistenz. ... 17
Abb. 5 BRSV Deletionsmutanten sind Interferon α/β sensitiv. ... 18
Abb. 6 Lokalisation der BRSV NS-Proteine im Nukleus und im Zytoplasma. ... 20
Abb. 7 Spezifische Lokalisation der NS-Proteine im Nukleus ... 21
Abb. 8 Klonierungsschema zur Klonierung modifizierter BRSV Antigenome. ... 68
Abb. 9 Prinzip des “Yeast Two Hybrid” Systems ... 75
Abb. 10 Synthese von NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren in Hefezellen ... 76
Abb. 11 Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen der BRSV NS-Proteine ... 77
Abb. 12 Mutationsanalyse der Interaktion mit BRSV NS1 ... 79
Abb. 13 Synthese von GST-Fusionproteinen in *E.coli.* ... 83
Abb. 14 Interaktion von CDK4BP mit NS-Proteinen unterschiedlicher Pneumoviren ... 85
Abb. 15 Interaktion von CDK4BP und BRSV NS1 Deletionsmutanten in Hefe ... 86
Abb. 16 BRSV NS-Protein Interaktion mit CDK4BP in BSR Zellen ... 87
Abb. 17 Ko-Lokalisation des BRSV NS1(HA) mit EGFP-CDK4BP im Nukleus infizierter BSRT7-5 Zellen ... 88
Abb. 18 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit β-COPI* ... 89
Abb. 19 Interaktion von β-COPI mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren ... 90
Abb. 20 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 (bNS1) und β-COPI* ... 91
Abb. 21 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch β-COPI ... 92
Abb. 22 Interaktion von BRSV NS-Proteinen mit RanBP16* ... 93
Abb. 23 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und RanBP16* ... 94
Abb. 24 Interaktion von RanBP16 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren ... 95
Abb. 25 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch RanBP16 ... 96
Abb. 26 Ko-Lokalisation von EGFP-RanBP16 mit BRSV NS1 nach Infektion in BSRT7-5 Zellen ... 96
Abb. 27 Nachweis des EGFP-NS1-N Fusionsproteins im Nukleus transfizierter BSR Zellen ... 98
Abb. 28 Interaktion des MM-1 Proteinfragments (MM-1*) mit BRSV NS-Proteinen in Hefe ... 99
Abb. 29 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und MM-1 ... 100
Abb. 30 Interaktion von MM-1 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren ... 101
Abb. 31 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch MM-1 ... 102
Abb. 32 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit MM-1 *in vitro* ... 102
Abb. 33 Unterschiedliche Lokalisationen von EGFP-MM-1 ... 103
Abb. 34 Nachweis von MM-1 mit polyklonalem Serum (K79) ... 104
Abb. 35 Videomikroskopische Einzelaufnahmen der EGFP-MM-1 BSRT7/5 Zelllinie ... 105
Abb. 36 Wachstum von BRSVwt und BRSVΔNS1/2 in Abhängigkeit von FKS ... 107
Abb. 37 Interaktion des p68 Proteinfragments (p68*) mit BRSV NS-Proteinen in Hefe ... 108
Abb. 38 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und p68* ... 109

Abb. 39 Interaktion von p68 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren 110
Abb. 40 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch p68 111
Abb. 41 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit p68 *in vitro* 112
Abb. 42 Ko-Lokalisation von NS1 und p68 in infizierten Zellen 113
Abb. 43 Charakterisierung des rBRSV-EGFP 114
Abb. 44 Expression zusätzlicher p68 RNA durch BRSV 116
Abb. 45 Schematische Darstellung modifizierter BRSV Genome mit deletierten NS1/NS2 Genen ... 117
Abb. 46 Charakterisierung modifizierter BRS-Viren 118
Abb. 47 Immunfluoreszenz Analyse der p68 Expression in infizierten Vero Zellen 120
Abb. 48 Wachstum modifizierter BRS-Viren in MDBK Zellen 121
Abb. 49 Wachstum modifizierter BRS-Viren in unterschiedlichen Zelllinien 123
Abb. 50 Wachstum von BRSV∆NS1/2 mit zusätzlichen p68 RNAs in verschiedenen Zelllinien 124
Abb. 51 Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) 125
Abb. 52 p68 siRNA Expression in HeLa Zellen 126
Abb. 53 Wachstum von Rabies Virus (SAD L16) und BRSVwt in HeLa- und HeLa Zellen mit reduzierter p68 Konzentration 127

Tab. 1 Nicht segmentierte Negativstrang RNA Viren (Ordnung *Mononegavirales*) 2
Tab. 2 Vertreter der *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* und ihre Wirtsorganismen 2
Tab. 3 DNA Sequenzhomologien identifizierter cDNAs 82

Abkürzungsverzeichnis

Ade	Adenin
Amp	Ampicillin
AMV	aviäres Myeloblastosisvirus
AP2	Adapter Protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
APV	aviäres Pneumovirus
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BALB/c	Inzucht-Mausstamm
Bis	N,N‘-Methylenbisacrylamid
bp	Basenpaar(e)
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
BSR T7/5	BHK-21 Subklon mit zusätzlichem Gen für T7 Polymerase
CD	cluster of differentiation
CDK4BP	CDK4 bindendes Protein
cDNA	komplementäre DNA
CPE	zytopathischer Effekt
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
ddH_2O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Bakterienstamm *Escherichia coli*
EBV	Epstein-Barr Virus
ECL	verstärkte Chemiluminiszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	verstärkt (enhanced) grün fluoreszierendes Protein
ER	endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii
EV11	Echovirus 11

ffu	focus bildende Einheiten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
G418	Geniticin
GAL4-AD	GAL4 Aktivierungsdomäne
GAL4-BD	GAL4 Bindungsdomäne
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCV	Hepatitis C
His	Histidin
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
IFN	Interferon
IgA	Immunglobulin A
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
IRES	interne Ribosomenbindungstelle
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani
Leu	Leucin
LiAc	Lithiumacetat
M	Molar
mA	Milliampere
MCS	Multiple Klonierungsstelle
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MM-1	c-Myc Modulator 1
MOI	Infektionsmultiplizität
ng	Nanogramm
NK Zellen	natürliche Killerzellen
NS	Nichtstruktur
nt	Nukleotid(e)
ONPG	ortho-Nitrophenyl β-D-Galaktopyranosid
ORF	offener Leserahmen
p.i.	nach Infektion
P/S	Penecillin/Ampicillin
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
ParV1	Parechovirus 1

PBS	„phosphate buffered saline“ (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PMSF	Phenylmethysulfonylfluorid
Pol III	Polymerase III
pSUPER	Supression endogener RNA
PTGS	post transcriptional gene silencing
PVM	Pneumovirus der Maus
RanBP16	Ran bindendes Protein 16
rBRSV	rekombinantes Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RSV	respiratorisches Synzytialvirus (humane und bovine Stämme)
RT	reverse Transkriptase
s	Sekunde
S.cerevisiae	Hefestamm *Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	kurze (small) interferierende RNA
T4 PNK	T4 Polynukleotid Kinase
TAE	Tris Acetat EDTA
TEMED	N,N,N‘,N‘-Tetramethylendiamin
Tricin	N-[Tris(hydroxymethyl)methyl]glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
wt	Wildtyp
x-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid
YPD	Hefeextrakt-Pepton-Glukose Medium
YPDA	Hefeextrakt-Pepton-Glukose Medium + Adenin
β-COPI	β-Coatomer Protein

1. Einleitung

Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) gehört zur Familie der *Paramyxoviridae,* Unterfamilie *Pneumovirinae*, innerhalb der Ordnung *Mononegavirales*. Bei Viren dieser Ordnung handelt es sich um umhüllte Viren mit einem nicht-segmentierten RNA Genom negativer Polarität. In der Ordnung *Mononegavirales* werden die Virusfamilien *Rhabdoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* und *Bornaviridae* zusammengefasst (Tab. 1). Charakteristische Vertreter der *Paramyxoviridae* sind Erreger bedeutender Krankheiten bei Menschen und Tieren. Die *Paramyxoviridae* unterteilen sich weiter in die Unterfamilien *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* (Tab. 2). Die Unterfamilie der *Pneumovirinae* wird weiterhin in die Gattungen Pneumovirus und Metapneumovirus unterteilt. Im Gegensatz zu den Metapneumoviren und der gesamten Unterfamilie der *Paramyxovirinae* kodieren die Pneumoviren zwei Nichtstrukturproteine (NS1/NS2) am 3´ terminalen Ende des RNA Genoms. Metapneumo- und Pneumoviren unterscheiden sich außerdem durch die Anordnung der Gene auf dem jeweiligem Genom. Der bekannteste Vertreter der Pneumoviren ist das Humane Respiratorische Synzytialvirus (HRSV), das durch Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt übertragen wird und sich im Verlauf der Infektion bis in den unteren respiratorischen Trakt ausbreiten kann. In der Folge kommt es zu Atemwegserkrankungen vor allem bei Säuglingen und Kleinkindern im ersten Lebensjahr (Bronchiolitis, Lungenentzündung, Pseudokrupp). Allein in den USA werden jährlich 100.000 Erkrankungen durch HRSV bei Säuglingen bzw. Kleinkindern unter einem Jahr registriert (95, 140). Ältere und immungeschwächte Personen sind ebenfalls von Krankheiten im Zusammenhang mit HRSV Infektionen betroffen. Das Respiratorische Synzytialvirus des Rindes (Bovines RSV, BRSV) verursacht bei Kälbern im ersten Lebensjahr Erkrankungen der Atemwege mit ähnlichen Symptomen. Weitere Vertreter der Pneumoviren infizieren Schafe (Ovines Respiratorisches Synzytialvirus, ORSV) und Mäuse (Pneumovirus der Maus, PVM). Zur Gattung *Metapneumovirus* zählen das Avian Pneumovirus (APV) und ein kürzlich identifiziertes humanpathogenes Metapneumovirus (150).

Familie	Unterfamilie	Gattung	
Rhabdoviridae		Lyssavirus	Rabies Virus
		Vesiculovirus	Vesicular Stomatitis Virus (VSV)
		Ephemerovirus	Bovine Ephemeral Virus
		Nucleorhabdovirus	Sonchus Yellow Net Virus
		Cytorhabdovirus	Lettuce Necrotic Yellow Virus
Paramyxoviridae	*Paramyxovirinae*	Respirovirus	Sendai Virus
			Parainfluenza Virus Typ 1 und 3
		Rubulavirus	Mumps Virus
			Parainfluenza Virus Typ 2 und 4
		Morbillivirus	Masern Virus
	Pneumovirinae	Pneumovirus	**Respiratorisches Synzytialvirus**
Filoviridae			Marburgvirus
			Ebolavirus
Bornaviridae			Borna Disease Virus

Tab. 1 Nicht segmentierte Negativstrang RNA Viren (Ordnung *Mononegavirales*)

Unterfamilie	Gattung	Wirtsorganismus	
		Mensch	Tier
Paramyxovirinae	Respirovirus	Parainfluenza Virus Typ 1 und 3	Sendai Virus
	Rubulavirus	Mumps Virus	Newcastle Disease Virus
		Parainfluenza Virus Typ 2 und 4	
	Morbillivirus	Masern Virus	Canine Distemper Virus
			Rinderpest Virus
Pneumovirinae	Pneumovirus	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus (HRSV)	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus (BRSV)
			Pneumovirus der Maus (PVM)
	Metapneumovirus	Humanes Metapneumovirus	Avian Pneumovirus (APV)

Tab. 2 Vertreter der *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* und ihre Wirtsorganismen

Da Pneumoviren keine dauerhafte Immunität beim jeweiligen Wirt hervorrufen und die Krankheit durch Medikamente wie Ribavirin nicht wirksam therapiert werden kann, wird intensiv an der Entwicklung effektiver Impfstoffe geforscht. Für die HRSV Immunprophylaxe wird zur Zeit lediglich ein monoklonaler Antikörper (Palivizumab) eingesetzt (69).

1.1 Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV)

Das Respiratorische Synzytialvirus (*Pneumovirus*) ist von einer Lipidhülle umgeben und hat eine Größe von ungefähr 150-300 nm (12, 21). Die Lipidhülle ist ein Derivat der Zellmembran infizierter Wirtszellen, in die bei der Freisetzung der Virionen das virale Genom und virale Proteine inkorporiert werden. Das RSV Genom besteht aus einem einzelsträngigen RNA Molekül, das mit viralen Proteinen verpackt als linksgängiger, helikaler Ribonukleoprotein Komplex (RNP Komplex) im Viruspartikel vorliegt. Die Infektion der Wirtszelle erfolgt durch Verschmelzung der Hüllmembran mit der Zellmembran und anschließender Freisetzung des RNP Komplexes in das Zytoplasma der Zelle. Der RNP Komplex ist die Matrize für Replikation und Transkription. Die Replikation des RSV Genoms und die Transkription der subgenomischen RNAs erfolgt ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen. Hierfür ist die Viruspolymerase (L) verantwortlich, die mit dem RNP Komplex assoziiert vorliegt. Die Transkription der Virusgene erfolgt nach einem für Negativstrang RNA-Viren typischen Stop-Start-Mechanismus. Die Freisetzung der gereiften Viruspartikel aus der Wirtszelle erfolgt durch Knospung an der Zellmembran, wobei die Infektion benachbarter Zellen auch durch Zell-Zell-Verschmelzungen erfolgen kann.

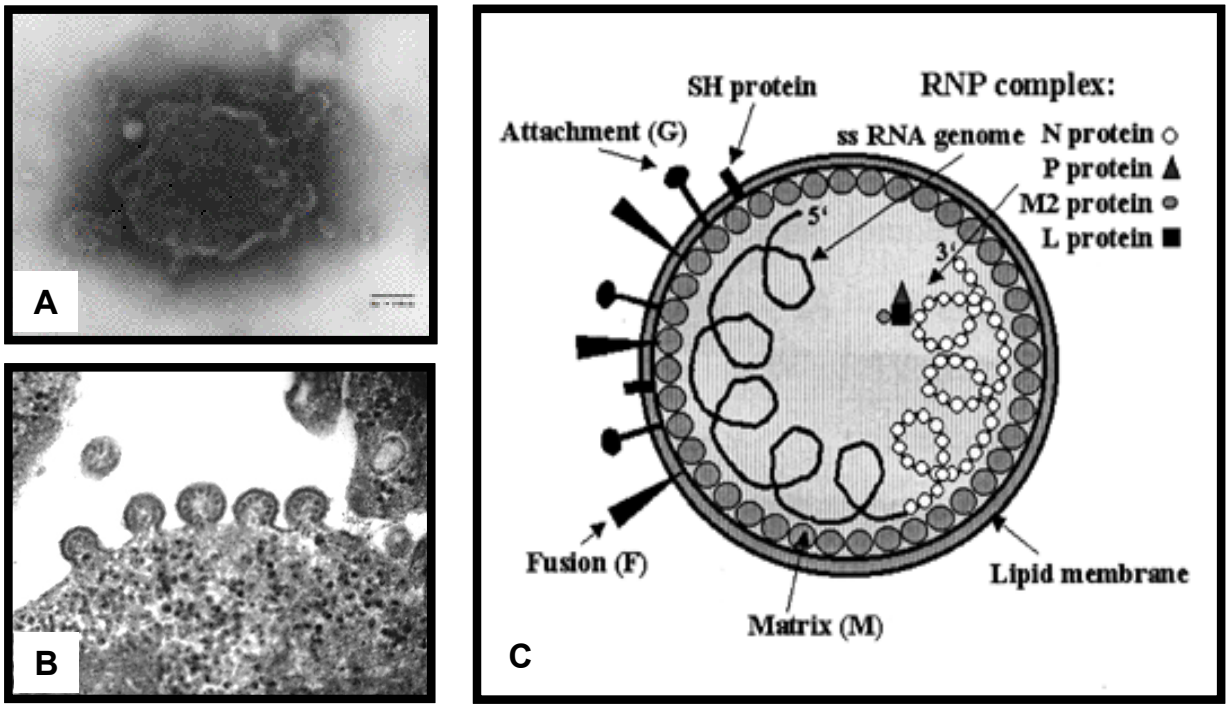


Abb. 1 Darstellung des Respiratorischen Synzytialvirus (RSV).

(A) Das Viruspartikel hat eine unregelmäßige Gestalt und eine Größe von 150-300 nm in der elektronenmikroskopischen Aufnahme (Ref. s. (126)). (B) Die Freisetzung der Viren aus der infizierten

Zelle erfolgt durch Knospung an der Zellmembran (Ref. s. (126)). (C) Die schematische Darstellung zeigt den Aufbau des Viruspartikels (Ref. s. (114)). Die genomische einzelsträngige RNA liegt assoziiert mit dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P), dem Elongationsfaktor (M2-1) und der viralen Polymerase (L) als RNP Komplex in der Virushülle vor. Das Matrixprotein M assoziiert mit der Lipidhülle und verbindet den RNP Komplex mit der Virushülle. Das Fusionsprotein (F), das Glykoprotein (G) und ein kleines hydrophobes Protein unbekannter Funktion (SH) sind in die Virushülle integriert.

1.2 Organisation, Transkription und Replikation des RSV Genoms

Das nicht segmentierte, negativ einzelsträngige RNA Genom der RS Viren hat eine Größe von ca. 15.200 Nukleotiden und kodiert für 10 subgenomische RNAs. Zusammen mit den Proteinen N, P, M2-1 und L bildet es den RNase-resistenten RNP Komplex, der als Matrize für die Transkription und Replikation dient. Sowohl genomische RNA als auch die positivsträngige Antigenom-RNA, die als Matrize für neue genomische RNA Moleküle dient, liegt in der infizierten Zelle als RNP Komplex vor. Die Enden der antigenomischen und genomischen RNA sind nicht polyadenyliert bzw. mit einem 7-Methylguanosin-Rest versehen. Antigenomische RNA liegt in infizierten Zellen in 10 bis 20-fach geringeren Konzentrationen als genomische RNA vor. Da die beiden RNAs in gereinigten Virionen in diesem gleichen Verhältnis nachgewiesen wurden, wird davon ausgegangen, dass die RNA Stränge nicht selektiv in Virionen verpackt werden.

RSV kodiert für 10 subgenomische, monocistronische RNAs (3´ NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-L 5´), die durch die virale Polymerase L am 5´-Ende durch 7-Methylguanosin modifiziert und am 3´Ende polyadenyliert werden. Die Transkripte der viralen mRNA besitzen mit Ausnahme des M2 Gens jeweils einen offenen Leserahmen (ORF), die M2 mRNA dagegen zwei Leserahmen (M2-1, M2-2). Am 3´ terminalen Ende der RSV-Gene befinden sich kurze *cis*-aktive Sequenzen, die die Transkription initiieren (Startsignal). Am 5´ terminalen Ende befinden sich ebenfalls kurze Signalsequenzen, die die Termination der Transkription (Stopsignal) und die Polyadenylierung vermitteln. Die ersten neun Gene sind weiterhin durch nicht-kodierende Sequenzen voneinander getrennt, die in ihrer Länge zwischen 1-56 Nukleotiden variieren (29, 87). Die M2 und L Gene besitzen dagegen überlappende Stop/Start Signale (68 nt), so dass die Transkription der M2 mRNA innerhalb des L Gens terminiert wird. Wie bei allen Vertretern der Ordnung *Mononegavirales* werden Promotor-proximale Gene höher exprimiert als weiter stromabwärts liegende Gene, weshalb die viralen mRNAs in infizierten Zellen in entsprechend abnehmender

Konzentrationen vorliegen (Abb. 2). Hierbei handelt es sich vermutlich um den Hauptmechanismus der Regulation der Transkription (29).

Bei der Replikation des RSV Genoms werden die Stop-Start-Signale von der Polymerase L ignoriert und es wird ein RNA-Antigenom positiver Polarität synthetisiert. Das Antigenom dient als Matrize zur Synthese neuer genomischer Stränge, wobei ausschließlich vom Antigenompromotor am 3´ terminalen Ende ausgehend repliziert wird. Die neu synthetisierten genomischen RNA Moleküle werden zusammen mit den viralen Proteinen N, P, M2-1 und L als RNP-Komplexe zur Transkription oder in Viruspartikel verpackt.

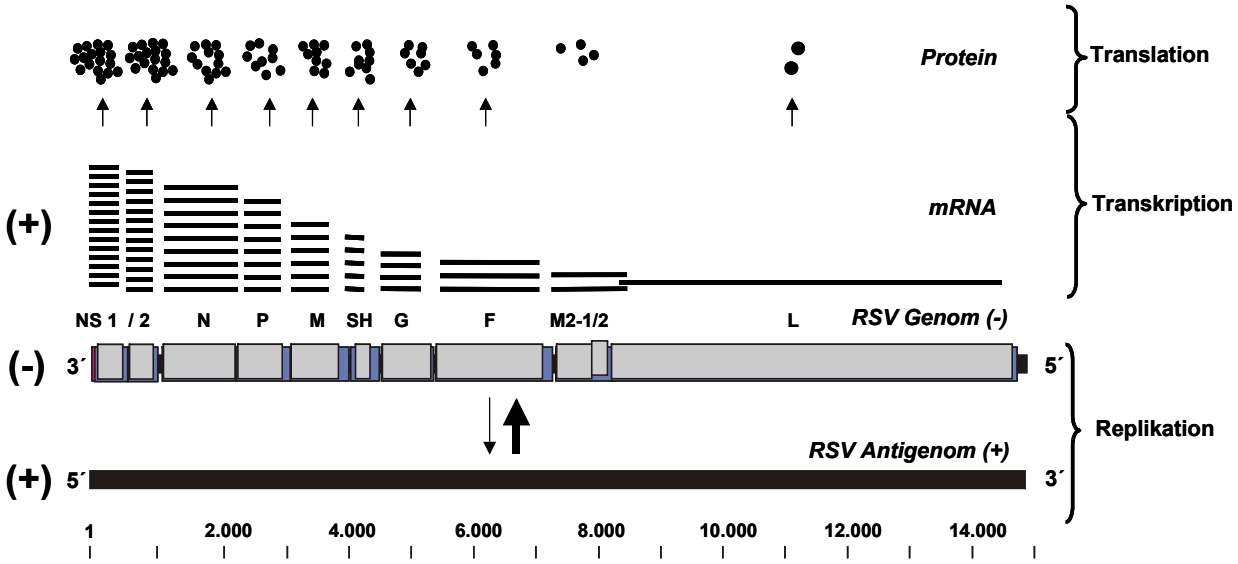


Abb. 2 Schematische Darstellung der Replikation und Transkription des RSV Genoms.

Die Transkription der subgenomischen viralen RNAs erfolgt nach einem Stop-Start-Mechanismus vom 3´ terminalen Ende des Genoms aus, wobei die Konzentration der synthetisierten Transkripte vom 3´ zum 5´ terminalen Ende abnimmt (polarer Transkriptionsgradient). Die Konzentration der viralen Proteine in RSV infizierten Zellen wird hierdurch entsprechend beeinflusst. Die virale Polymerase (L) synthetisiert bei der Replikation zunächst ein Antigenom positiver Polarität, das zusammen mit viralen Proteinen den RNP Komplex bildet und als Matrize für weitere genomische RNA Stränge dient.

1.3 Virusproteine

RSV kodiert 11 Proteine mit unterschiedlichen Funktionen innerhalb des Replikationszyklus. Generell werden Proteine unterschieden, die entweder am Aufbau des RNP-Komplexes beteiligt oder in die Virushülle eingelagert sind. Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 sind dagegen vermutlich weder am Aufbau des RNP Komplexes beteiligt noch in die Virushülle eingelagert. Bei dem Nukleoprotein N, dem Phosphoprotein P, dem Elongationsfaktor M2-1 und der Viruspolymerase L handelt es sich um Proteine, die direkt zum Aufbau des helikalen RNP-Komplexes

beitragen bzw. assoziiert mit diesem Komplex vorliegen. Das Matrixprotein bindet die Lipidmembran und interagiert ebenfalls mit dem RNP-Komplex. Das Glykoprotein G, das Fusionsprotein F und ein kleines hydrophobes Protein SH unbekannter Funktion sind in die Virushülle eingelagert und vermitteln den Kontakt zur Wirtszelle sowie die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran (Abb. 1C).

1.3.1 Proteine der Virushülle

1.3.1.1 Fusionsprotein F

Bei dem RSV F Protein handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein, das sowohl die Fusion der Viruspartikel mit der Wirtszellmembran als auch die Fusion benachbarter Zellen (Synzytienbildung) nach Infektion vermittelt (88). Das prozessierte Protein liegt wahrscheinlich als Trimer in der Virushülle vor und hat eine Molekülgröße von ca. 70 kDa (25, 122). RSV F wird zunächst als F0 Vorläuferprotein synthetisiert und durch die zelluläre Protease Furin im Verlauf des Transports durch den Golgi Apparat in die Untereinheiten F1 und F2 gespalten. Die Spaltung erfolgt an zwei benachbarten Furin-Erkennungssequenzen, wodurch das F Protein seine volle Fusionsaktivität erlangt (56, 164). Die F1 und F2 Domänen des RSV F sind durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden (110). Das Fusionsprotein enthält weiterhin mehrere Konsensussequenzen für N-Glykosylierungen, die in ihrer Anzahl bei verschiedenen Pneumoviren variieren können (32). Neben der Fusionsaktivität ist F auch verantwortlich für die speziesspezifische Adsorption und den Eintritt des Virus in die jeweilige Wirtszelle. Die speziesspezifische Infektion der Wirtszellen wird durch die F2 Domäne der RS Viren vermittelt (135).

1.3.1.2 Glykoprotein G

Das RSV G-Protein ist das hauptsächliche Adsorptionsprotein und vermittelt den primären Kontakt zur Wirtszellmembran durch Bindung an Glykosaminglykane wie beispielsweise Heparansulfate. Antikörper gegen G verhindern die Adsorption des Virus an HeLa Zellen, wogegen die Adsorption des Virus mit Antikörpern gegen F nicht verhindert werden kann (101, 151). Das G-Protein ist im Gegensatz zu RSV F ein Typ II Transmembranprotein, das als Homotrimer oder Homotetramer in die Virushülle integriert ist. Obwohl RSV G eine kalkulierte Molekülgröße von ca. 32 kDa

hat, migriert es in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei 90 kDa. Dieses Migrationsverhalten ist auf den auf den hohen Grad der O- und N-Glykosylierung zurückzuführen (158). RSV G besitzt keine Sequenzhomologien zu Adsorptionsproteinen anderer Vertreter der *Paramyxoviridae* und keine Hämaglutinations- bzw. Neuramidase-Aktivität (128). Interessanterweise ist das RSV G Protein für die Vermehrung und Infektion der Viren in Zellkultur nicht essentiell. Allerdings wurde ein verstärktes Wachstum der Viren in Abhängigkeit von G beobachtet (91). RSV Mutanten mit deletierten G-Genen infizieren verschiedene Zelllinien unterschiedlich effizient. Diese Viren wachsen auf Vero-, jedoch nicht auf Hep2 Zellen, weshalb ein alternativer Adsorptionsmechanismus bei verschiedenen Zelltypen diskutiert wird (29).

1.3.1.3 SH Protein

Das SH Protein ist ein kleines integrales Membranprotein der Virushülle unbekannter Funktion. SH liegt in der infizierten Zelle in verschieden Formen vor. Die hauptsächliche Form dieses Protein ist die nicht glykosylierte 7,5 kDa große S_0 Form. Weitere Formen sind SH_g (13-15 kDa) und SH_p (21-60 kDa) mit N-verknüpften Seitenketten. Durch interne Initiation wird die nicht glykosylierte Form SH_t (4,8 kDa) translatiert. Alle SH Formen liegen als Oligomere, wahrscheinlich Pentamere vor (33).

Rekombinante Viren, die keine SH Proteine synthetisieren (RSVΔSH), vermehren sich uneingeschränkt in Zellkultur (23). Darüber hinaus wird die Synzytienbildung nicht beeinflusst und RSVΔSH Viren sind lediglich im oberen respiratorischen Trakt schwach attenuiert (159). Dem SH-Protein kann demnach bisher keine eindeutige Funktion für die Virusvermehrung *in vitro* und *in vivo* zugeordnet werden.

1.3.2 Proteine des RNP-Komplexes

1.3.2.1 Nukleoprotein N

Das Nukleoprotein N hat eine Molekülgröße von ca. 45 kDa und ist kleiner als die N-Proteine anderer Paramyxoviren. Sequenzvergleiche mit anderen N-Proteinen innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* zeigten drei konservierte Bereiche, die partiell eine gemeinsame Sekundärstruktur erkennen lassen (10). RSV N bindet genomische und antigenomische RNA und bildet ein RNase-resistentes Nukleokapsid.

1.3.2.2 Phosphoprotein P

Das Phosphoprotein P hat eine kalkulierte Molekülgröße von ca. 33 kDa und liegt in phosphorylierter Form in infizierten Zellen vor. Dieses Protein ist ebenfalls kleiner als P Proteine anderer Paramyxoviren. Zusammen mit dem N Protein bildet P stabile Komplexe in der Zelle und ko-immunpräzipitiert mit N. Für die Verpackung von Minigenomen sind N-P Komplexe ausreichend (5, 50). Darüber hinaus enthält RSV P zahlreiche Konsensusmotive zur Phosphorylierung durch die zelluläre Casein Kinase II, wobei weitere Kinasen vermutet werden, die P phosphorylieren. Hierdurch wird P aktiviert und fungiert als Polymerase Kofaktor (8).

1.3.2.3 Polymerase L

Die Viruspolymerase L hat eine Molekülgröße von ca. 250 kDa und ist den Viruspolymerasen anderer Paramyxoviren sehr ähnlich. Sequenzvergleiche der Polymerasen von Paramyxo- und Rhabdoviren zeigten 6 konservierte Regionen, die funktionelle Sequenzmotive anderer RNA/DNA Polymerasen repräsentieren (142). RSV L ist nur in Verbindung mit den Kofaktoren N und P funktionell. Neben Transkription und Replikation katalysiert L auch die Anheftung des 7-Methylguanosin Restes und die Polyadenlylierung der mRNA.

1.3.2.4 Elongationsfaktor M2-1

M2-1 wird vom 5´ proximalen ORF des M2 Gens translatiert und hat eine Molekülgröße von ca. 22 kDa (31). Innerhalb der *Paramyxoviridae* gibt es kein homologes Protein mit entsprechender Funktion. M2-1 ist für das Virus *in vitro* und *in vivo* essentiell und kolokalisiert in der infizierten Zelle mit N und P. Bei der Transkription erhöht M2-1 die Synthese von mRNAs gesamter Länge beträchtlich (49) und kann daher auch als Kofaktor für die Viruspolymerase L angesehen werden.

1.3.3 Weitere Virusproteine

1.3.3.1 Matrixprotein M

Das Matrixprotein M bindet die Virushülle im Inneren des Virions und interagiert mit dem RNP Komplex. RSV M ist hat eine Molekülgröße von ca. 29 kDa und ist nicht glykosyliert. Die Membranbindung wird durch den hydrophoben C-terminalen Anteil des Proteins vermittelt. Bei der Freisetzung der Virionen aus der infizierten Zelle vermittelt M den Kontakt zwischen RNP Komplex und Wirtszellmembran und trägt somit entscheidend zur Verpackung der Viren bei.

1.3.3.2 Regulatorischer Faktor M2-2

Die M2 mRNA kodiert zwei sich überlappende Leserahmen M2-1 und M2-2. M2-2 wird durch eine Leserasterverschiebung während der Translation initiiert und ist in geringen Mengen in der infizierten Zelle nachweisbar. Während M2-1 an den RNP Komplex bindet und an der Transkription der mRNAs beteiligt ist, wird für M2-2 (ca. 11 kDa) eine regulatorische Funktion bei der Synthese des Antigenoms diskutiert. Deletionsviren (RSVΔM2-2) zeigten verminderte Replikation und erhöhte Transkription in Zellkultur (11). M2-2 ist für das Viruswachstum nicht essentiell, allerdings sind ΔM2-2 Viren *in vitro* und *in vivo* attenuiert (86).

1.3.3.3 Nichtstrukturproteine NS1 und NS2

Die Proteine NS1 und NS2 werden lediglich in geringen Mengen in gereinigten Virionen nachgewiesen, weshalb man davon ausgeht, dass es sich um Nichtstrukturproteine handelt. Mutierte RS-Viren mit NS1- oder NS2- deletierten Genen sind attenuiert, replizieren aber *in vitro* und *in vivo* (22, 86, 146, 147). Da NS1 im Minigenom-System Transkription und RNA Replikation inhibiert, wird eine regulatorische Funktion des NS1 diskutiert (5). NS1 und NS2 vermitteln darüber hinaus Resistenz gegen die Typ I Interferone α und β (134) und verhindern die Expression der Interferon-Gene in RSV infizierten Zellen (18).

1.4 Replikationszyklus

Zu Beginn der Infektion der Wirtszelle durch RSV bindet das Glykoprotein G an extrazelluläre Glykosaminoglykane. In einem zweiten Schritt adsorbieren F und SH an die Membran der Wirtszelle. Obwohl G und SH für eine effiziente Infektion *in vitro* nicht benötigt werden, ist G zumindest für eine produktive Verbreitung und Vermehrung der Viren nach Infektion *in vivo* verantwortlich und ist daher das hauptsächliche Adsorptionsprotein. Nach Bindung an die Zellmembran vermittelt F die Fusion der Virushülle mit der Wirtszellmembran, was zur Freisetzung des RNP-Komplexes in das Zytoplasma der Wirtszelle führt. Die Transkription der Virusgene und die Replikation des RSV Genoms erfolgt ausschließlich im Zytoplasma infizierter Wirtszellen. Die Viruspolymerase L synthetisiert vom 3´ proximalen Ende des Genoms mRNAs, die an den jeweiligen konservierten Signalsequenzen initiiert und anschließend mit der Cap-Struktur modifiziert und polyadenyliert wird. Die Reinitiation der Transkription stromabwärts liegender Gene verläuft durch Dissoziation der Polymerase an den Gengrenzen zunehmend ineffizienter, wodurch es zu einer abnehmenden Konzentration entsprechender Transkripte in infizierten Zellen kommt (polarer Transkriptionsgradient). Dabei ist die Distanz der Gene zum 3´ terminalen Promotor letztlich entscheidend für die jeweilige mRNA- bzw. Proteinkonzentration in infizierten Zellen (97). Erst nach Synthese und Anreicherung der viralen Proteine beginnt die Replikation des Genoms. Hierbei werden die Gengrenzen von der Polymerase L ignoriert und eine exakt komplementäre antigenomische RNA synthetisiert. Die antigenomische RNA wird vermutlich ko-

transkriptionell mit viralen Proteinen verpackt. Entscheidend für die Synthese von Genom und Antigenom ist die gleichzeitige Synthese der viralen Proteine N und P. Hierbei wird ein Mechanismus diskutiert, bei dem RNA synthetisiert und gleichzeitig mit N/P Komplexen verpackt wird. Welche weiteren Faktoren beim Umschalten von der Transkriptions- in die Replikationsfunktion der Polymerase L beteiligt sind, ist bislang weitgehend ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die intrazelluläre Konzentration von M2-2 entscheidend ist (11).

Die neu synthetisierten genomischen RNA Moleküle werden mit den Proteinen N und P zum helikalen RNP Komplex verpackt und die Oberflächenproteine F, G und SH nach der Proteinsynthese in die Wirtszellmembran integriert. Das Matrixprotein M vermittelt die spezifische Bindung des RNP-Komplexes an die Zellmembran, an der die Knospung der reifen Virionen stattfindet. Durch diese Protein-Protein Wechselwirkung des M Proteins mit dem RNP-Komplex bzw. mit der Zellmembran wird der RNP-Komplex in reifende Virionen verpackt. Dabei interagiert M vermutlich mit dem zytoplasmatischen Anteil des Glykoprotein G und ermöglicht bei der Knospung der Virionen die Verbindung zwischen dem RNP Komplex und dem Oberflächenprotein. Bei der Vermehrung von RS-Viren *in vitro* ist das G und SH Protein für eine effiziente Virusreifung nicht nötig, da auch RSV∆SH/∆G Viren in Zellkultur replizieren. Somit scheint F das einzige benötigte Protein für eine Vermehrung der Viren *in vitro* zu sein. Weiterhin wurde gezeigt, dass eine intakte Aktinfilamentstruktur für die Replikation der RS-Viren entscheidend ist, was auf eine Rolle des Zytoskeletts bei der Replikation bzw. Freisetzung der Viren schließen lässt (24). Bei der Freisetzung neuer Virionen vermittelt das in die Membran integrierte F Protein die Fusion mit Membranen benachbarter Zellen, so dass es in der Folge zur Ausbildung charakteristischer Synzytien kommt.

1.5 Epidemiologie

RSV ist der bedeutendste Erreger von Krankheiten des unteren Respirationstraktes bei Säuglingen und Kleinkindern weltweit. 85 % der Krankheitsfälle von Bronchiolitis und 20 % der Lungenentzündungen gehen auf RSV-Infektionen zurück. RSV infiziert Säuglinge in den ersten Lebensmonaten, obwohl maternale Antikörper vorhanden sind. Die Infektion bzw. Reinfektion wird am häufigsten im ersten Lebensjahr festgestellt. Reinfektionen bei Erwachsenen ist ebenfalls häufig, wenn eine starke

Exposition des Virus vorangegangen ist. RSV ist weltweit vertreten und tritt in jahreszeitlicher Abhängigkeit unterschiedlich häufig auf. RSV Epidemien können bis zu fünf Monate andauern, wobei 40 % der Krankheitsfälle in der Mitte dieses Zeitraums registriert werden. In den Frühjahrsmonaten gehen die RSV-Infektionen zurück und brechen im Winter erneut aus. Bisher ist nicht geklärt, warum RSV Infektionen in jahreszeitlicher Abhängigkeit auftreten. In den Vereinigten Staaten wird RSV für 73.400 bis 126.300 registrierte Krankheitsfälle von Bronchiolitis und Lungenentzündungen pro Jahr bei Kindern unter einem Jahr verantwortlich gemacht. Diese Erkrankungen treten verstärkt bei Kleinkindern im Alter zwischen sechs Wochen und neun Monaten auf, was im Zusammenhang mit dem abnehmenden Titer maternaler Antikörper steht (140). Frühgeburten und Kleinkinder sowie Personen mit chronischer Herz- und Lungensymptomatik, Immundefizienz, Immunsuppression und familiär bedingten allergischen Erkrankungen haben ein besonders erhöhtes Risiko der RSV Infektion. Trotzdem werden 75 % aller RSV Infektionen bei Personen festgestellt, die zuvor gesund waren (152). Todesfälle treten im Zusammenhang mit RSV Infektionen in industrialisierten Ländern allerdings selten auf.

1.6 Pathologie und Immunität

RSV wird durch Tröpfcheninfektion oder direkten Kontakt übertragen. Zur Aufnahme des Virus kommt es vor allem über die Nasenschleimhäute bzw. Tränenflüssigkeit, die Aufnahme über die Mundschleimhaut ist eher selten. Zum Ausbruch der Krankheit kommt es vier bis fünf Tage nach Infektion (90). Nach einer Inkubationszeit von 2-8 Tagen repliziert RSV in den Nasenepithelzellen und breitet sich ein bis drei Tage später in die unteren Bereiche der Lungenflügel aus. In der Folge kommt es zur Nekrose bronchialer Epithelzellen sowie zur Zerstörung des Flimmerepithels (116). Dabei wandern Makrophagen, Plasmazellen und Lymphozyten in die Mukosa ein. Weiterhin kommt es zur Ausbildung von Lungenödemen und verstärkter Schleimbildung, die die Bronchiolen und Alveolen in ihrer Funktion erheblich einschränken. Immunfluoreszenzen des Lungengewebes wiesen Infektionen des bronchealen und alveolaren Gewebes mit zahlreichen Zellfusionen nach (116). Neben den direkten zytopathologischen Effekten tragen lokale Entzündungen zur RSV Pathogenese bei, wodurch es ebenfalls zur Zerstörung des Lungen- und

Flimmerepithels kommt. Die Regenerierung der Lunge nach RSV Infektion dauert vier bis acht Wochen und wird von verstärktem Husten und eingeschränkten Lungenfunktionen begleitet.

Ungewöhnlicherweise infiziert RSV den Wirt in Anwesenheit von maternalen Antikörpern und ist zudem in der Lage, Personen jedes Alters erfolgreich neu zu infizieren. Somit wird durch eine erstmalige RSV Infektion keine dauerhafte und effiziente Immunität vermittelt, was die Entwicklung von Impfstoffen zusätzlich erschwert. Bei Patienten, die erneut an RSV erkranken, verläuft die Symptomatik allerdings weniger schwerwiegend, was auf den Aufbau einer prinzipiell wirksamen Immunreaktion gegen RSV schließen lässt.

Die adaptive Immunantwort spielt bei der Heilung der Krankheit und Aufbau eines gewissen Schutzes gegen das Virus eine hauptsächliche Rolle (39). Das Immunsystem immungeschwächter Kinder und Patienten mit Knochenmarks-Transplantationen können die Ausbreitung des Virus nach Infektion nicht erfolgreich kontrollieren, weshalb es bei diesen Patienten zu besonders schweren Verläufen der Infektion mit Todesfolge kommen kann.

Im Mausmodell mit BALB/c Mäusen wurden NK-Zellen in den ersten Tagen der RSV Infektion gebildet, gefolgt von zytotoxischen T-Zellen (CTL) und sezernierten Antikörpern. NK und CTLs kontrollieren die Virusinfektion durch Ausschüttungen von IFN-γ (29). Für die Eliminierung des Virus sind sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen verantwortlich (61). Studien mit Mäusen zeigten, dass B Lymphozyten für die Kontrolle der Virusreplikation nach Reinfektion von Bedeutung sind (60). Bei der Immunisierung von Mäusen mit rekombinanten Vaccinia Viren, die RSV Proteine überexprimierten, zeigte sich ebenfalls, dass nur die Virusproteine F und G die Synthese von neutralisierenden Antikörpern induzieren und somit einen eingeschränkten Schutz gegen das Virus bei erneuter Infektion vermitteln (35). Antikörper, die aus Patientenseren gewonnen wurden, sind nicht in der Lage, Viruswachstum *in vitro* effizient zu inhibieren, was weiterhin auf eine unvollständige Immunität gegen RSV hindeutet (111). Mehrfachinfektion mit RSV führen zu einem erhöhten Titer an IgA Antikörpern. Experimente hierzu zeigten, dass die Immunität gegen die RSV Infektion mit der Konzentration an neutralisierenden IgA-Antikörpern in der Nasenschleimhaut und nicht mit der Konzentration an Antikörpern im Serum korreliert (29). Für die vollständige Eliminierung des Virus sind zumindest $CD8^+$ CTLs notwendig. Allerdings wurde weiterhin gezeigt, dass RSV spezifische CTLs eine

bedeutende Rolle bei der Pathogenese der RSV Infektion spielen. Stimulierte, RSV-spezifische $CD8^+$ CTLs eliminierten das Virus aus persistent infizierten Mäusen, die zuvor gamma-bestrahlt wurden. Ebenso konnten $CD8^+$ CTLs die Eliminierung des Virus aus Lungen immunkompetenter Mäuse deutlich beschleunigen, wobei allerdings Lungenentzündungen auftraten. Diese Beobachtungen zeigten, dass ein Gleichgewicht zwischen protektiven und pathogenen Effekten der $CD8^+$ CTLs existiert (29).

1.7 Eigenschaften der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2

Die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 (früher 1C und 1B) werden in äußerst geringen Konzentrationen im Virion nachgewiesen, weshalb man davon ausgehen kann, dass es sich um Nichtstrukturproteine handelt (81). NS-Proteine werden nur von den vier Mitgliedern HRSV, BRSV, PVM und ORSV der Unterfamilie *Pneumovirinae* kodiert (Tab. 2). Durch die 3´ terminale Lage der Gene werden sie hoch exprimiert (Abb. 2). Die Nukleotidsequenzen der NS-Gene verschiedener Vertreter der Pneumoviren wurden mittlerweile bestimmt. Die NS1- und NS2 Gene des HRSV der Subgruppe A sind jeweils 528 bzw. 499 Nukleotide lang und besitzen einen offenen Leserahmen von 139 bzw. 124 Aminosäuren (29). Die NS1- und NS2 Gene des BRSV (Stamm A51908) sind jeweils 524 bzw. 489 Nukleotide lang und kodieren Polypeptide von 136 bzw. 124 Aminosäuren (123). Vergleiche der Aminosäuresequenz der NS1-Proteine des HRSV und BRSV ergaben eine Sequenzhomologie von 70 % (Abb. 3). Die Homologie der Aminosäuresequenz der NS2-Proteine beider RSV Spezies beträgt 84 %. Die NS1- und NS2-Gene des PVM sind 410 bzw. 571 Nukleotide lang und kodieren jeweils Proteine von 113 bzw. 156 Aminosäuren (27). Im Vergleich zu NS-Proteinen von HRSV und BRSV weisen die PVM Proteine eine geringe Sequenzhomologie auf (Abb. 3). Bisher wurden keine Sequenzhomologien zu bekannten zellulären bzw. viralen Proteinen in Datenbanken gefunden, weshalb keine Voraussagen über mögliche Funktionen der Proteine gemacht werden kann. Zudem wurden keine funktionellen Domänen identifiziert, die auf eine mögliche Funktion hindeuten könnten. RNA- und DNA- Bindungen dieser Proteine sind aufgrund der schwachen Ladung unwahrscheinlich.

Aufgrund der hohen Expression der mRNAs wird davon ausgegangen, dass NS1 und NS2 in der infizierten Zelle in hohen Konzentrationen vorliegen (34). Die

Generierung von monoklonalen Antikörpern gegen die NS-Proteine war jedoch bislang erfolglos und Patientenseren zeigten ebenfalls keine Reaktion mit diesen Antigenen. Daher geht man von davon aus, dass diese Proteine keine wesentliche Immunantwort beim jeweiligen Wirt hervorrufen (48). Vaccinia Viren, die die NS Gene rekombinant in Mäusen überexprimierten, vermittelten keinen Schutz gegen eine anschließende RSV Infektion (35). Die mit Vaccinia/NS2 Viren infizierten Mäuse bildeten ebenfalls keine T Helferzellen (118).

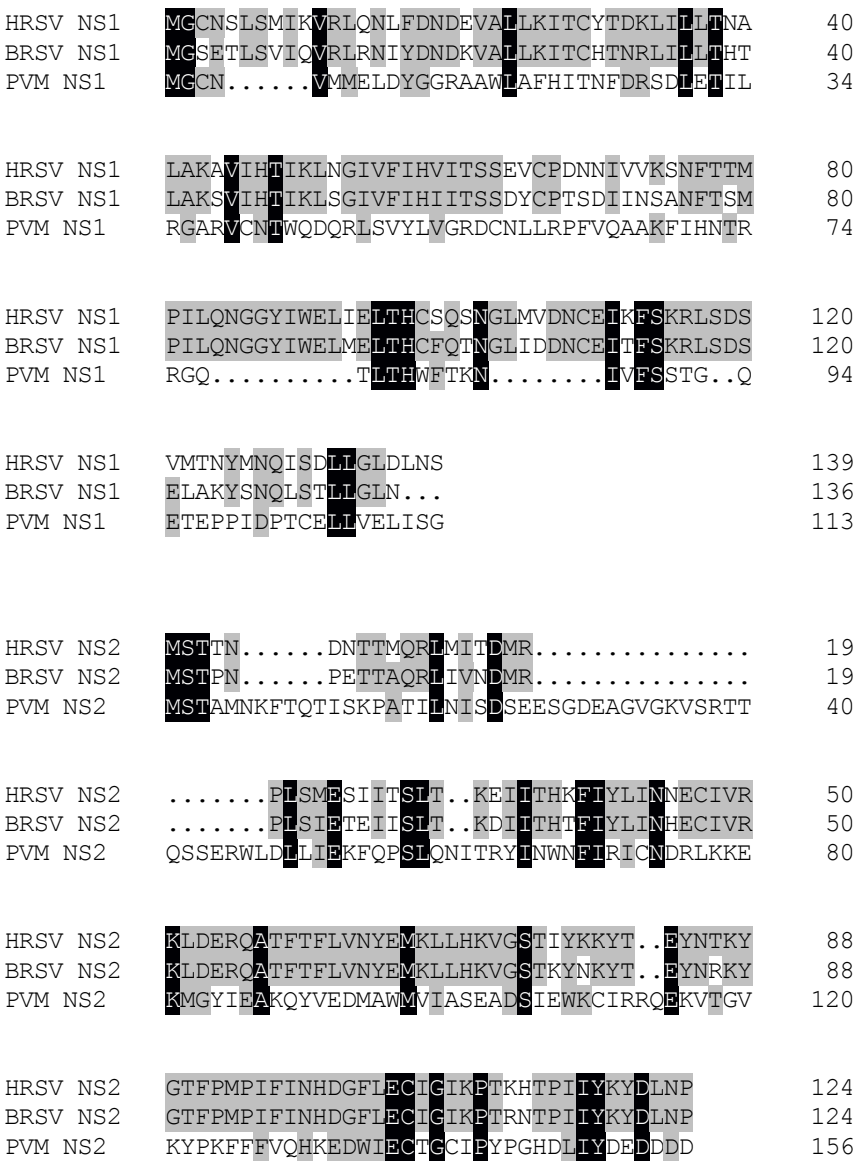


Abb. 3 Vergleich der NS1- und NS2-Proteine der Pneumoviren HRSV, BRSV und PVM.

Konservierte Aminosäuren der Pneumovirus Proteine sind schwarz markiert. PVM NS-Proteine besitzen geringe Sequenzhomologien im Vergleich zu NS-Proteinen des HRSV und BRSV (Sequenzvergleich mit DNAMAN, Version 4.20).

NS-Proteine werden in der frühen Phase der Infektion synthetisiert und bilden Multimere in infizierten Zellen (48). NS1 bindet das Matrixprotein M, während NS2 hingegen mit keinem viralen Protein ko-immunpräzipitiert (48). Im Gegensatz zu NS1 ist das NS2 Protein recht instabil mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten. Für NS1 wird angenommen, dass es eine Funktion bei der Transkription und Replikation übernimmt. Wertz und Kollegen zeigten erstmals, dass die NS-Proteine des RSV für die Replikation von Minigenomen *in vitro* nicht benötigt werden (163), was eine Funktion der Proteine *in vivo* wahrscheinlich macht. Weitere Analysen mit Minigenomen und komplementierten cDNAs zeigten eine Inhibition der Transkription und Replikation, auch wenn NS1 nur schwach in transfizierten Zellen exprimiert wurde (5).

1.7.1 Rekombinante Systeme zur Analyse von RSV Proteinen

Mittlerweile können RS-Viren auf Basis von cDNA hergestellt werden (21). Diese Technologie erlaubt die Manipulation der Virusgenome, sodass die Funktion einzelner Gene und deren Genprodukte studiert werden kann. Zunächst werden bei der Herstellung rekombinanter Viren RNP-Proteine von cDNA transkribiert und synthetisiert. Die simultane Expression der antigenomischen RNA ermöglicht die Rekonstitution des RNP Komplexes. Hierdurch wird der Infektionszyklus gestartet, was erstmals für das Tollwutvirus gezeigt wurde (137). Während für die Herstellung von Rhabdoviren und den meisten Paramyxoviren neben der genomischen RNA die Proteine N, P und L ausreichend sind, wird bei RSV zusätzlich der Antiterminationsfaktor M2-1 eingesetzt (21, 30). Mit diesem rekombinanten System wurden RSV Deletionsmutanten erzeugt und es konnte gezeigt werden, dass die Proteine NS1, NS2, SH, G und M2-2 für die Replikation der Viren *in vitro* und *in vivo* nicht essentiell sind (21, 86, 147). BRS-Viren mit deletiertem NS2 Gen sind *in vitro* leicht attenuiert. Dennoch fördert NS2 effiziente Replikation (21). Ähnliche Ergebnisse wurden mit entsprechenden HRSV Deletionsviren erhalten, die *in vitro* attenuiert sind und kleinere Plaques in Zellkultur verursachen. HRSV mit deletiertem NS1- bzw. NS2-Gen sind zudem in Schimpansen attenuiert (147).

1.7.2 NS1 und NS2 Proteine sind Interferonantagonisten

Um die Funktion der NS-Proteine näher analysieren zu können, wurden in unserem Labor verschiedene BRSV NS Deletionsmutanten hergestellt und die Eigenschaften dieser Viren auf verschiedenen Zelllinien untersucht. Dabei wurden Deletionsmutanten konstruiert, denen entweder NS1- bzw. NS2- oder beide NS-Gene fehlten. Es zeigte sich, dass alle Mutanten auf BSRT7/5 Zellen schwach attenuiert waren (Abb. 4A). Diese Ergebnisse ließen sich in Vero Zellen reproduzieren. Dies legt nahe, dass die NS-Proteine zur BRSV Replikation beitragen. Im Gegensatz dazu ist die Replikation der Viren in der Rinderzelllinie MDBK wesentlich stärker eingeschränkt (Abb. 4B, (134)).

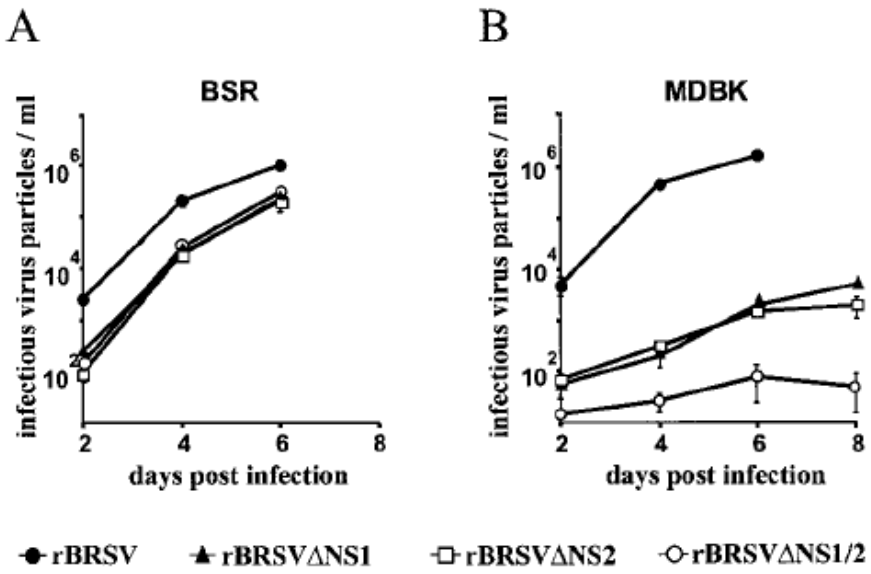


Abb. 4 BRSV NS1/2 vermittelte Interferonresistenz.

(A) BRSV NS-Deletionsmutanten sind in BSRT7/5 Zellen schwach attenuiert und in MDBK Zellen stark attenuiert (B). Die Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 jeweils mit rBRSV, rBRSV ΔNS1, rBRSV ΔNS2 und rBRSV ΔNS1/2 infiziert und die Virustiter im Abstand von 2 Tagen bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente (134).

Aufgrund der unterschiedlichen Wachstumseigenschaften des Virus in unterschiedlichen Zelllinien, wurde ein zellulärer Faktor postuliert, der für diesen Effekt verantwortlich ist und von BSRT7/5 bzw. Vero Zellen nicht synthetisiert wird. Um zu zeigen, dass ein löslicher Faktor für die Attenuierung der Viren verantwortlich ist, wurden zunächst MDBK- und Vero Zellen, durch eine Membran getrennt, ko-kultiviert. Überstände von nicht infizierten MDBK Zellen beeinflussten dabei das

Wachstum der Wildtyp-Viren und der Virusmutanten in Vero Zellen nicht. MDBK Zellen, die mit Deletionsmutanten infiziert wurden, verursachten jedoch auch eine Attenuierung der Deletionsviren in Vero Zellen, was zeigte, dass ein löslicher Faktor, der die Membran passiert, von MDBK Zellen sezerniert wird. Die Replikation aller Deletionsmutanten wurde durch diesen Faktor eingeschränkt. Wildtyp-Viren hingegen replizierten uneingeschränkt in Vero Zellen. Nachdem Vero Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen den Interferon-α Rezeptor präinkubiert wurden, konnte die Attenuierung der BRSV Mutanten nicht mehr nachgewiesen werden. Somit wurde Interferon α/β (IFN α/β) als zellulärer Faktor identifiziert, der für die eingeschränkte Replikation der BRSV Mutanten in MDBK Zellen verantwortlich ist. NS1 und NS2 vermitteln daher gemeinsam die Resistenz gegen IFN α/β, da nur der Wildtyp in der Lage ist, die antivirale Aktivität zu unterbinden. Vero Zellen haben deletierte IFN α/β Gene, so dass der antivirale Status in diesen Zellen nicht aufgebaut werden kann und somit das Wachstum der Deletionsviren in diesen Zellen erklärt (134).

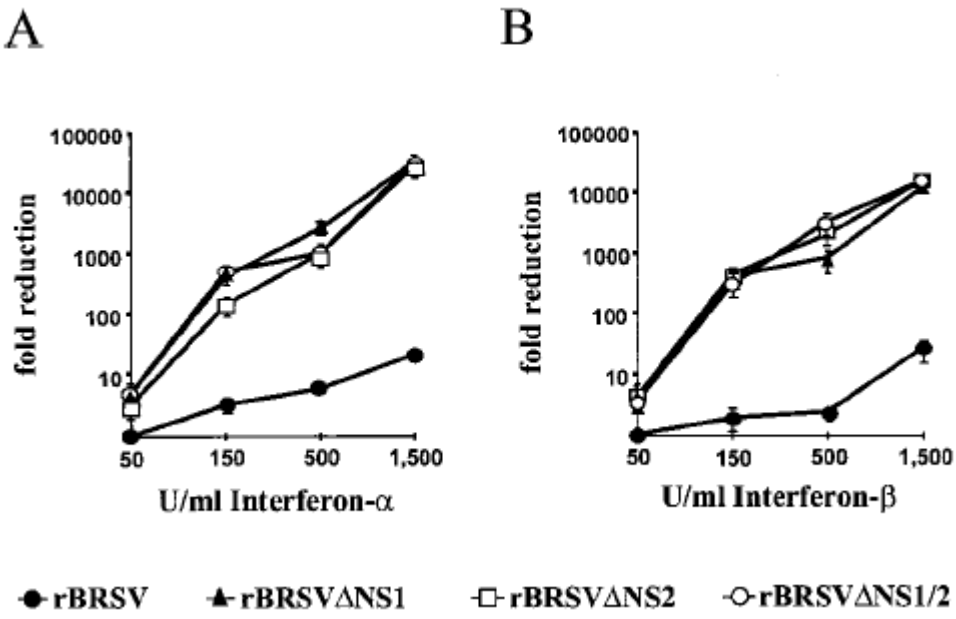


Abb. 5 BRSV Deletionsmutanten sind Interferon α/β sensitiv.

Vero Zellen wurden mit einer MOI von 0,1 mit rBRSV, rBRSV ΔNS1, rBRSV ΔNS2 und rBRSV ΔNS1/2 infiziert. Die Zellen wurden zudem mit den angegeben Mengen Interferon α (A) bzw. Interferon β (B) inkubiert und die Virustiter nach 3 Tagen bestimmt. Die Reduktion der Virustiter ist jeweils als x-fache Reduktion angegeben. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente (134).

Vero Zellen, die mit rekombinantem Interferon stimuliert werden, können den antiviralen Status aufbauen. Hier zeigte sich eine Attenuierung der Deletionsviren in Abhängigkeit von der jeweiligen Menge zugegebenem Interferon α/β (Abb. 5). Wildtyp-Viren zeigten dagegen nur eine geringe Attenuierung bei Inkubation der Vero Zellen mit 1.500 U/ml Interferon. Durch diese Studien wurde den NS-Proteinen erstmals eine definierte Funktion zugewiesen und zugleich der kooperative Mechanismus der beiden NS-Proteine erkannt. NS-Proteine vermitteln somit die effiziente Replikation der Viren, indem Interferon-induzierte, antivirale Aktivitäten der Wirtszelle außer Kraft gesetzt werden.

Um nachzuweisen, dass nur die NS-Proteine ohne Beteiligung anderer RSV-Proteine vor IFN α/β schützen, wurden Tollwutviren hergestellt, die zusätzlich NS-Proteine kodieren. Tollwutviren sind deutlich attenuiert in Zellen, die zuvor mit IFN α/β präinkubiert wurden. Die rekombinanten Tollwutviren mit NS-Genen des BRSV zeigten dagegen deutliche Resistenz gegen IFN α/β (134).

Weitere Untersuchungen in unserem Labor zeigten, dass die NS-Proteine anderer Pneumoviren (HRSV, PVM) in gleicher Weise die Interferonresistenz vermitteln, was einen generellen Mechanismus der Proteine vermuten lässt. Zudem tragen NS-Proteine zelltypspezifisch zur Replikation der Viren bei. Hierzu wurden chimäre BRS-Viren hergestellt, die HRSV und PVM NS-Proteine kodieren. Diese Viren vermehren sich angepasst an den jeweiligen Wirtszelltyp. BRSV mit NS-Genen des HRSV repliziert wesentlich besser in humanen Zellen als in Rinderzellen, während BRSV mit homologen NS-Proteinen effizienter in Rinderzellen repliziert (17). Wie kürzlich gezeigt wurde, verhindern die NS-Proteine auch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors IRF-3, sodass in Virus-infizierten Zellen die Induktion von Interferon unterbunden wird (18, 149). Somit sind die NS-Proteine mindestens bi-funktionale Interferon Antagonisten, da sie die Induktion und die Wirkung von Interferon verhindern.

1.7.3 Lokalisation der BRSV NS-Proteine nach Infektion

Die weitere Charakterisierung der NS-Proteine in unserem Labor zeigte eine unerwartete Lokalisation in RSV-infizierten Zellen. Mit Hilfe von Viren, die Epitop-markierte NS-Proteine kodieren (BRSV NS1 HA und BRSV NS2 FLAG), konnten die Proteine durch Immunfluoreszenz in infizierten Zellen nachgewiesen werden

(Abb. 6). Obwohl RSV ausschließlich im Zytoplasma repliziert, sind die NS-Proteine nach Infektion sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert (B. Bossert, Dissertation 2002).

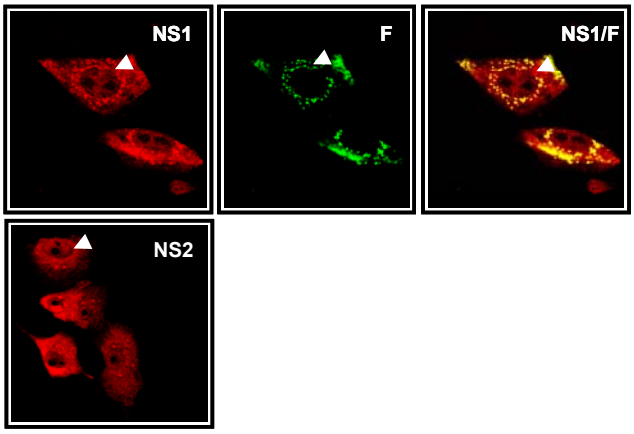


Abb. 6 Lokalisation der BRSV NS-Proteine im Nukleus und im Zytoplasma.

MDBK Zellen wurden mit BRSV NS1(HA) und BRSV NS2(FLAG) infiziert (MOI = 0,1) und die Präparate mit entsprechenden Antikörpern inkubiert (Y11, M2 Verdünnung 1:100). Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Inkubation mit sekundären Cy3 gekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:100). Als zusätzliche Infektionskontrolle wurde BRSV F mit αF und sekundären FITC Antikörpern nachgewiesen. BRSV F ist ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert. Weiße Pfeilspitzen deuten den Nukleus an.

1.7.3.1 Spezifischer Nachweis der NS-Proteine im Zellkern

Weitere Untersuchungen ließen vermuten, dass die NS-Proteine spezifisch zelluläre Proteine im Nukleus binden. Viele kleine Proteine, wie z.B. EGFP diffundieren unspezifisch in den Zellkern. Um einen Hinweis darauf zu erhalten, ob die nukleäre Lokalisation der NS-Proteine bedeutsam für NS-spezifische Funktionen ist, wurden Experimente zur Retention der NS-Proteine durchgeführt. Durch eine milde Detergenzbehandlung wurde EGFP, nicht jedoch die NS-Proteine, aus dem Zellkern eluiert. Ein weiteres Kernprotein, p68, wurde als Positivkontrolle nachgewiesen und nach entsprechender Präinkubation mit Detergenz ebenfalls spezifisch im Zellkern zurückgehalten. Die Retention der NS-Proteine ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf spezifische Interaktion der NS-Proteine an nukleäre Proteine zurückzuführen und weist daher auf spezifische Funktionen der NS-Proteine in diesem zellulären Kompartiment hin.

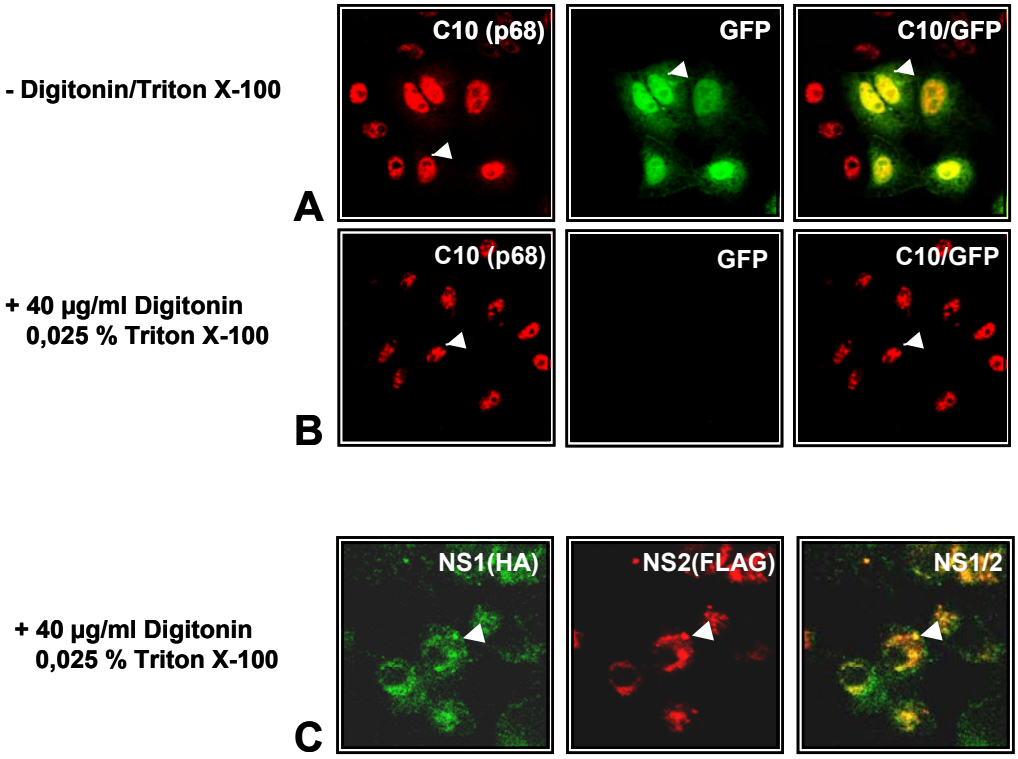


Abb. 7 Spezifische Lokalisation der NS-Proteine im Nukleus

(A) BSR Zellen wurden mit 2 µg EGFP-C3 cDNA transfiziert und zeigen EGFP-Fluoreszenz im Zellkern und im Zytoplasma. (B) p68 wurde mit spezifischen Antikörpern (C10, Verdünnung 1:1000 und Cy3, Verdünnung 1:100) nachgewiesen und zeigt ebenfalls Fluoreszenz im Zellkern. Nach Präinkubation mit den angegebenen Konzentrationen Detergenz, kann heterologes EGFP in der Fluoreszenz nicht mehr nachgewiesen werden, p68 wird dagegen im Zellkern zurückgehalten. (C) Präparate infizierter BSR Zellen (MOI = 0,1) wurden jeweils mit angegebenen Konzentrationen Detergenz inkubiert und NS-Proteine mit Y11 und M2 Antikörpern (Verdünnung jeweils 1:100) und sekundären FITC bzw. Cy3 gekoppelten Antikörpern (Verdünnung 1:100) nachgewiesen. Die NS-Proteine werden hierbei ebenfalls im Zellkern nachgewiesen.

2. Zielsetzung der Arbeit

Innerhalb der Virusfamilie *Paramyxoviridae* werden NS-Proteine nur von Vertretern der Pneumoviren kodiert. Die Deletionen der NS-Gene führten zu Viren mit einem deutlich attenuierten Phänotyp in der Interferon α/β produzierenden Zelllinie MDBK. Weitere Analysen zeigten, dass NS1 und NS2 nur kooperativ die Interferonresistenz von RSV vermitteln können. Allerdings wurde auch in Zellen mit deletierten Interferon α/β Genen eine Attenuierung der Viren beobachtet. Dies lässt auf weitere Funktionen der Proteine im viralen Replikationszyklus schließen.

Der Vergleich der NS-Proteinsequenzen mit denen anderer viraler oder zellulärer Proteine zeigte keine Homologie bzw. konservierte Domänen, die Hinweise auf weitere mögliche Funktionen geben könnten. Bislang wurden zudem keine zellulären Interaktionspartner für die NS-Proteine beschrieben.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte daher die Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der NS-Proteine mit Proteinen der Wirtszelle sein. Vorarbeiten zu dieser Arbeit zeigten, dass durch biochemische Methoden wie Radio-Koimmunpräzipitation keine zellulären Proteine als mögliche Interaktionspartner für NS-Proteine identifiziert werden konnten. Daher sollte in dieser Arbeit ein alternatives System etabliert werden. Mit dem wesentlich sensitiveren genetischen Selektionssystem „Yeast Two Hybrid“ sollten aus einer cDNA Expressionsbibliothek aus Lungengewebe cDNA Klone isoliert werden, die mögliche Interaktionspartner kodieren.

Um den Einfluss der zellulären Proteine auf den viralen Replikationszyklus zu untersuchen, sollten virale Vektoren konstruiert und Viren hergestellt werden, die kodierende Sequenzen der zellulären Proteine (i) überexprimieren und (ii) komplementäre RNA zur Reduktion der Proteinkonzentration in infizierten Zellen exprimieren.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (α-^{32}P-CTP, α-^{32}P-UTP, ^{35}S-Promix, Ficoll, Protein A Sepharose), Dynal (Protein G Dynabeads), Boehringer Mannheim/Roche (Proteaseinhibitoren Complete™, DTT), Fluka (NP40, Tricin), ICN Biochemicals Inc. (APS), Life Technologies/Invitrogen (Agarose), Merck ($CaCl_2$, EDTA, Ethidiumbromid, KCl, $MgSO_4$, NaAc, NaCl, NH_4Cl, Orange G, Paraformaldehyd, Phenolrot, Triton X-100), Riedel-de-Häen (Ethanol, NaOH), Roth (β-Merkaptoethanol, Aceton, Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1), DMSO, Glyzerin, Harnstoff, HCl, Methanol, SDS, Tris-HCl, Tween-20, Polyethylenglykol 4000), Sigma-Aldrich (ATP, Bromphenolblau, TEMED, Glutathion, L-Histidin, Adeninhemisulfat, L-Leucin, L-Tryptophan) und Clontech (SD-Medium, DO-Aminosäuremix, „Carrier-DNA“) bezogen.

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (ECL-Hyperfilme), Eppendorf (Eppendorfhütchen, PCR-Reaktionsgefäße), Falcon (Polystyrolröhrchen), Kodak (Röntgenfilme), Millipore (Sterilfilter), Nunc (Gewebekulturflaschen), Roth („Blottingpapier“), Schleicher & Schuell (Nitrozellulose-membran) und Stratagene (Nylonmembran) bezogen.

3.1.3 Enzyme

Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Restriktionsendonukleasen, T4-DNA Ligase, *Klenow*-Polymerase), Boehringer Mannheim/Roche (Shrimp alkalische Phosphatase) und Stratagene (*Pfu*-Turbo DNA-Polymerase, AMV Reverse Transkriptase) bezogen.

3.1.4 Serologische Reagenzien

Kaninchen α-HA (Y11), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus α-FLAG (M2), monoklonal	Sigma
Kaninchen α-E2F-1 (C20), polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus α-GST (B14), monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Maus α-p68 (C10), monoklonal	H. Stahl, Saarbrücken
α-Kaninchen-IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova
α-Kaninchen-IgG, FITC konjugiert	Dianova
α-Maus-IgG, Peroxidase konjugiert	Dianova
α-Maus-IgG, FITC konjugiert	Dianova
Kaninchen α-Aktin, polyklonal	Sigma
Maus α-RSV-F Protein	Serotec
Ziege α-RSV Serum, polyklonal	Biogenesis
Kaninchen α-NS2 (α-IC/C), polyklonal	J.A. Melero, Madrid
Maus α-c-myc (9E10), monoklonal	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Kaninchen α-GFP, polyklonal	Molecular Probes

3.1.5 Polyklonales Peptidserum gegen MM-1 aus Kaninchen

Zur Analyse des MM-1 Proteins wurde eine Peptidsynthese in Auftrag gegeben und ein Peptid aus der MM-1 Sequenz synthetisiert (DFFKRKIDFLTKKQMEK). 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. Im Abstand von 7 Tagen wurde anschließend zweimal immunisiert, bevor das Serum aus den Tieren gewonnen wurde. Die Präimmunseren und Immunseren K76 und M79 wurden von der Firma Metabion bezogen und in unserem Labor charakterisiert.

3.1.6 Zellkulturmedien und Puffer

Zellkulturmedien, Puffer und Zusätze wurden von der Firma Life Technologies bzw. Invitrogen bezogen.

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 Ca^{2+} und Mg^{2+})
Trypsin-EDTA (0,25 % Trypsin, 1 mM Na-EDTA)
Fötales Kälberserum (FKS)
OPTIMEM 1

3.1.7 Sonstige Puffer

Anodenpuffer:	200 mM Tris-HCl pH [8,9]
Kathodenpuffer:	100 mM Tris-HCl pH [8,25]; 100 mM Tricin; 0,1 % (w/v) SDS
TAE-Puffer:	400 mM Tris-HCOOH pH [7,8]; 5 mM NaAc; 5 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCl pH [7,5]; 5 mM EDTA

Weitere Puffer sind bei der jeweiligen Methode angegeben.

3.1.8 Kommerziell erhältliche „Kits"

Folgende kommerziell erhältliche Kits wurden für diese Arbeit verwendet: Nick Translation Kit, *in vitro* Transcription Kit (Amersham Pharmacia); Nucleobond AX100, Nucleobond AX500 (Macherey-Nagel); Western Blot Chemoluminescence Reagent *Plus* (NEN), QIAEXII Gel Extraction Kit, QiaQuick Gel Extraction Kit, QiaQuick Nucleotide Removal Kit, QiaQuick PCR Purification Kit, RNeasy Mini Kit (Qiagen); Mammalian Transfection Kit (Stratagene); *In vitro* Translation Kit TNT® (Promega).

3.1.9 Weitere Reagenzien

1 kb DNA-Leiter (LifeTechnologies), Agar (Difco), Bactotrypton (Difco), FuGene6 (Roche), Hefeextrakt (Difco), Magermilch-Pulver (Merck), vorgefärbter Proteinstandard (LifeTechnologies, Biorad), Proteinstandard ^{14}C markiert (BRL), RNasin (Pharmacia), dNTPs (NEB), Interferon α (PBL), Histogel (Linaris Biological Products).

3.1.10 Nukleinsäuren, Virusstämme, Bakterien, Hefen, Zellen

3.1.10.1 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Inc. und Metabion bezogen. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen und kursiv. Oligonukleotide sind jeweils in 5´-3´ Orientierung angegeben. Nukleotide in der kodierenden Sequenz, die durch PCR verändert wurden, sind mit * gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz
bNS1 *Eco*RI 3´	GCAATA*GAATTC*CTAATTCAGACCAAGAAG
bNS1 *Nco*I 5´	CGAATA*CCATGG*GCAGTGAAACATTGAG
bNS2 *Bsp*HI	GCAATA*TCATGA*GCACCCCAAATCCCGAA
bNS2 *Eco*RI 3´	GCAATA*GAATTC*CTATGGATTTAAATCATA
EGFP 3´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*TTACTCGTCCATGCCGAGAGTGAT CCC
EGFP 5´ *Not*I	AAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCCTCTCTTCTTTCT ACAGAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG
hNS1 *Eco*RI 3´	ATTGA*GAATTC*TTATGGATTAAGATCAAA
hNS1 *Nco*I 5´	ATTGA*CCATGG*GCAGCAATTCATT
hNS2 *Eco*RI 3´	ATTGA*GAATTC*TTATGGATTGAGATCATA
hNS2 *Nco*I 5´	ATTGA*CCATGG*ACACAACCCACA
MM-1 antisense 3´ *Not*I	AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCT ACAGAAATCAGGCCTTAGCAGTAGCC
MM-1 antisense 5´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*GATGGGGGTTGATGTCATGACTGT AG
MM-1 c-myc 5´ *Nco*I´	TTAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGG

	AGGACCTGG*C*GGGGGTTGATGTCATGACTGTA
MM-1 EGFPC3 5´*Xho*I	AATA*CTCGAG*G*C*GGGGGTTGATGTCATGACTGT A
MM-1 pGADT7 3´ *Bam*HI	TATA*GGATCC*TCAGGCCTAGCAGTAGCCTG
MM-1 pGADT7 5´ *Nde*I	TATA*CATATG*GCGGTTGATGTCATGACT
MM-1 pTIT 3´ *Pst*I	TATATGACGTCGCAAAACTCTCAGGCC
MM-1 pTIT 5´ *Nco*I	TACA*CCATGG*GGGGTTGATGTCATGACTGTAGTC GGCCTTCCCAACATGGCGCAGTCTATTAACATCA CGGAGCTGAATCTGCCGC
MM-1 sense 3´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*TCAGGCCTTAGCAGTAGCCTG
mNS1 *Eco*RI 3´	AATGATATC*GAATTC*TTAAGCGTAATCTGGTACAT CATAAGGATAACC
mNS1 *Nco*I 5´	CGAATA*CCATGG*GCTGTATGATGAGT
mNS2 *Afl*III 5´	CGAATA*ACATGT*CCACAGCTATGAACAAG
mNS2 *Eco*RI 3´	AATGATATC*GAATTC*TCATTTATCGTGATCATCTTT ATAGTCATCATCATCCTCATC
N Fusion *EcoRI* 5´	GCAATA*GAATTC*G*C*GGCTCTTAGCAAGGTCAAA CTA
N Fusion *Xma*I 3´	AAATT*CCCGGG*TCACAATTCCACATCATTATC
NS1-N Fusion 3´ *Eco*RI	GCAATA*GAATTC*GCGGCTCTTAGCAAGGTCAAAC TA
NS1-N Fusion 5´ *Hind*III	AAATTA*AAGCTT*G*C*GGGCAGTGAAACATTGAGT GTA
p68 antisense 3´ *Not*I	AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCT ACAGAAATTATTGGGAATATCCTGTTGGCATTGG
p68 antisense 5´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*ATGTCGGGTTATTCGAGTGACCGA GAC
p68 EGFPC3 3´ *Xma*I	ATAT*CCCGGG*TTATTGGGAATATCCTGTTGG
p68 EGFPC3 5´*Xho*I	ATAA*CTCGAG*G*C*GTCGGGTTATTCGAGTGACCG A
p68 pGADT7 3´ *Bam*HI	TATA*GGATCC*TTATTGGGAATATCCTGTTGG
p68 pGADT7 5´ *Cla*I	TATA*ATCGAT*TTATGTCGGGTTATTCGAGTGACCG AGAC
p68 pTIT 3´ *Eco*RV	ATA*GATATC*TTATTGGGAATATCCTGTTGG

p68 pTIT 5´*Afl*III	GACG*ACATGT*CGGGTTATTCG
p68 sense 3´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*TTATTGGGAATATCCTGTTGGGATTGG
p68 sense 5´ intern	TACAGAAAATGTCGGGTTATTCGAGTGACCGAGACCGCGGG*CGGGACC
p68 sense 5´ mut *Not*I extern	AAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAGAAAG*C*GTCGGGTTATT
p68 sense 5´ *Not*I extern	AAAAGGAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAGAAAATGTCGGGTTATTCG
pSUPER-p68 forw	GATCCCCGAGCACCCTGATTTGGCTATTCAAGAGATAGCCAAATCAGGGTGCTCTTTTTGGAAA
pSUPER-p68 rev	AGCTTTTCCAAAAAGAGCACCCTGATTTGGCTATCTCTTGAATAGCCAAATCAGGGTGCTCGGG
RanBP16 c-myc 5´ *Nco*I	TTAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGATCTCAAAGGAGGACCTGGCGG*C*C*GGATCATGTCCAGAGCCTG
RanBP16 EGFPC3 5´*Xho*I	AATA*CTCGAG*G*C*C*GGCGGATCATGTGCAGAGCCTG
RanBP16 pGADT7 3´ *Xho*I	ATAT*CTCGAG*TCAGCTCATCATGTCATT
RanBP16 pGADT7 5´ *Xma*I	ATAT*CCCGGG*TATGGCGGATCATGTGCAGAGC
RanBP16 pTIT 3´ *Bst*EII	GGCTTT*GGTGACC*TCAGGAG
RanBP16 pTIT 3´ *Xma*I	ATAT*CCCGGG*TCAGCTCATCATGTCATTGC
RanBP16 pTIT 5´ *Bst*EII	CCTGA*GGTCACC*AAAGCC
RanBP16 pTIT 5´ *Nco*I	GCA*CCATGG*CGGATCATGTGC
SEI-1 3´pGADT7 *Eco*RI	ATAT*GAATTC*TCAGCGCCCTGGCCCCGGCGG
SEI-1 5´*Bsp*HI myc	ATAT*TCATGA*TGGAGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGCTGAGCAAGGGTCTGAAGCGG
SEI-1 5´pGADT7 *Nde*I	ATAT*CATATG*ATGCTGAGCAAGGGTCTGAAGCGG
SEI-1 EGFP *Xho*I 5´	ATAT*CTCGAG*GCGCTGAGCAAGGGTCTGAAGCGG
Start∆5´	AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAG
Stop/Start 3´ *Eag*I	ATAT*CGGCCG*GGCTGGTTGGGGAACTGATTT
Stop/Start 5´ *Not*I	AAAAGAAAA*GCGGCCGC*CTAAATCAATAGCCAAC

	ACCAGATGG
Stop/StartΔ3´	AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*GGCTGGTTGGGGAAC TGATTT
βCOPI pEGFPC3 5´ *Xho*I	ATAT*CTCGAG*G*C*GACGGCGGCTGAGAACGTATG C
βCOPI PGADT7 5´ *Nde*I	TATA*CATATG*ACGGCGGCTGAGAACGTATGC
βCOPI pTIT 3´ *Sac*I	GCGAATAAAA*GAGCTC*TTTCTGATGG
βCOPI pTIT 3´ *Xma*I	TCCA*CCCGGG*TTATGAATAGATCTGTTTATTG
βCOPI pTIT 5´ *Bsp*HI	CCAGAAA*TCATGA*CGGCGG
βCOPI pTIT 5´ *Sac*I	CCATCAGAAA*GAGCTC*GTTTTATTCGC
βCOPI pTIT c-myc 5´ *Nco*I	TATAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAG GAGGACCTGG*C*GACGGCGGCTGAGAACGTATG C

3.1.10.2 Plasmide

Für Klonierungen zur Herstellung von BRSV Konstrukten wurde der Vektor pBlueskript SKII- (Stratagene) verwendet.

3.1.10.2.1 Verwendete Plasmide

pTIT	Derivat von pSKII- mit zusätzlicher Ribosomen-bindungssequenz (IRES) und T7 Terminatorsequenz (37)
prBRSV	kodiert BRSV Antigenom (21)
prBRSVΔNS1/2	kodiert BRSV Antigenom mit deletierten NS Genen (134)
pTITB-N, pTITB-L, pTITB-P, pTITB-M2	Plasmide, die BRSV N, P, L und M2 unter Kontrolle des T7-Promotors exprimieren (21)
pTre2Hyg	vermittelt Hygromycinresistenz (Clontech)
pGEX-4T-1	Vektor zu Klonierung von cDNAs mit 5´terminal fusionierter GST Sequenz unter Kontrolle des T7-Promotors (Pharmacia)
pEGFP-C3	Vektor zur Expression von cDNAs mit proximal fusioniertem EGFP (enhanced green fluorescent protein) unter Kontrolle des CMV Promotors (Clontech)

pSUPER	Vektor zur Expression von siRNA, die sich nach Expression unter Kontrolle des PolIII (H1) Promotors faltet und zu funktioneller siRNA gespalten wird (20)
pGADT7	Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit GAL4-Aktivierungsdomäne in Hefezellen unter Kontrolle des GAL4-Promotors (Clontech)
pGBKT7	Vektor zur Expression von Fusionsproteinen mit GAL4-Bindedomäne in Hefezellen unter Kontrolle des GAL4 Promotors (Clontech)
pACT2	Klonierungsvektor der cDNA Expressionsbibliothek (Clontech)

3.1.10.2.2 Plasmide aus dieser Arbeit

pEGFP-C3 NS1-N	EGFP in Fusion mit BRSV NS1 und N
pGBKTT7 BRSV-NS1	GAL4-BD in Fusion mit BRSV NS1
pGBKTT7 BRSV-NS2	GAL4-BD in Fusion mit BRSV NS2
pGBKTT7 HRSV-NS1	GAL4-BD in Fusion mit HRSV NS1
pGBKTT7 HRSV-NS2	GAL4-BD in Fusion mit HRSV NS2
pGBKTT7 PVM-NS1	GAL4-BD in Fusion mit PVM NS1
pGBKTT7 PVM-NS2	GAL4-BD in Fusion mit PVM NS2
pGADT7 BRSV-NS1	GAL4-AD in Fusion mit BRSV NS1
pGADT7 BRSV-NS2	GAL4-AD in Fusion mit BRSV NS2
pGADT7 HRSV-NS1	GAL4-AD in Fusion mit HRSV NS1
pGADT7 HRSV-NS2	GAL4-AD in Fusion mit HRSV NS2
pGADT7 PVM-NS1	GAL4-AD in Fusion mit PVM NS1
pGADT7 PVM-NS2	GAL4-AD in Fusion mit PVM NS2
pGEX-4-T1-BRSV-NS1	GST in Fusion mit BRSV NS1
pGEX-4-T1-BRSV-NS2	GST in Fusion mit BRSV NS2
pTIT-RanBP16	RanBP16 unter Kontrolle des T7-Promotors
pTIT-p68	p68 unter Kontrolle des T7-Promotors
pTIT-βCOPI	βCOPI unter Kontrolle des T7-Promotors
pTIT-MM-1	MM-1 unter Kontrolle des T7-Promotors
pTIT-myc-CDK4BP	CDK4BP in Fusion mit c-myc Epitop

pTIT-myc-RanBP16	RanBP16 in Fusion mit c-myc Epitop
pTIT-myc-βCOPI	βCOPI in Fusion mit c-myc Epitop
pTIT-myc-MM-1	MM-1 in Fusion mit c-myc Epitop
pEGFP-C3-MM1	MM-1 in Fusion mit EGFP
pEGFP-C3-βCOPI	βCOPI in Fusion mit EGFP
pEGFP-C3-p68	p68 in Fusion mit EGFP
pEGFP-C3-CDK4BP	CDK4BP in Fusion mit EGFP
pEGFP-C3-RanBP16	RanBP16 in Fusion mit EGFP
pSUPER-p68	kodiert siRNA für humanes p68

3.1.10.2.3 prBRSV-Plasmide aus dieser Arbeit

prBRSV-p68^{S}	BRSV cDNA Antigenom mit p68 Sequenz 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSVp68^{as}	BRSV cDNA Antigenom mit antisense p68 Sequenz 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSVp68^{AUG*}	BRSV cDNA Antigenom mit p68 Sequenz mit mutiertem Startkodon 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSVΔNS1/2p68^{S}	BRSV cDNA Antigenom mit deletierten NS Genen und p68 Sequenz 5´ terminal des N Gens
prBRSVΔNS1/2p68^{as}	BRSV cDNA Antigenom mit deletierten NS Genen und p68 antisense Sequenz 5´ terminal des N Gens
prBRSVΔNS1/2p68^{AUG*}	BRSV cDNA Antigenom mit deletierten NS Genen und p68 Sequenz mit mutiertem Startkodon 5´ terminal des N Gens
prBRSV-EGFP-MM-1^{S}	BRSV cDNA Antigenom mit EGFP-MM-1 Sequenz 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSV-MM-1as	BRSV cDNA Antigenom mit antisense MM-1 Sequenz 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSV-EGFP	BRSV cDNA Antigenom mit EGFP Sequenz 5´ terminal des NS1 Gens
prBRSVΔNS1/2-Stop/Start	BRSV cDNA Antigenom mit deletierten NS Genen kodiert 5´ terminal die NS1/NS2 Gengrenze

3.1.10.3 Virusstämme

SADL16	Rekombinantes Tollwutvirus ausgehend von Street Alabama Dufferin B19 (36)
rBRSV	rekombinantes BRSV ausgehend von A51908 (American Type Culture Collection) Variante ATue51908 (21), gen bank accession no. AF092942)
rBRSV NS1(HA)	rekombinantes BRSV exprimiert NS1 Gen in Fusion mit HA Epitop
rBRSV NS2(FLAG)	rekombinantes BRSV exprimiert NS2 Gen in Fusion mit FLAG Epitop
rBRSVΔNS1/2	rekombinantes BRSV mit deletierten NS Genen (134)
vTF7-3	rekombinantes Vaccinia Virus, das die T7-Polymerase stabil exprimiert (52)
MVA-T7	rekombinantes modifiziertes Vaccinia Virus, das die T7 Polymerase stabil exprimiert (145)

3.1.10.4 Viren aus dieser Arbeit

rBRSVp68^{S}	BRSV exprimiert p68
rBRSVp68^{as}	BRSV exprimiert komplementäre p68 RNA
rBRSVp68^{AUG*}	BRSV exprimiert p68 mit mutiertem Startkodon
rBRSVΔNS1/2p68^{S}	BRSV mit deletierten NS Genen, exprimiert p68
rBRSVΔNS1/2p68^{as}	BRSV mit deletierten NS Genen, exprimiert komplementäre p68 RNA
rBRSVΔNS1/2p68^{AUG*}	BRSV mit deletierten NS Genen, exprimiert p68 mit mutiertem Startkodon
rBRSV-EGFP-MM-1^{S}	BRSV exprimiert MM-1 mit N-terminaler EGFP Fusion
rBRSV-MM-1 ^{as}	BRSV exprimiert komplementäre MM-1 RNA
rBRSV-EGFP	BRSV exprimiert EGFP
rBRSVΔNS1/2-Stop/Start	BRSV mit deletierten NS Genen exprimiert die NS1/NS2 Gengrenze

3.1.10.5 Bakterienstämme

Zur Vermehrung der rekombinanten Plasmide wurden die Bakterienstämme *E.coli* XL1-blue bzw. *E.coli* XL10-gold (Stratagene) verwendet. Rekombinante GST-NS Fusionsproteine wurden in *E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene) synthetisiert. Die cDNA Expressionsbibliothek aus Lungengewebe wurde aus *E.coli* BNN132 präpariert.

3.1.10.6 Hefestämme

Zur Transformation von Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek wurde der Hefestamm AH109 (84) verwendet. Dieser Hefestamm besitzt diverse Gendeletionen, sodass AH109 Histidin, Tryptophan, Leucin und Adenin nicht *de novo* synthetisiert wird. Die Gene, die für entsprechende Proteine der Tryptophan- und Leucin-Synthese benötigt werden, werden durch pGBKT7 und pGADT7 Vektoren komplementiert. Die Reportergene *ADE*2 und *HIS3,* die zur Adenin und Histidinsynthese benötigt werden, stehen bei AH109 unter Kontrolle des GAL4 Promotors. Zusätzlich besitzt AH109 die Reportergene *LacZ* und *Mel1*, die für α- bzw. β-Galaktosidase kodieren. Durch Interaktion von Proteinen in Fusion mit der GAL4 Bindedomäne bzw. GAL4 Aktivierungsdomäne, werden die Reportergene exprimiert und erlauben somit Wachstum auf –His/–Ade Mangelmedien. Zudem sind diese Hefezellen positiv im α-/β-Gal Test.

Y187 (70) wurde zur Bestätigung der identifizierten Protein-Protein Interaktionen verwendet. Dieser Hefestamm besitzt identische Auxotrophiemarker wie AH109, allerdings wird *LacZ* in diesem Hefestamm nicht basal exprimiert. Aufgrund der stringenteren Kontrolle des *LacZ* Gens, eignet sich dieser Hefestamm für β-Galaktosidase Messungen.

3.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Organismus
BSR	BHK-21 Klon, J. Cox, BFAV Tübingen	Hamster
BSR T7/5 (21)	BSR-Zellen, exprimieren T7 Polymerase	Hamster
HeLa CD81	Cervixkarzinom Zelllinie	Mensch

Vero	Nierenzelllinie	Grüne Meerkatze
MDBK	Nierenzelllinie	Rind
HEK 293	Nierenzelllinie	Mensch

3.1.11.1 Kulturbedingungen

Zelllinie	Kulturmedium
BSR, BSR T7/5-Zellen,	BHK-21 Medium, 2 % Tryptosephosphatmix, 2 % MEM Aminosäuremix, 1 % P/S
HeLa-CD81	DMEM, 10 % FKS, Glutamin (1x), 1 % P/S
Vero, MDBK	DMEM, 5 % FKS, 1 % P/S
HEK 293	DMEM, 10 % FKS, 1 % P/S

3.2 Methoden

3.2.1 Arbeiten mit DNA

3.2.1.1 Reinigung von DNA

3.2.1.1.1 Ethanolfällung

Die DNA-Lösung wurde mit einem 1/10 Volumen 4 M LiCl und 2,5 Volumen 96 % (v/v) Ethanol versetzt und anschließend 2 h bei –70 °C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde anschließen pelletiert (14.000 Upm, 30 min, 4 °C; Kühlzentrifuge), mit 1 Volumen 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in ddH_2O aufgenommen.

3.2.1.1.2 Isopropanolfällung

Die DNA-Lösung wurde mit einem 1/10 Volumen 4 M LiCl und 0,7 Volumen Isopropanol versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde pelletiert (13.000 Upm, 10 min, Kühlzentrifuge) und mit 1 Volumenteil 70 % (v/v)

Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde anschließend getrocknet und in ddH_2O aufgenommen.

3.2.1.1.3 Reinigung über Silicamembranen

Zur Reinigung von DNA nach Inkubation mit alkalischer Phosphatase bzw. *Klenow* Polymerase wurde der „QiaQuick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. PCR Reaktionen wurden mit dem „QiaQuick PCR Purification Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

3.2.1.2 DNA-Modifikationen

3.2.1.2.1 DNA Restriktionsendonukleasenverdau

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

3.2.1.2.2 Herstellung glatter Enden

Zur Ligation von nichtkompatiblen DNA-Enden wurde *Klenow* DNA Polymerase verwendet. Bei der *Klenow*-Reaktion erfolgt ein Auffüllen von 5’ Überhängen und eine Regression von 3’ Überhängen. Zur *Klenow* Reaktion wurde das *Klenow* Polymerase (NEB) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Aufreinigung der Reaktion erfolgte mittels „QiaQuick Nucleotide Removal“ Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.2.3 Dephosphorylierung von 5’-Enden

Zur Dephosphorylierung von 5’ Enden der DNA wurde Shrimp Alkaline Phosphatase (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.1.2.4 Hybridisierung und Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Zur Klonierung von doppelsträngigen Oligonukleotiden in pSUPER wurden die komplementären Einzelstränge (64 nt) in H_2O gelöst (3 µg/µl) und jeweils ein 1 µl der Oligonukleotide zur Hybridisierung in 48 µl Hybridisierungspuffer eingesetzt. Die DNA wurde erhitzt (4 min, 95 °C), 10 min bei 70 °C inkubiert und langsam auf 4 °C abgekühlt. 5 µl der DNA wurden zur Phosphorylierung mit T4-PNK in 10 µl Endvolumen nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.2.1.2.5 DNA Ligation

Vektor- und cDNA Fragment wurden im Verhältnis 1:3 bis 1:5 (0,5 -1 µg DNA) gemischt. Bei überhängenden DNA-Enden wurden die Ansätze erhitzt (5 min, 65 °C). Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers (16 °C, 12-16 h).

3.2.1.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Für die PCR Reaktion wurden 100 ng DNA mit je 10 pmol Primer gemischt. Nach Zusatz von 10 µl Reaktionspuffer, 0,8 µl dNTPs (25 mM) und 1 µl *Pfu*-Polymerase (2,5 U) wurde die DNA zunächst 1 min bei 95 °C denaturiert. 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(G+C)]-5. Die PCR Produkte wurden mit dem QiaQuick PCR Purification Kit gereinigt und die Größe des Reaktionsproduktes mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt.

3.2.1.2.7 Reverse Transkriptase Reaktion (RT-PCR)

Zur Synthese von cDNA aus mRNA wurde 1 µg Gesamt RNA mit dem entsprechenden 3´ Primer und 0,3 µl RNasin in 23 µl Endvolumen gemischt. Zur Denaturierung der RNA wurde zunächst erhitzt (65 °C, 4 min) und anschließend der entsprechende 3´Primer hybridisiert (37 °C, 10 min). Zur Erststrang-Synthese wurden 3 µl dNTPs (je 25 mM), 3 µl 10 x RT Puffer (0,5 M Tris-Cl, pH [8,3]; 0,3 M KCl; 0,1 mM $MgCl_2$; 0,05 M DTT) und 1 µl AMV Reverse Transkriptase (RT)

zugegeben und die RT Reaktion durchgeführt (43 °C, 1 h). 3 µl der RT Reaktion wurden anschließend für die PCR zur Synthese des cDNA Doppelstrangs eingesetzt.

3.2.1.3 Auftrennung von DNA Fragmenten im Agarosegel

DNA-Probenpuffer

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

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele von 0,7 % -2 % (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 (1 kb Leiter, LifeTechnologies).

3.2.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem „QiaQuick Gel Extraction Kit“ (Qiagen). Für Fragmentgrößen über 10 kb wurde das „QiaExII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.2.2 Arbeiten mit RNA

Alle Puffer und Lösungen für die Arbeiten mit RNA wurden mit ddH_2O/DEPC angesetzt. Hierzu wurde ddH_2O in der Verdünnung 1:1000 mit DEPC versetzt und gerührt (16, RT). Anschließend wurde der Ansatz autoklaviert (20 min, 121 °C).

3.2.2.1 Präparation von RNA aus eukaryotischen Zellen

RNA aus eukaryotischen Zellen wurde mit dem „RNeasy Mini“ Kit nach modifizierten Angaben der Hersteller isoliert. Durch das modifizierte Protokoll wurden höhere RNA Konzentrationen bei der Präparation erreicht. Konfluente Zellen einer 35 mm

Kulturschale wurden hierbei mit der doppelten Menge RLT-Puffer (700 µl) überschichtet und mit 700 µl 70 % igem Ethanol versetzt. Weitere Schritte bei der RNA Präparation erfolgten nach Angaben des Herstellers.

3.2.2.2 Auftrennung von RNA im Agarosegel

50x Phosphat-Puffer
250 mM Na_2HPO_4 x 2 H_2O
250 mM NaH_2PO_4 x H_2O
pH [6,8]

Blue juice
0,125 % Bromphenolblau
0,125 % Xylencyanol FF
0,125 % Orange G
15 % Ficoll 400
5 x TAE

Acridinorange- Stammlösung
10 mg/ml Acridinorange
in 1x Phosphatpuffer

Zur Herstellung von denaturierenden Agarosegelen wurden 1,5 - 3 g Agarose in 127 ml ddH_2O und 3 ml 50 x Phosphatpuffer durch Erhitzen gelöst. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 45 °C wurden 20 ml Formaldehyd-Lösung (37 % in H_2O) zugegeben und die Lösung in die Gelapparatur gegossen. Das Gel wurde anschließend mit 1 x Phosphatpuffer überschichtet.
1-3 µg RNA wurden in 12 µl Gesamtvolumen mit 3 µl 5 x Phosphatpuffer unter Zugabe von 1,8 µl Glyoxal (40 % in ddH_2O) für 45 min bei 56 °C denaturiert. Nach Zugabe von 3 µl Bluejuice wurden die Proben aufgetragen. Als Größenstandard wurde eine RNA-kb-Leiter (BRL) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte für 2-4 bei 3 V/cm und konstanter Pufferumwälzung.
Das RNA-Agarosegel wurde mit einer Acridinorangelösung (1:300 Stammlösung in 1 x Phosphatpuffer) 3 min gefärbt und anschließend dreimal je 20 min mit 1 x Phosphatpuffer gewaschen. Der RNA-Größenstandard und die ribosomale RNA der Zelle wurden danach durch UV-Bestrahlung (254 nm) sichtbar gemacht.

3.2.2.3 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern Blot)

20x SSC:
3 M NaCl
0,3 M NaCitrat

Die RNA aus den entfärbten Agarosegelen wurde mittels Kapillartransfers bzw. in der Vakuumapparatur auf positiv geladene Nylonmembranen transferiert. Dazu wurde 20 x SSC als Laufpuffer verwendet. Die Membran wurde einmal mit 3 x SSC

gewaschen und anschließend getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Membran („Crosslinking“) erfolgte durch UV-Bestrahlung (254 nm).

3.2.2.4 Northernhybridisierung mit DNA/RNA-Sonden

3.2.2.4.1 Synthese von DNA-Sonden

Zur Synthese von DNA-Sonden wurde das Nick Translation Kit (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Markierung der Sonden wurde α-^{32}P-CTP (Amersham Pharmacia) benutzt. Die Entfernung überschüssiger Nukleotide aus dem Reaktionsgemisch erfolgte mittels „QiaQuick Nucleotide Removal Kit“ (Qiagen).

3.2.2.4.2 Synthese von RNA Sonden

α-^{32}P-UTP markierte RNA-Sonden zum spezifischen Nachweis der Expression von „sense/antisense“ RNA, wurden durch *in vitro* Transkription als „run off“ RNA Moleküle mittels des “*In vitro* Transcription“ Kits (Amersham Pharmacia) 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.

3.2.2.4.3 DNA/RNA Hybridisierung

3.2.2.4.3.1 Hybridisierungsbedingungen

Hybridisierungslösung	**5 % Zetalösung**	**1 % Zetalösung**
1 mM EDTA	1 mM EDTA	1 mM EDTA
245 mM SDS	175 mM SDS	35 mM SDS
250 mM Na_2HPO_4	20 mM Na_2HPO_4	20 mM Na_2HPO_4
250 mM NaH_2PO_4	20 mM NaH_2PO_4	20 mM Na_2HPO_4
pH [7,2]	pH [7,2]	pH [7,2]

Die durch UV-Bestrahlung auf Nylonmembran fixierte RNA wurde 30 min mit 10-15 ml Hybridisierungslösung im Hybridisierungsofen (68 °C, 7 Upm) präinkubiert. Hierdurch wurde verbliebendes Acridinorange von der Membran entfernt. Die Hybridisierungslösung wurde durch 8 ml neue 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) gewaschen. Anschließend wurde die Membran getrocknet und die Signale mittels Autoradiographie detektiert.

3.2.2.4.4 RNA/RNA Hybridisierung

3.2.2.4.4.1 Hybridisierungsbedingungen

Hybridisierungslösung
750 mM NaCl
150 mM Tris-Cl pH [8,0]
10 mM EDTA
200 mM Phosphatpuffer pH [8,0]
10 % Dextran
1 x Denhardt´s Lösung
0,1 % SDS (w/v)
50 % Formamid
(entionisiert)

Waschlösung I
750 mM NaCl
150 mM Tris-Cl pH [8,0]
10 mM EDTA
25 mM Na_2HPO_4
0,1 % SDS (w/v)

Waschlösung II
150 mM NaCl
30 mM Tris-Cl pH [8,0]
2 mM EDTA
25 mM Na_2HPO_4
1 x Denhardt´s Lösung

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

Die RNA/RNA Hybridisierung wurde im Hybridisierungsofen bei 55 °C durchgeführt und die Membran zunächst dreimal vorhybridisiert (1-3 h). Anschließend wurde die Membran mit der gereinigten, radioaktiv markierten Sonde in 20 ml Hybridisierungslösung über Nacht inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal mit den Waschlösungen I-III je 45 min gewaschen, getrocknet (RT) und die radioaktiven Signale autoradiographisch detektiert.

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 *in vitro* Synthese von ^{35}S markierten Proteinen

Zur Synthese von ^{35}S radioaktiv markierten Proteinen wurde der „*in vitro* Transcription and Translation Kit“, TNT® (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurden bis zu 2 µg geschnittene Plasmid DNA unter Kontrolle des T7-Promotors eingesetzt. Die resultierenden „run off“-Transkripte wurden als ^{35}S

radioaktiv markierte Proteine translatiert und weiterhin für GST-*„pull down“* Experimente verwendet.

3.2.3.2 Ko-Immunpräzipitation von rekombinanten Proteinen aus BSR Zellen

Lysepuffer
100 mM Tris-Cl, pH [8,0]
2 mM EDTA
150 mM NaCl
1 % Triton X-100

Um Protein-Protein Interaktionen in Zellen zu bestätigen, wurden Vaccinia Virus infizierte und anschließend transfizierte Zellen nach 24 h Expression lysiert. Hierzu wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und 15 min mit Lysepuffer auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden vom Schalenboden abgelöst und zentrifugiert (10 min, 4 °C, 14.000 Upm). Protein A- bzw. Protein G-Sepharose wurde in der Zwischenzeit dreimal mit dem entsprechenden Lysepuffer gewaschen. Die Überstände mit den löslichen Proteinen wurden abgenommen und zunächst mit 50 µl Protein A- bzw. G-Sepharose (50 %) unter ständiger Rotation inkubiert (1 h, 4 °C), um unspezifische Bindungen abzusättigen. Nach erneutem Zentrifugieren (1 min, 4 °C, 14.000 Upm) wurden die Überstände mit Antikörpern gegen die entsprechenden fusionierten Epitope inkubiert (mind. 4 h, 4 °C). Anschließend wurde 50 µl Protein A- bzw. G-Sepharose (50 %) zugegeben, um den Antikörper zu binden und zu präzipitieren. Ko-Immunpräzipitationen interagierender Proteine wurden durch „Western Blot“ mit Antikörpern gegen entsprechende fusionierte Epitope der rekombinanten Interaktionspartner demonstriert.

3.2.3.3 GST *pull down* ^{35}S radioaktiv markierter Proteine

Zur Bestätigung von Protein-Protein-Interaktionen *in vitro,* wurden gereinigte BRSV NS1- und NS2-Proteine in Fusion mit dem GST-Epitop verwendet. 1,5 µg der Fusionsproteine wurden jeweils mit 5 µl der *in vitro* translatierten Proteine und Lysepuffer versetzt (500 µl Endvolumen). Die Inkubation erfolgte bei 4 °C unter ständiger Rotation der Proben (4-12 h). Durch Zugabe von 50 µl Glutathion Agarose wurden die GST Fusionsproteine in der Zentrifuge pelletiert (1 min, 4 °C 1.500 Upm, Eppendorfzentrifuge). Das Pellet wurde dreimal mit Lysepuffer gewaschen und die

Proben im PAA-Gel getrennt. Das Gel wurde anschließend fixiert (50 % Methanol, 30 % Essigsäure) und getrocknet (2 h, 80 °C). Die radioaktiven Signale wurden durch Autoradiographie auf Röntgenfilmen (Biomax MR, Kodak) detektiert.

3.2.3.4 Auftrennen von Proteinen im denaturierenden Polyacrylamidgel

Gelpuffer
3 M 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_2O
18 µl TEMED
116 µl APS

Polyacrylamid Trenngele

	10 %	12 %	14 %	16 %
Gelpuffer	12 ml			
ddH_2O	12,9 ml	11,1 ml	9,3 ml	7,5 ml
Acrylamidlösung	9 ml	10,8 ml	12,6 ml	14,4 ml
Glyzerin	2 ml			
APS	17 µl			
TEMED	175 µl			

(die Mengen beziehen sich auf 16 x 14 cm Gele)

SDS-Probenpuffer

2 % (w/v)	SDS
62,5 mM	TrisHCl
6 M	Harnstoff
10 % (v/v)	Glyzerin
5 % (v/v)	β-Merkaptoethanol
0,01 % (w/v)	Phenolrot
0,01 % (w/v)	Bromphenolblau

Die Lösungen der Trenngele wurde mit TEMED und APS versetzt, zwischen Glasplatten gegossen und anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach 2-3 h Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und die Geloberfläche mit ddH_2O 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.

3.2.3.5 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

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 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 (10 min) wurde mit dem ersten Antikörper (1:1.000 -1:20.000 in Waschpuffer) über Nacht inkubiert. Nach drei Waschschritten (15 min) wurde die Membran mit einem zweiten, Meerrettichperoxidase konjugierten Antikörper inkubiert (2 h). Nach weiteren drei Waschschritten (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) belichtet.

3.2.4 Zellkultur

3.2.4.1 Passage von Zellen

Zellen wurden mit den angegebenen Medien kultiviert (37 °C, 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit). Bei BSRT7/5 wurde zusätzlich Geniticin zugesetzt (G418, 1 mg/ml Medium). BSRT7/5 Zelllinien, die MM-1 stabil exprimierten, wurden zusätzlich mit Geniticin (1 mg/ml Medium) und Hygromycin (4 mg/ml Medium) inkubiert .
Nach 3 bis 4 Tagen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin vom Boden des Kulturgefäßes gelöst und vereinzelt. Anschließend wurden die Zellen in geeigneter Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt.

3.2.4.2 Anlegen von Gefrierkulturen

Zur Konservierung von Zellen wurden Gefrierkulturen angelegt. Dazu wurden die Zellen einer 75 cm^2 Gewebekulturflasche nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens durch Trypsinbehandlung abgelöst und in 9 ml Medium aufgenommen. Nach tropfenweiser Zugabe von 10 % (v/v) DMSO wurden die Zellen in 1 ml Aliquots portioniert und bei –70 °C eingefroren. Zur längeren Konservierung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.4.3 Transfektion von Zellen

Zur Transfektion von Zellen wurde das Mammalian Transfection Kit oder Fugene6 nach Angaben der Hersteller verwendet.

Die Transfektion von HeLa Zellen erfolgte durch Elektroporation. Hierzu wurden konfluent gewachsene HeLa Zellen durch Trypsin vom Boden einer 75 cm^2 Zellkulturflasche abgelöst und zweimal mit 50 ml OPTIMEM 1 gewaschen (5 min, 1.800 Upm, 4 °C, Heraeus Variofuge 3.0R). Das Zellpellet wurde in 800 µl OPTIMEM 1 resuspendiert und mit 30 µg Plasmid DNA gemischt. Die Elektroporation wurde im GENE Pulser (Bio Rad) bei 250 V, 975 µFd und 335 Ω durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in vorgewärmtem DMEM Medium inkubiert.

3.2.4.4 Herstellen stabiler EGFP-MM-1 exprimierender Zelllinie

Zur Klonierung einer stabilen Zelllinie, die MM-1 in Fusion mit EGFP exprimiert, wurden BSRT7/5 Zellen mit 3 µg pEGFPC3-MM-1 und zusätzlich mit 0,5 µg pTre2Hyg in einer 3,5 cm Schale transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen trypsiniert und auf Hybridomaplatten vereinzelt. Die Selektion stabil transfizierter Zellklone erfolgte durch Zugabe von Geniticin (1 mg/ml Medium) und Hygromycin (4 mg/ml Medium). Die gewachsenen stabilen Zellklone wurden auf EGFP Fluoreszenz überprüft, von der Hybridomaplatte abgelöst und erneut vereinzelt, um polyklonale Effekte zu vermeiden. Die Zellpopulation wurden anschließend in 25 cm Zellkulturflaschen kultiviert und Gefrierkulturen der Zellklone angelegt.

3.2.4.5 Immunfluoreszenz

3.2.4.5.1 Direkte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis von Tollwutvirus N-Protein wurde eine direkte Immunfluoreszenz mit Centocor® durchgeführt.
Die Zellen wurden mit 80 % (v/v) Aceton (30 min, 4 °C) fixiert, luftgetrocknet und anschließend mit der Antikörperlösung (Centocor® 1:200 in PBS) überschichtet (1 h, 37 °C). Die Auswertung erfolgte im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 450 nm-490 nm.

3.2.4.5.2 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis anderer Proteine wurde eine 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_4Cl Lösung (50 mM NH_4Cl, 20 mM Glyzin) inkubiert (15 min, RT). Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 % (v/v) Triton X-100/PBS permeabilisiert (15 min, RT) und die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen.

Nach der Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden die Präparate mit einer geeigneten Antikörperlösung (1:40 - 1:200 in PBS) gegen das nachzuweisende Protein überschichtet (1 h, 37 °C). Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, mit einer Lösung eines konjugierten Antikörper (FITC bzw. Cy3) inkubiert (1 h, 37 °C) und erneut dreimal mit PBS gewaschen. Sofern die Zellen zuvor auf Deckgläsern kultiviert wurden, wurden die Präparate mit Histogel (Linaris Biological Products) auf Objektträgern fixiert. Die Auswertung erfolgte mit konfokaler Lasermikroskopie (Leica) bei Verwendung entsprechender Filter zur Anregung des konjugierten Farbstoffs.

3.2.4.5.3 Zellkernfärbung mit DAPI

Zum Nachweis intakter Zellkerne durch Fluoreszenz wurde DAPI Reagenz verwendet. DAPI wurde hierzu 1:1000 in PBS verdünnt, die permeabilisierten Zellen hiermit überschichtet (5 min) und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Intakte

Zellkerne wurden durch die charakteristische Blaufärbung im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Axiovert) sichtbar gemacht.

3.2.4.5.4 Nachweis spezifischer Zellkernfärbungen

Um zu zeigen, dass Proteine spezifisch im Zellkern lokalisiert sind, wurden die Zellen bei der Immunfluoreszenz vor der Fixierung zunächst mit Digitonin (40 µg/ml Digitonin in PBS) 3 min auf Eis präinkubiert, mit kaltem PBS gewaschen und mit 0,025 % Triton X-100 in PBS auf Eis inkubiert (5 min). Die Fixierung und Permeabilisierung der so behandelten Zellen wurden wie bereits beschrieben durchgeführt. Als Kontrolle zur spezifischen Kernfärbung wurden BSRT7/5 Zellen mit pEGFPC3 transfiziert und die Kernlokalisation des EGFP mit und ohne Vorheriger Inkubation mit Detergenz beobachtet.

3.2.5 Arbeiten mit Viren

3.2.5.1 Herstellung rekombinanter BRSV auf Basis von cDNA

Die Herstellung rekombinanter Viren wurde wie bei Buchholz et al. beschrieben durchgeführt (21). Hierzu wurden BSRT7/5 Zellen in 3,5 cm Zellkulturschalen mit BHK Medium/10 % FKS kultiviert, bis ein annähernd konfluenter Zellrasen beobachtet wurde. Die BSRT7/5 Zellen exprimieren konstitutiv die T7 RNA Polymerase und erlauben somit eine Expression von cDNAs unter Kontrolle des T7 Promotors. 1 h vor Transfektion wurden die Zellen mit serumfreiem DMEM gewaschen, mit 1 ml serumfreiem DMEM bei 37 °C inkubiert, und die Zellen mit cDNAs transfiziert. Hierbei wurden die Zellen sowohl mit dem BRSV cDNA Antigenom als auch den Helferplasmiden, die unter Kontrolle des T7-Promotors die viralen Proteine N,P,L und M2-1 kodieren, transfiziert (10 µg cDNA Antigenom bzw. dessen klonierte Derivate, 4 µg pTITB-N, 4 µg pTITB-P, 2 µg pTITB-L, 2 µg pTITB-M2-1). Die Transfektion erfolgte mittels der Ca_2PO_4 Methode („Mammalian Transfection Kit“, Stratagene), wobei die Transfektionslösung nach 4 h Inkubation abgenommen wurde und die Zellen mit BHK Medium/10 % FKS gewaschen wurden. Nach 3 Tagen Inkubation der transfizierten BSRT7/5 Zellen mit BHK Medium/10 % FKS, wurden die Zellen jeweils im Verhältnis 1:3 geteilt und mit BHK Medium/2,5 %

FKS inkubiert, bis ein deutlicher CPE beobachtet wurde. Durch Frieren der Zellen (–20 °C) und anschließendem Tauen wurden die nun mit Virus infizierten Zellen lysiert und der Überstand auf Vero Zellen zur Vermehrung der Viren überführt.

3.2.5.2 Vermehrung von BRSV in Zellkultur

Zur Vermehrung der BRS-Viren in Zellkultur wurden zunächst Vero Zellen auf 75 cm^2 Kulturflaschen kultiviert, bis sich ein annähernd konfluenter Zellrasen bildete. Die Zellen wurden mit 8 ml serumfreiem DMEM überschichtet und mit einer MOI von 0,01-0,1 mit entsprechenden Viren infiziert. Nach 1,5 h Inkubation (37 °C) wurde der Überstand verworfen und die Zellen mit DMEM/2,5 % FKS überschichtet. 3-4 Tage nach Ausbildung eines deutlichen zytopathischen Effekts, wurde die Zellkulturflasche eingefroren (–20 °C) und die Zellen durch Auftauen der Flasche lysiert. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, 4 °C, Heraeus Variofuge 3.0R), der Überstand aliquotiert (je 1 ml) und eingefroren (–70 °C).

Zur Bestimmung der Virustiter wurde ein konfluenter Zellrasen (Vero) in 25 cm^2 Zellkulturflaschen trypsiniert und in 25 ml DMEM Medium aufgenommen. Je 100 µl wurden auf Mikrotiterplatten verteilt. Die Zellen wurden anschließend 2-3 h inkubiert (37 °C). 1 ml des gewonnen Virus aus dem Überstand wurde in mehreren Schritten jeweils 1:10 in serumfreiem Medium verdünnt. 100 µl der Verdünnungen wurden anschließend zu den Vero Zellen pipettiert und 3 Tage bei 37 °C inkubiert. Die infizierten Zellen wurden mit 80 % Aceton fixiert (30 min) und getrocknet. Die Virusplaques wurden mit Antikörpern gegen das Fusionsprotein F und FITC gekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Zellen jeweils mit RSV α-F Antikörpern (Verdünnung 1:70, Serotec) 45 min inkubiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde 45 min mit FITC gekoppelten α-Maus Antikörpern (Verdünnung 1:70-1:100, Dianova) inkubiert. Im letzten Schritt wurden die Zellen mit PBS und anschließend mit ddH_2O gewaschen und der Titer mittels Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss, Axiovert 35) bestimmt.

3.2.5.3 Infektionsexperimente zur Charakterisierung des BRSV

Zur Charakterisierung des Viruswachstums auf verschiedenen Zelllinien wurden Zellen mit den entsprechenden Viren infiziert und die Virustiter in Abständen von 24 h bestimmt. Hierzu wurden Zellen mit einer MOI von 0,01-0,1 in Suspension infiziert (1-1,5 h) und anschließend zentrifugiert (1.800 Upm, 5 min, Heraeus Variofuge 3.0R). Die infizierten Zellen wurden in 12-Loch Gewebekulturschalen ausgesät (4 x 10^5 Vero, 5 x 10^5 MDBK/Vertiefung) und in 700 µl DMEM/2,5 % FKS kultiviert. Zur Bestimmung der Virustiter wurden die Zellen durch Einfrieren und Tauen lysiert. Hierzu wurde zu den 700 µl Kulturmedium kurz vor dem Einfrieren 100 µl 0,5 M Hepes, 100 µl 1 M $MgSO_4$ und 100 µl FKS hinzugeben. Hierdurch wurde das Virus während des Einfrierens stabilisiert und ließ sich bei der Titration deutlich besser nachweisen als ohne diese Zusätze. Die gefrorenen Kulturen wurden bis zur Auswertung eingefroren (–20 °C) und anschließend parallel titriert.

Um den Einfluss von Interferon-α auf das Wachstum der entsprechenden Viren untersuchen zu können, wurden die Zellen nach der Infektion mit steigenden Konzentrationen IFN-α (IFN-α A/D, PBL Biomedical Laboratories) inkubiert. Hierbei wurde die Infektion wie oben beschrieben durchgeführt und vor dem Aussäen der Zellen bis zu 5.000 U/ml rekombinantes IFN-α den Gewebekulturschalen zugegeben.

3.2.5.4 Vermehrung von Vaccinia Viren

BSR Zellen wurden in einer 25 cm^2 Zellkulturflasche mit 1 x 10^7 Vaccinia Viren infiziert. Nach Ausbildung des CPEs wurden die Zellen in eine 75 cm^2 Zellkulturflasche mit BSR Zellen überführt und nach Ausbildung des CPEs trypsiniert und zentrifugiert (20 min, 5.000 Upm, Heraeus Variofuge 3.0R). Der Überstand wurde verworfen und die infizierten Zellen in 1 ml BHK Medium resuspendiert und anschließend auf Trockeneis gefroren. Die gefrorenen Zellen wurden bei Raumtemperatur getaut und zentrifugiert (2 min, 2.000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge). Diese Prozedur wurde zweimal wiederholt, wobei die Zellen in 500 µl BHK Medium resuspendiert wurden. Die Überstände wurden vereinigt und je 100 µl Aliquots eingefroren (–70 °C). Der Titer wurde durch geeignete Verdünnungen und Infektion von BSR Zellen bestimmt.

3.2.5.5 Überexpression von cDNA in BSR Zellen mittels Vaccinia Viren

Hohe zelluläre Proteinkonzentrationen wurden durch vorherige Infektion mit vTF7-3 bzw. MVA Viren und anschließende Transfektion der Zellen mit cDNAs unter Kontrolle des T7-Promotors erreicht. Hierzu wurden konfluent gewachsene BSR Zellen in 3,5 cm Schalen zunächst mit DMEM gewaschen, anschließend mit 1 ml DMEM inkubiert und mit Vaccinia Viren (MOI = 5) infiziert. Nach 40 min wurde das Medium abgenommen und durch neues DMEM ersetzt. 20 min später wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers mit dem FuGene6 (Roche) bzw. mit dem Mammalian Transfection Kit (Stratagene) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt (3.2.3.2.)

3.2.6 Arbeiten mit *Escherichia coli* (*E. coli*)

3.2.6.1 Anzucht von *E.coli*

LB-Medium
0,5 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) Bacto-Trypton
1 mM $MgSO_4$

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

3.2.6.2 Präparation kompetenter Bakterien (*E.coli*)

3.2.6.2.1 Präparation chemisch kompetenter Bakterien

LB^{++}-Medium	**Calcium-Puffer**
LB-Medium	60 mM $CaCl_2$
20 mM $MgSO_4$	10 mM Pipes pH 7,1
10 mM KCl	15 % (v/v) Glycerin

100 ml LB^{++}-Medium wurden mit 1 ml einer *E.coli* Übernachtkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} = 0,6 unter Schütteln inkubiert (37 °C). Die Bakterien wurden pelletiert (4000 Upm, 4 °C, 10 min; Beckman-Zentrifuge, GS3-Rotor), in 25 ml Calcium-Puffer resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem

Zentrifugieren (4000 Upm, 4 °C, 10 min) 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.

3.2.6.2.2 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurde 10-50 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 (42 °C, 2 min) durchgeführt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (5 min) wurden 200 µl LB^{++}-Medium zugegeben und der Ansatz geschüttelt (30 min, 37 °C). Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert und inkubiert (37 °C, 16 h). Einzelne Bakterienkolonien wurden zur Plasmid-DNA Isolierung in LB-Medium überführt und vermehrt.

3.2.6.2.3 Präparation elektrokompetenter Bakterien

5 ml einer Vorkultur (OD_{600}=1,5) wurde in 500 ml LB-Medium überführt und bis zur logarithmischen Phase (OD_{600}=0,8) unter Schütteln inkubiert (37 °C). Die Bakterien wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (3.000x g, 10 min, 4 °C, Beckman-Zentrifuge, GS3-Rotor). Die Bakterienpellets wurden zweimal in eiskaltem ddH_2O resuspendiert und unter identischen Bedingungen zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 5 ml eiskaltem ddH_2O/10 % Glyzerin aufgenommen und jeweils 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Aliquots der elektrokompetenten Bakterien wurden anschließend eingefroren (–70 °C). Die Transformationseffizienz der elektrokompetenten Bakterien wurde durch Transformation mit 1 ng zirkulärer Plasmid DNA und Ausplattieren auf Selektionsagar ermittelt.

3.2.6.2.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

SOC-Medium
2 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
10 mM NaCl
2,5 mM NaCl
10 mM $MgCl_2$
10 mM $MgSO_4$
20 mM Glucose

Bei der Transformation elektrokompetenter *E.coli* wurden in der Regel 10-100 ng Plasmid DNA eingesetzt. Hierzu wurden 100 µl elektrokompetente *E.coli* auf Eis getaut, mit der Plasmid DNA gemischt und in eine Elektroporationsküvette (4 mm) überführt. Zur Elektroporation wurde der GENE-Pulser (Bio Rad) verwendet. Die Elektroporation der Bakterien erfolgte bei 2,5 kV, 25 µFd und 400 Ω. Die transformierten Bakterien wurden anschließend in 1 ml SOC-Medium inkubiert (1 h, 37 °C) und auf Selektionsagar plattiert

3.2.7 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E.coli*

3.2.7.1 Plasmid-Minipräperation aus *E.coli*

Flexi-Puffer 1:	**Flexi-Puffer 2:**	**Flexi-Puffer 3:**
100 mM Tris-HCl pH 7,5	200 mM NaOH	300 mM KAc pH [5,75]
10 mM EDTA pH [8,0]	1 % (w/v) SDS	(mit HCOOH eingestellt)
400 µg/ml RNaseI		

1,5 ml einer Übernachtkultur von *E.coli* wurde in der Tischzentrifuge pelletiert (13.000 Upm, 5 min) und mit Flexi-Puffer 1 resuspendiert. Die resuspendierten Bakterien wurden durch die Zugabe von 200 µl Flexi-Puffer 2 lysiert. Nach der Zugabe von 200 µl Flexi-Puffer 3 wurde der Ansatz auf Eis inkubiert (5 min) und die präzipitierten Proteine und Chromosomahle DNA anschließend durch Zentrifugation pelletiert (13.000 Upm, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 420 µl Isopropanol und Inkubation bei Raumtemperatur gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde pelletiert (13.000 Upm, 15 min), einmal mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen (13.000 Upm, 5 min), getrocknet und in 50 µl H_2O_{dd} gelöst.

3.2.7.2 Präparation größerer Mengen Plasmid DNA aus *E.coli*

Zur Präparation von großen Mengen Plasmid DNA aus *E.coli* wurden Nucleobond-Säulen (PC-100; PC-500, Macherey-Nagel) nach Angaben der Hersteller verwendet. Zur Präparation der cDNA Expressionsbibliothek aus *E.coli* wurden Qiagen „Giga“ Säulen nach Angaben der Hersteller verwendet.

3.2.7.3 Eigenschaften der verwendeten cDNA Expressionsbibliothek

Die cDNA Expressionsbibliothek wurde von der Firma Clontech bezogen. Nach Angaben des Herstellers wurde die RNA aus Lungengewebe von zwei verstorbenen weiblichen Patienten im Alter von 24 und 32 Jahren isoliert (Clontech).

Nach Angaben der Firma Clontech enthalten 85 % der Hefevektoren (pACT2) in *E.coli* BNN132 *Eco*RI/*Xho*I inserierte cDNA Fragmente. Die Fragmentgröße variiert von 0,4 - 4,0 kb mit einer durchschnittlichen Fragmentgröße von 2,0 kb. Die cDNA Expressionsbibliothek enthält $3,3 \times 10^6$ unabhängige Klone. Zur Präparation der cDNAs wurde *E.coli* BNN132 auf Agarplatten kultiviert, vermehrt und die cDNA präpariert.

3.2.7.4 Titrieren der cDNA Expressionsbibliothek

Um den genauen Titer der cDNA vor der Amplifizierung der cDNA Expressionsbibliothek zu bestimmen, wurde zunächst ein Aliquot der Bakterien auf Eis getaut und zwei Verdünnungen in 1 ml LB Medium hergestellt (1:1.000 und 1:1.000.000). Anschließend wurden je 50 µl LB Medium auf LB/Amp Platten überführt und inkubiert (37 °C, 12-14 h). Die Anzahl der *E.coli* BNN132 Kolonien wurde entsprechend der Verdünnungen multipliziert. Dabei ergab sich ein Titer der Bakterien von $1,96 \times 10^9$ cfu/ml. Für die weitere Amplifizierung der Bibliothek konnte nun die Menge der einzusetzenden Bakterienklone kalkuliert werden.

3.2.7.5 Amplifizierung der cDNA Expressionsbibliothek

Zur Amplifizierung der Expressionsbibliothek wurde *E.coli* BNN132 in LB Medium entsprechend verdünnt und auf 250 LB/Amp Agar Platten (∅ 15 cm) plattiert. Dabei wurde jede Platte mit ca. 30.000-40.000 *E.coli* Kolonien kalkuliert. Letztlich wurde die

ca. dreifache Anzahl unabhängiger Klone der Expressionsbibliothek ausplattiert. Die Platten wurden inkubiert, bis die Kolonien annähernd konfluent waren (48 h, 30 °C). Die Platten wurden anschließend mit 5 ml LB/Amp Medium überschichtet und die Bakterien mit einem Glasspatel von der Platte entfernt. Die so gewonnenen Bakteriensuspension wurde in einen Glaskolben überführt und unter Schütteln inkubiert (4 h, 37° C). Anschließend erfolgte die Präparation der DNA Plasmide mit dem „Giga“ Kit (Qiagen). Insgesamt wurde 1,5 mg DNA präpariert, womit eine ausreichende Menge zur Transformation der Hefezellen für das „Yeast Two Hybrid“ System zur Verfügung stand.

3.2.7.6 Expression von GST Fusionsproteinen in *E.coli*

Zur Expression von GST-NS1 bzw. GST-NS2 Fusionsproteinen wurde der Bakterienstamm *E.coli* BL21(DE3) (Stratagene) verwendet. *E.coli* BL21(DE3) wurde mit pGEX-4T-1-NS1 bzw. pGEX-4T-1-NS2 transformiert. Weitere Transformanten exprimierten nur den entsprechenden Leervektor zur Synthese von GST.

Für die Etablierung des bakteriellen Expressionssystems wurden Transformanten auf Expression getestet, die die Fusionsproteine in ausreichenden Konzentrationen synthetisieren. Zunächst wurden mehrere Transformanten in 5 ml LB/Amp Medium bei 37 °C inkubiert. Nach Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD = 0,4-0,6) wurde die Expression der Fusions-cDNAs durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-thio-galaktosid (IPTG) induziert und 3-4 h inkubiert. 1,5 ml der Kulturen wurden anschließend in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert (14.000 Upm, 5 s) und in 300 µl eiskaltem PBS resuspendiert. 10 µl der resuspendierten Bakterien wurden mit SDS Probenpuffer versetzt und die Expression und Synthese auf einem PAA-Gel nach Färbung mit Coomassie R250 und Entfärbung des Gels mit Methanol/Essigsäure beurteilt. Die restlichen 290 µl der Bakteriensuspensionen wurden mit Ultraschall behandelt und dadurch lysiert. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (14.000 Upm, 5 min, 4 °C) und die Überstände mit 50 µl Glutathionagarose/PBS (Sigma Aldrich) versetzt. Durch Bindung des GST Fusionsanteils an Glutathionagarose wurden die Fusionsproteine aus dem Lysat gereinigt und anschließend im Coomassie R250 gefärbten Gel nachgewiesen. Hierbei wurden jeweils Klone identifiziert, die GST-NS1, GST-NS2 und GST in hohen Konzentrationen synthetisieren.

Diese Transformanten wurden anschließend verwendet, um die jeweiligen Fusionsproteine in größeren Mengen zu synthetisieren. Hierbei wurden zunächst 100 ml Vorkulturen der transformierten Bakterien ohne Zusatz von IPTG inkubiert (37 °C, 14-16 h). Anschließend wurden die Vorkulturen nach Erreichen der stationären Wachstumsphase in 1 l LB/Amp Medium verdünnt und 1 h inkubiert. Die Expression der pGEX-4T-1 Plasmide wurde durch Zugabe von 100 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden nach 6 h geerntet. Die Bakterienpellets wurden zentrifugiert (10 min, 5000 x g), jeweils in 20 ml eiskaltem PBS resuspendiert und durch Ultraschall lysiert. Die Lysate wurden mit Triton X-100 versetzt (Endkonzentration 1 %) und zentrifugiert (10 min, 10.000 x g, 4 °C). Die Überstände mit den löslichen rekombinanten Proteinen wurden mit jeweils 1 ml 50 % Glutathionagarose/PBS gemischt und zur Bindung der Proteine an Glutathionagarose geschüttelt. Anschließend wurde dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden dreimal mit 1 ml reduziertem Glutathion (50 mM Tris-Cl [pH 8,0], 5 mM reduziertes Glutathion) eluiert, die Überstände aliquotiert und bei –70 °C eingefroren. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden durch Western Blot mit Antikörpern gegen den GST Fusionsanteil nachgewiesen.

3.2.8 Arbeiten mit *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)

3.2.8.1 Anzucht von *S. cerevisiae*

YPD(A) Medium

2 % (w/v) Pepton
1 % (w/v) Hefeextrakt
(+ Adeninhemisulfat)
(2,5 % Bacto Agar,
bei Kultivierung auf Platten)
pH [5,8]

SD (Synthetic Dropout) Medium

6,7 % (w/v) Yeast Nitrogen Base
1 x sterile Dropout (DO) Lösung
2 % Glucose

10 x Dropout (DO) Lösung

300 mg/l	L-Isoleucin
1500 mg/l	L-Valin
200 mg/l	Adenin Hemisulfat
200 mg/l	L-Arginin HCl
200 mg/l	L-Histidin HCl Monohydrat
1000 mg/l	L-Leucin
300 mg/l	L-Lysin HCl
200 mg/l	L-Methionin

500 mg/l	L-Phenylalanin
2000 mg/l	L-Threonin
200 mg/l	L-Tryptophan
300 mg/l	L-Tyrosin
200 mg/l	L-Uracil

gelöst in ddH_2O

Glyzerinkulturen von AH109 wurden zur Anzucht auf YPDA Agarplatten ausgestrichen und inkubiert (30 °C, 48-69 h). Y187 wurde hingegen auf YPD Agarplatten inkubiert (30 °C, 48-96 h). 2-3 mm große Kolonien wurden in YPD(A) Flüssigkulturen überführt und bei 30 °C geschüttelt. Die Kultivierung von Hefetransformanten erfolgte auf „Synthetic Dropout“ (SD) Medien. Hierzu wurden SD-Agarplatten bzw. Flüssigmedien verwendet, denen die entsprechenden Aminosäuren (–Leu, –Trp) fehlten. Die Transformanten synthetisierten diese Aminosäuren aufgrund der durch pGBKT7 und pGADT7 komplementierten Gene *de novo*. Um bakterielle Kontaminationen zu vermeiden, wurde den SD- und YPD(A) Medien jeweils Kanamycin (200 µg/l) und Ampicillin (200 µg/l) zugesetzt.

Um Hinweise auf Protein-Protein Interaktionen zu erhalten, wurde AH109 nach Expression der GAL4 Fusionsproteine auf SD-Selektionsmedien kultiviert, denen zusätzlich Adenin und die Aminosäure Histidin fehlte (–Ade, –His, –Trp, –Leu). Um die Expression des *Mel*l Reportergens zu verfolgen, wurden die Platten zusätzlich mit x-α-Gal (20 mg/l) versetzt.

3.2.8.2 Präparation und Transformation kompetenter Hefezellen

PEG/LiAc Lösung	**TE-Puffer**	**LiAc/TE Puffer**
40 % Polyethylenglykol 4000 100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl [pH 7,5] 1 mM EDTA	10 mM Tris-HCl pH [7,5] 1 mM EDTA	100 mM Lithiumacetat 10 mM Tris-HCl pH [7,5] 1 mM EDTA

Die Transformation von Hefezellen mit entsprechenden Reportergenen erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode (75, 133).

2-3 mm große Hefekolonien wurden in 1 ml YPDA Medium inokuliert. Die Hefezellen wurden gemischt, die homogene Zellsuspension in 50 ml YPD Medium überführt und inkubiert (16-18 h, 30 °C, 250 Upm). Bei Erreichen der stationären Wachstumsphase (OD_{600}>1,5) wurde die Kultur in 300 ml YPD Medium verdünnt (OD_{600} = 0,2-0,3) und bei 30 °C und 230 Upm weiter kultiviert. Innerhalb der

logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} = 0,4-0,6) wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, RT, 1000 x g). Anschließend wurden die Zellen in 25 ml sterilem 1 x TE Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1000 x g). Nach Zugabe von 1,5 ml 1 x LiAc/1 x TE Puffer wurden je 100 µl der Hefezellen mit 100 ng Plasmid-DNA und 100 µg „Carrier"-DNA (Clontech) in einem separaten Reaktionsgefäß gemischt. Die Zellen wurden nach Zugabe von 0,6 ml PEG/LiAc Lösung 10 s gemischt. Nach 30 min Inkubation des Ansatzes (30 °C, 200 Upm) erfolgte die Zugabe von 70 µl DMSO. Die Zellen wurden 15 min bei 42 °C (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend 5 s bei 13.000 Upm zentrifugiert, das Pellet in 500 µl sterilem 1xTE Puffer resuspendiert und auf entsprechende SD-Selektionsagarplatten überführt. Nach vier bis sechs Tagen Inkubation (30 °C) bildeten sich sichtbare Transformanten.

3.2.8.3 Transformation von Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek

Bei der Transformation von BRSV NS1 exprimierenden Hefezellen (AH109 BRSV bNS1, *bait*) mit der cDNA Expressionsbibliothek aus Lungengewebe wurde 500 µg Plasmid DNA eingesetzt. Der AH109 BRSV bNS1 Hefestamm wurde auf SD-Agarplatten (-Trp) kultiviert (72 h, 30 °C). Anschließend wurden 150 ml Vorkultur mit einigen Hefekolonien beimpft und bis zur stationären Phase inkubiert (18 h, 30 °C, 250 Upm). Die Hefezellen wurden in 1 l YPDA Medium überführt und weitere 3 h geschüttelt (30 °C, 250 Upm). Nach Erreichen der logarithmischen Phase (OD_{600} = 0,6), wurden die Hefezellen aus 1 l Kulturvolumen geerntet und zentrifugiert (5 min, 1.000 x g, RT). Anschließend wurde das Pellet mit 500 ml TE-Puffer gewaschen und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Präparation kompetenter Hefezellen zunächst in 8 ml 1 x LiAc/1 x TE Puffer resuspendiert. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde die Plasmid DNA (500 µg) und die „Carrier“-DNA (20 mg) vorgelegt und die kompetenten Hefezellen mit der DNA gemischt. Das Gemisch wurde mit 60 ml PEG/LiAc-Lösung versetzt, gemischt und weitere 30 min inkubiert (30 °C, 250 Upm). Vor dem Hitzeschock wurden 7 ml DMSO zugesetzt und 15 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Die Hefezellen wurden anschließend 2 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (5 min, RT, 1000 x g). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 ml YPDA Medium resuspendiert. Die

Hefetransformanten wurden auf 150 SD-Agarplatten (∅ 15 cm, –Trp,–Leu,–Ade, –His) überführt. Die Transformationseffizienz wurde auf –Trp, –Leu SD-Selektionsagarplatten überprüft, indem 10 µl der Hefezellsuspension ausplattiert wurden.

3.2.8.4 Selektion positiver Hefetransformanten

Da es bei der Transformation der Hefezellen üblicherweise zur Transformation mehrerer unterschiedlicher cDNA Plasmide pro Hefezelle kommen kann, wurden positive Transformanten nach Transformation der Expressionsbibliothek erneut selektiert. Dieser Schritt war nötig, um sicher zu stellen, dass es sich bei den präparierten Plasmiden um das korrekte Plasmid handelt, dessen Genprodukt die Interaktion verursacht. Hierzu wurden Verdünnungsausstriche der Hefeklone auf SD-Agarplatten (–Trp, –Leu) in Anwesenheit von x-α-Gal (20 mg/l) durchgeführt und 2-4 Tage inkubiert (30 °C). Positive Transformanten, die das Substrat in den Platten hydrolysierten, wurden erneut auf Agarplatten überführt, verdünnt und selektierte Hefeklone zur Plasmid Präparation in 2 ml SD-Medium (–Trp, –Leu) überführt.

3.2.8.5 Präparation von Plasmid DNA aus Hefezellen

Aufschlusspuffer

100 mM NaCl
10 mM Tris-HCl [pH 8.0]
1 mM EDTA
1 % SDS
2 % Triton X-100

Für die Präparation der Plasmide aus Hefezellen wurde ein Protokoll nach Hoffman und Winston verwendet (78). Hefeklone mit Plasmiden aus der cDNA Expressionsbibliothek, die Wachstum und Blaufärbung auf SD-Selektionsagarplatten zeigten, wurden bis zur stationären Phase in 2 ml SD-Selektionsmedien kultiviert (16-18 h) und anschließend zentrifugiert (5 s, 13.000 Upm). Die Zellen wurden im verbliebenen Medium resuspendiert und 200 µl Aufschlusspuffer, 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Verhältnis 25:24:1) und 0,3 g Glasperlen (∅ 400 µm, säurebehandelt; Sigma) zugegeben. Die Hefezellen wurden anschließend 5 min gemischt und dabei lysiert. Die Proben wurden 5 min bei 13.000 Upm zentrifugiert, wobei die Zelltrümmer pelletierten. Nach Ethanolfällung der DNA aus

dem Überstand wurde 1 µl der gewonnenen DNA für die Elektroporation von *E.coli* XL1 blue eingesetzt. Die DNA wurde nach Kultivierung aus transformierten Bakterien isoliert.

3.2.8.6 Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität

Puffer Z/x-Gal

60 mM Na_2HPO_4
40 mM NaH_2PO_4 [pH 7,0]
10 mM KCl
4 mM $MgSO_4$
0,8 mM x-Gal gelöst in N,N Dimethylformamid
45 mM β-Mercaptoethanol

3.2.8.6.1 Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität auf Nitrozellulosefiltern

Mit diesem Test wurde β-Galaktosidaseaktivität qualitativ nachgewiesen. Durch enzymatische Hydrolyse des Substratanalogons 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galaktopyranosid (x-Gal) entsteht ein Indoxylderivat, das durch Luftsauerstoff zu einem blauen Indigofarbstoff oxidiert.

Positive Transformanten, die im genetischen Selektionssystem eine Blaufärbung des Agars durch Hydrolyse des x-α-Gal zeigten, wurden erneut auf Selektionsmedien kultiviert. Nach vier bis sechs Tagen Inkubation bei 30 °C wurden Whatman Filter auf den Agarplatten plaziert. Die Kolonien blieben an den Filtern haften und wurden durch kurzes Einfrieren der Filter in flüssigem Stickstoff und Tauen bei RT aufgeschlossen. Die Nitrozellulosefilter mit den aufgeschlossenen Hefekolonien wurden auf geeignete, in Puffer Z/x-Gal Lösung getränkte Papiere (Whatman) plaziert und die aufgeschlossenen Hefekolonien wurden auf den Whatman Papieren bei 30 °C inkubiert. Die Kolonien wurden in Abständen von 15 min auf eine Blaufärbung kontrolliert.

3.2.8.6.2 Quantitativer Nachweis der β-Galaktosidaseaktivität

Dieser Test dient zum quantitativen Nachweis von β-Galaktosidase. Durch enzymatische Hydrolyse der glykosidischen Bindung des ONPGs wird o-Nitrophenol gebildet und das Nitrophenolat kann bei einer Wellenlänge von 420 nm quantitativ erfasst werden.

Die zu analysierenden Hefekolonien wurden in 5 ml Selektionsmedium 16-18 h kultiviert (30 °C, 250 Upm). Nach Erreichen der stationären Phase, wurden 2 ml der Kultur in 10 ml YPDA Medium verdünnt und für weitere 3-5 h inkubiert (30 °C, 230 Upm). Innerhalb der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} = 0,5-0,8) wurde jede Hefekultur in jeweils drei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und anschließend in der Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert (13.000 Upm, 30 s, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Hefezellen nach Zugabe von 1,5 ml Puffer Z resuspendiert und zentrifugiert (1 min, 13.000 Upm, Eppendorf Tischzentrifuge). Der Überstand wurde erneut verworfen und die Hefezellen in 300 µl Puffer Z resuspendiert. 100 µl der Hefezellen wurden jeweils in separate 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 1 min in flüssigem N_2 gefroren. Anschließend wurden die Hefezellen im Wasserbad bei 37 °C vollständig getaut und dabei lysiert. Dieser Vorgang wurde zwei bis dreimal wiederholt und der Aufschluss der Hefezellen mikroskopisch auf Vollständigkeit überprüft. Als Negativkontrolle wurden statt der entsprechenden Hefekultur 100 µl Puffer Z in die enzymatische Reaktion eingesetzt. Die aufgeschlossenen Hefezellen und die Negativkontrolle wurden anschließend mit 700 µl Puffer Z/45 mM β-Mercaptoethanol versetzt, die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 160 µl 40 mM ONPG (o-Nitrophenyl β-D-galaktopyranosid gelöst in Puffer Z pH [7,0]) gestartet und bei 30 °C im Wasserbad durchgeführt. Nach Entwicklung der charakteristischen gelben Farbe durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung des ONPGs, wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 1 M Na_2CO_3 gestoppt und die Inkubationszeit protokolliert. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm) wurden die Überstände in 1 ml Küvetten überführt und die OD_{420} der Proben im Photometer bestimmt. Für jede Hefekultur wurde die OD_{420} aus drei getrennten Reaktionen gemessen und der Mittelwert bestimmt.

Eine Enzymeinheit entspricht der Menge an β-Galaktosidase, die 1 µmol ONPG pro min pro Zelle zu o-Nitrophenol und D-Galaktopyranosid hydrolysiert (113). Die

gemessenen Werte wurden durch folgende Formel in β-Galaktosidase Enzymeinheiten umgerechnet: 1.000 x OD_{420}/(t x V x OD_{600}).

t = Reaktionszeit V = Verdünnungsfaktor (= 5) OD_{600} = OD_{600} einer 1 ml Kultur (≡ Anzahl der Zellen)

3.2.8.7 Präparation denaturierter Proteinextrakte aus Hefezellen

8 M Harnstoff
40 mM Tris-HCl [pH 6,8]
0,1 mM EDTA
5 % w/v SDS
0,4 % Bromphenolblau
Proteaseinhibitoren Complete™
45 mM PMSF
0,167 mM β-Merkaptoethanol

Rekombinante Proteine wurden nach der SDS/Harnstoffmethode aus Hefezellen präpariert (125). 5 ml Kulturen der transformierten Hefezellen wurden in entsprechenden SD-Medien bis zur stationären Wachstumsphase kultiviert (30 °C, 250 Upm). Die Vorkulturen wurden nach Erreichen der stationären Wachstumsphase in 50 ml YPDA Medium überführt. Anschließend wurden die Hefezellen 3-5 h kultiviert (30 °C, 230 Upm). In der Mitte der logarithmischen Phase (OD_{600} = 0,4-0,6) wurden die Hefezellen in mit Eis gefüllte 100 ml Zentrifugenbecher überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1000 x g, 4 °C) und erneut in 50 ml eiskaltem H_2O resuspendiert und zentrifugiert. Die pelletierten Hefezellen wurden in 60 °C vorgewärmtem Aufschlusspuffer lysiert. Die zugegebene Menge Aufschlusspuffer wurde der Kulturdichte entsprechend normiert. Hierzu wurde die OD_{600} von 1 ml der Hefekultur bestimmt und mit dem gesamten Kulturvolumen (in ml) multipliziert. Für eine OD_{600} von 7,5 wurden 100 µl Aufschlusspuffer zugegeben. Die in Aufschlusspuffer resuspendierten Kulturen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und mit 0,3 g Glasperlen (Sigma) vereinigt. Die Proben wurden 10 min auf 70 °C erhitzt, gemischt und fünf Minuten bei 13.000 Upm und RT zentrifugiert. Der Überstand, der die löslichen Proteine enthielt, wurde abgenommen. Die im Pellet enthaltenen Zelltrümmer wurden mit dem verbliebenen Aufschlusspuffer 5 min auf 100°C erhitzt. Nachdem die Zelltrümmer erneut pelletiert wurden (5 min, 13.000 Upm, RT), konnte der zweite Überstand abgenommen und mit dem ersten vereinigt werden.

3.2.9 Herstellung rekombinanter Plasmide

3.2.9.1 Konstruktion von EGFP-C3-NS1-N

Um die Lokalisation der NS-Proteine zu analysieren, wurde ein Fusionskonstrukt kloniert, das EGFP in Fusion mit NS1 und BRSV N exprimiert. Um interne Initiation der Translation zu vermeiden, wurden die Startkodons des BRSV NS1 und N mutiert (Met→Ala).

Zunächst wurde BRSV NS1 mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: AAATTA*AAGCT T*G*C*GGGCAGTGAAACATTGAGTGTA, 3´ Primer: GCAATA*GAATTC*GCGGCTCT TAGCAAGGTCAAACTA) und das PCR Produkt mit den Enzymen *Hind*III und *Eco*RI geschnitten.

Die BRSV N cDNA wurde ebenfalls mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: GCAATA*GAATTC*G*C*GGCTCTTAGCAAGGTCAAACTA, 3´ Primer: AAATT*CCCG G*TCACAATTCCACATCATTATC), *Eco*RI/*Xma*I geschnitten und die NS1 und N cDNA Fragmente zusammen in dem *Hind*III/*Xma*I geschnittenen Vektor ligiert.

3.2.9.2 Konstruktion von GAL4-NS Hefeexpressionsplasmiden

3.2.9.2.1 Konstruktion von pGBKT7-BRSV NS1 und NS2

Für die Etablierung des „Yeast Two Hybrid“ Systems wurden zunächst die BRSV NS1 und NS2 cDNAs in Hefe Expressionsplasmide ligiert, um GAL4 Fusionsproteine in Hefe zu synthetisieren. Hierzu wurde BRSV NS1 aus einem Subklon mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: CGAATA*CCATGG*GCAGTGAAACATTGAG, 3´ Primer: GCAA TA*GAATTC*CTAATTCAGACCAAGAAG), das erhaltene PCR Produkt mit *Nco*I/*Eco*RI geschnitten und in pGBKT7 ligiert (*bait* Konstrukt). BRSV NS2 wurde analog mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: GCAATA*TCATGA*GCACCCCAAATCCCGAA, 3´ Primer: GCAATA*GAATTC*CTATGGATTTAAATCATA), mit den Enzymen *Bsp*HI und *Eco*RI geschnitten und in den *Nco*I/*Eco*RI geschnittenen pGBKT7 Vektor ligiert. Die resultierenden Konstrukte exprimierten cDNAs in Hefe für virale NS-Proteine in Fusion mit der GAL4 Bindungsdomäne.

3.2.9.2.2 Konstruktion von pGBKT7-HRSV NS1 und NS2

Die Klonierung der cDNAs für HRSV NS-Proteine erfolgte durch Amplifizierung der cDNAs durch PCR (5´ Primer: ATTGA*CCATGG*GCAGCAATTCATT, 3´ Primer: ATTGA*GAATTC*TTATGGATTAAGATCAAA, HRSV NS1; 5´ Primer: ATTGA*CC ATGG*ACACAACCCACA, 3´Primer: ATTGA*GAATTC*TTATGGATTGAGATCATA, HRSV NS2). Die PCR Produkte wurden jeweils mit den Enzymen *Nco*I und *Eco*RI geschnitten und in den Vektor pGBKT7 ligiert.

3.2.9.2.3 Konstruktion von pGBKT7-PVM NS1 und NS2-

Die cDNAs für NS-Proteine des PVM wurden mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: CGAATA*CCATGG*GCTGTATGATGAGT, 3´ Primer: AATGATATC*GAATTC*TTAAG C GTAATCTGGTACATCATAAGGATAACC, PVM NS1; 5´ Primer: CGAATA *ACATGT*C CACAGCTATGAACAAG, 3´ Primer: AATGATATC*GAATTC*TCATTTATCGTGATCAT CTTTATAGTCATCATCATCCTCATC, PVM NS2), die PCR Produkte *Nco*I/*Eco*RI (mNS1) bzw. *Afl*II/*Eco*RI (mNS2) geschnitten und in den *Nco*I/*Eco*RI geschnittenen Vektor pGBKT7 ligiert.

3.2.9.2.4 Konstruktion von pGADT7-NS1 und NS2

Um Interaktionen der NS-Proteine in Hefe untersuchen zu können, wurden die cDNAs der unterschiedlichen NS-Proteine in den Vektor pGADT7 kloniert. Da pGBKT7 (*bait*) und pGADT7 (*prey*) jeweils eine kompatible MCS besitzen, wurden die cDNAs der verschiedenen NS-Proteine aus pGBKT7 in pGADT7 umkloniert. BRSV NS1 und NS2 cDNAs wurden mit *Nde*I und *Eco*RI aus pGBKT7 geschnitten und an identische Restriktionsschnittstellen in pGADT7 ligiert.

HRSV NS cDNAs wurden mit *Nde*I/*Bam*HI aus pGBKT7 geschnitten und in pGADT7 ligiert.

Die Umklonierung der PVM NS cDNAs in pGADT7 erfolgte durch Restriktion des pGBKT7 Vektors mit *Nde*I/*Eco*RI. Die cDNAs wurden anschließend in den *Nde*I/*Eco*RI geschnittenen pGADT7 Vektor ligiert.

Diese Konstrukte wurden zur Expression von NS-Proteinen in Fusion mit der GAL4 Aktivierungsdomäne verwendet

3.2.9.2.5 Konstruktion von pGADT7 Plasmiden mit Fragmenten aus der Bibliothek

Zur weiteren Charakterisierung der isolierten cDNAs bzw. deren Genprodukte aus der Expressionsbibliothek wurden die cDNAs mit Protein-kodierenden Sequenzen aus pACT2 Vektoren in den Vektor pGADT7 subkloniert. pGADT7 exprimiert Fusionsproteine mit N-terminal fusioniertem HA-Epitop. Da die beiden Vektoren keine kompatiblen MCSs besitzen, wurden hierzu die unterschiedlichen pACT2 Plasmide mit den Fragmenten von Interesse zunächst mit *Eco*RI geschnitten und die 5´ Enden mit *Klenow* Polymerase aufgefüllt. Nach Restriktion mit *Xho*I wurden die Fragmente in den *Sma*I/*Xho*I geschnittenen Vektor pGADT7 ligiert.

3.2.9.3 Konstruktion von pGEX-4-T1-BRSV NS1 und NS2

Zur Synthese von GST Fusionsproteinen wurden die BRSV NS1 und NS2 cDNAs stromabwärts der GST cDNA in den Vektor pGEX-4-T1 kloniert. Hierzu wurden NS1 und NS2 cDNAs aus pGBKT7 zunächst mit *Nde*I geschnitten und die 5´ Enden mit *Klenow* Polymerase aufgefüllt. Anschließend wurden die cDNAs mit *Xho*I geschnitten und in den *Sma*I/*Xho*I geschnittenen Vektor pGEX-4-T1 ligiert.

3.2.9.4 Konstruktion von Gesamtklonen isolierter cDNAs

Da im „Yeast Two Hybrid“ System cDNA Fragmente der entsprechenden Proteine erhalten werden, wurden Gesamtklone mittels RT-PCR hergestellt, die das authentische Protein exprimieren und synthetisieren sollten. Die cDNAs wurden zunächst in den Vektor pTIT ligiert, der eine Expression der cDNAs in BSRT7-5 Zellen ermöglicht. Für die RT PCR wurde RNA aus HeLa Zellen verwendet.

3.2.9.4.1 Konstruktion von pTIT-β-COPI

Diese cDNA wurde in zwei Fragmenten amplifiziert. Durch RT-PCR wurden die flankierenden Schnittstellen *Bsp*HI und *Sac*I in die 5´ Hälfte der cDNA eingeführt (Primer: CCAGAAA*TCATGA*CGGCGG, 3´ Primer: CCATCAGAAA*GAGCTC*GTTTTA TTCGC) *Bsp*HI ist kompatibel mit der *Nco*I Schnittstelle des pTIT Plasmids. Die 3´ Hälfte der cDNA wurde mit Primern mit den Schnittstellen *Sac*I und *Xma*I

amplifiziert (5´ Primer: GCGAATAAAA*GAGCTC*TTTCTGATGG, 3´ Primer: TCCA *CCCGGG*TTATGAATAGATCTGTTTATTG). Mit einer 3 Fragment Ligation wurde die cDNA in den *Nco*I/*Xma*I geschnittenen Vektor pTIT ligiert.

3.2.9.4.2 Konstruktion von pTIT-RanBP16

Aufgrund der Größe von RanBP16 wurden ebenfalls zwei cDNA Fragmente amplifiziert. Das 5´ Ende der cDNA wurde mit Primern mit den Schnittstellen *Nco*I und *Bst*EII amplifiziert (5´ Primer:GCA*CCATGG*CGGATCATGTGC, 3´ Primer CCTGA*GGTCACC*AAAGCC), das 3´ Ende der cDNA wurde mit flankierenden Primern mit den Schnittstellen *Bst*EII und *Xma*I amplifiziert und das PCR Produkt geschnitten (5´ Primer: GGCTTT*GGTGACC*TCAGGAG, 3´ Primer: ATAT*CCCGGG* TCAGCTCATCATGTCATTGC). Mit einer 3 Fragment Ligation wurde die cDNA in den *Nco*I/*Xma*I geschnittenen Vektor pTIT ligiert.

3.2.9.4.3 Konstruktion von pTIT-MM-1

Da der MM-1 cDNA aus der Bibliothek nur wenige 5´terminale Nukleotide fehlten, wurden diese mit einem Primer ergänzt und direkt vom pACT2 Plasmid amplifiziert (5´ Primer:TACA*CCATGG*GGGGTTGATGTCATGACTGTAGTCGGCCTTCCCAACA TGGCGCAGTCTATTAACATCACGGAGCTGAATCTGCCGC, 3´ Primer: TATAT*GAC GTC*GCAAAACTCTCAGGCC). Durch PCR wurden für die Klonierung die Schnittstellen *Nco*I und *Pst*I eingeführt, das PCR Produkt entsprechend geschnitten und in pTIT ligiert.

3.2.9.4.4 Konstruktion von pTIT-p68

Die p68 cDNA wurde durch RT-PCR amplifiziert. Mit Primern wurden die Schnittstellen *Afl*III und *Eco*RV eingeführt. *Afl*III ist kompatibel mit der Schnittstelle *Nco*I des pTIT Plasmids. Nach Amplifizierung und enzymatischem Verdau des RT-PCR Produkts (5´ Primer: GACG*ACATGT*CGGGTTATTCG, 3´ Primer: ATA*GATATC* TTATTGGGAATATCCTGTTGG) wurde das Fragment in den *Nco*I/*Eco*RV geschnittenen Vektor pTIT ligiert.

3.2.9.5 Konstruktion von c-myc fusionierten cDNAs

Für die meisten identifizierten Proteine standen keine Antikörper zur Verfügung, weshalb die Expression von Fusions-cDNAs eine geeignete Alternative darstellte. Um die Lokalisation der identifizierten Proteine in Zellen zu analysieren, wurden die cDNAs mit der kodierenden Sequenz für das c-myc Epitop fusioniert. Dieses Epitop lässt sich nach Expression sehr gut mit Antikörpern nachweisen. Um ausschließlich Fusionsproteine zu erhalten, wurden mittels PCR die Startkodons mutiert (ATG→GCG) und die PCR Produkte in pTIT ligiert.

3.2.9.6 Konstruktion von pTIT-myc-CDK4BP

Da der aus der Expressionsbibliothek isolierte cDNA Klon die gesamte kodierende Region umfasste, wurde diese cDNA direkt durch PCR vom Plasmid pACT2 amplifiziert. Hier wurden durch PCR die flankierenden Schnittstellen *Bsp*HI und *Eco*RI eingeführt und in pTIT ligiert (5´ Primer: ATAT*TCATGA*TGGAGGA GCAG AAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGGCGCTGAGCAAGGGTCTGAAGCGG, 3´ Primer: ATAT*GAATTC*TCAGCGCCCTGGCCCCGGCGG). Die CDK4BP cDNA wurde zusätzlich mit der kodierenden Sequenz für das c-myc Epitop fusioniert.

3.2.9.7 Konstruktion von pTIT-myc-βCOPI

Die βCOPI cDNA wurde von der Matrize pTIT-βCOPI zur Klonierung der c-myc fusionierten cDNA amplifiziert (5´ Primer: TATAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGAT CTCAGAGGAGGACCTGG*C*GACGGCGGCTGAGAACGTATGC, 3´ Primer: TCCA *CCCGGG*TTATGAATAGATCTGTTTATTG) und die *Nco*I und *Xma*I geschnittene cDNA in pTIT ligiert.

3.2.9.8 Konstruktion von pTIT-myc-RanBP16

Um das Fusionskonstrukt für RanBP16 herzustellen, wurde durch PCR die Sequenz für das c-myc Epitop eingeführt. Als Matrize für die PCR diente das Konstrukt pTIT-RanBP16 (5´ Primer:TTAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGATCTCAAAGGAGGACC GGCGG*C*GGATCATGTCCAGAGCCTG, 3´ Primer: ATAT*CCCGGG*TCAGCTCATC

ATGTCATTGC) Das PCR Produkt wurde *Nco*I und *Xma*I geschnitten und in den Vektor pTIT ligiert.

3.2.9.9 Konstruktion von pTIT-myc-MM-1

Die MM-1 cDNA wurde mit entsprechenden Primern von pTIT-MM1 amplifiziert (5´ Primer:TTAT*CCATGG*AGGAGCAGAAGCTGATCTCAGAGGAGGACCTGG*C*G GGGGTTGATGTCATGACTGTA, 3´ Primer: TATATGACGTCGCAAAACTCTCAGGC C). Das PCR Produkt wurde mit den Enzymen *Nco*I und *Pst*I geschnitten und in pTIT ligiert.

3.2.9.10 Konstruktion von EGFP Fusionskonstrukten

Um die Analyse der Kolokalisationen der NS- und interagierenden Proteinen zu vereinfachen, wurden EGFP Fusionskonstrukte kloniert und die Lokalisation der Proteine in Zellen mit den c-myc Epitop fusionierten Proteinen verglichen. Hierbei sollte sich herausstellen, ob EGFP die Lokalisation der Proteine beeinflussen kann. Zur Klonierung wurde der EGFPC3 Vektor (Clontech) verwendet. Für die Klonierung wurden die Startkodons ebenfalls mutiert (ATG→GCG), um ausschließlich Fusionsproteine zu erhalten. Da die Expression durch den CMV Promotor vermittelt wird, können diese Konstrukte zudem in jeder verwendeten Zelllinie exprimiert werden.

3.2.9.10.1 Konstruktion von EGFPC3-CDK4BP

Die CDK4BP cDNA wurde von dem Konstrukt pTIT-myc-CDK4BP amplifiziert (5´ Primer: ATAT*CTCGAG*GCGCTGAGCAAGGGTCTGAAGCGG, 3´ Primer: ATAT *GAATTC*TCAGCGCCCTGGCCCCGGCGG). Nach enzymatischem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xma*I wurde das PCR Produkt in den Vektor EGFPC3 ligiert.

3.2.9.10.2 Konstruktion von EGFPC3-βCOPI

Die βCOPI cDNA wurde von dem Konstrukt pTIT-βCOPI amplifiziert (5´ Primer: ATAT*CTCGAG*G*C*GACGGCGGCTGAGAACGTATGC, 3´ Primer: TCCA*CCCGGG*T TATGAATAGATCTGTTTATTG). Nach Restriktion mit den Enzymen *Xho*I und *Xma*I wurde das PCR Produkt in den Vektor EGFPC3 ligiert.

3.2.9.10.3 Konstruktion von EGFPC3-RanBP16

Die RanBP16 cDNA wurde von pTIT-RanBP16 zunächst mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: AATA*CTCGAG*G*C*GGCGGATCATGTGCAGAGCCTG, 3´ Primer: ATAT *CCCGGG*TCAGCTCATC ATGTCATTGC), das PCR Produkt mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xma*I geschnitten und in den Vektor EGFPC3 ligiert.

3.2.9.10.4 Konstruktion von EGFPC3-MM-1

Die MM-1 cDNA wurde von pTIT-MM-1 zunächst mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: AATA*CTCGAG*G*C*GGGGGTTGATGTCATGACTGTA, 3´ Primer: TATATGACGTCG CAAAACTCTCAGGCC), das PCR Produkt mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Pst*I geschnitten und in den Vektor EGFPC3 ligiert.

3.2.9.10.5 Konstruktion von EGFPC3-p68

Die p68 cDNA wurde von pTIT-p68 zunächst mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: ATAA*CTCGAG*G*C*GTCGGGTTATTCGAGTGACCGA, 3´ Primer: ATAT*CCCGGG*T TATTGGGAATATCCTGTTGG), mit den Restriktionsenzymen *Xho*I und *Xma*I geschnitten und in den Vektor EGFPC3 ligiert.

3.2.9.11 Klonierung von modifizierten BRSV Antigenomen

Um den Einfluss der identifizierten Proteine auf das Wachstum von BRSV zu charakterisieren, wurden cDNA Antigenome der Viren kloniert, die zusätzlich das Gen des entsprechenden interagierenden Proteins exprimierten. Hierzu wurden zunächst Wildtyp-Viren kloniert, die die entsprechenden RNAs am 3´ terminalen Ende des Virusgenoms exprimierten. Um die zellulären Konzentrationen der Proteine

zu verändern, wurden Viren kloniert, die die mRNA der fremden Proteine exprimieren und somit die zelluläre Proteinkonzentration erhöhen. Andererseits wurden Viren konstruiert, die die komplementäre RNA exprimieren und durch Hybridisierung mit der zellulären mRNA die Translation inhibieren sollten und daher die Proteinkonzentration in Zellen dementsprechend vermindern sollten. Zur spezifischen Termination der Transkription vom Virusgenom wurde hierzu eine Stop/Start-Gengrenze amplifiziert und 3´ proximal des NS1 Gens im Vektor pSKII– inseriert. In einem weiteren Schritt wurden die entsprechenden cDNAs stromaufwärts dieser Gengrenze kloniert. Durch enzymatischen Verdau des Vektors an flankierenden Restriktionsschnittstellen (*Not*I/*Kpn*I) wurde die cDNA des zusätzlichen Gens sowie die NS1/2 cDNAs in den Gesamtklon inseriert. Das resultierende Virus exprimierte demnach die zusätzliche cDNA als erstes Gen nach Infektion der Zellen (Abb. 2 und Abb. 8)

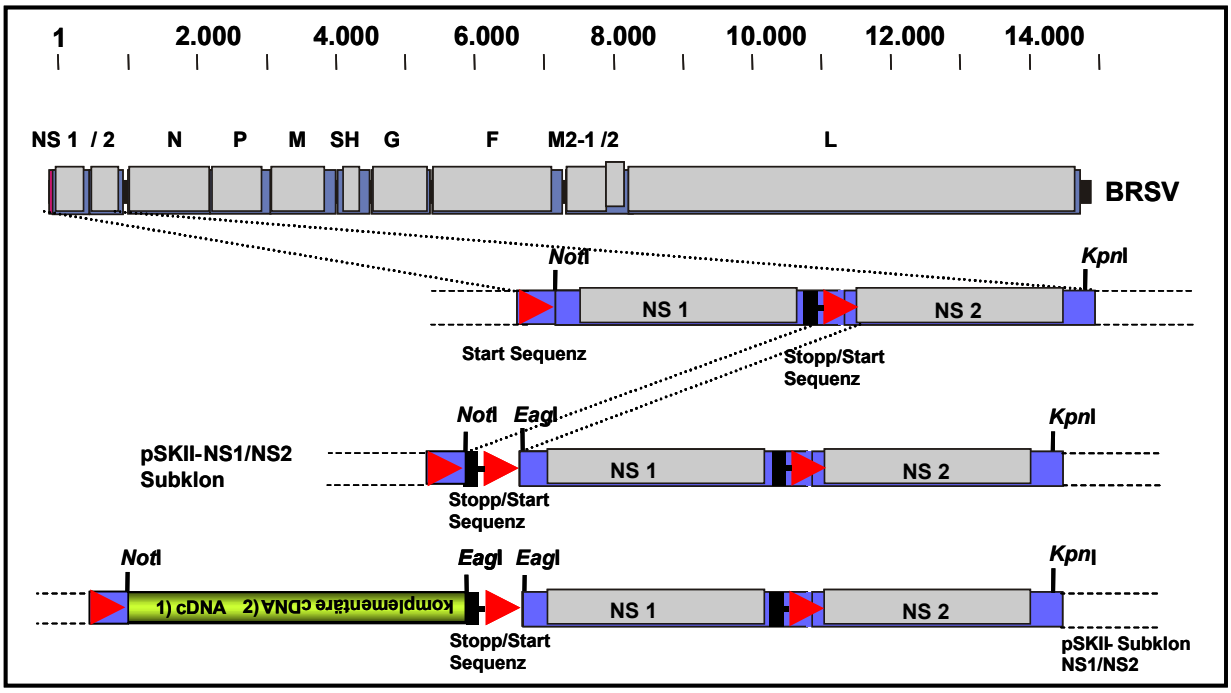


Abb. 8 Klonierungsschema zur Klonierung modifizierter BRSV Antigenome.

Die zusätzliche Stop/Start Gengrenze zwischen BRSV NS1 und NS2 wurde amplifiziert und in den pSKII– NS1/NS2 Subklon ligiert (*Not*I/*Eag*I). Durch Restriktion der singulären Schnittstelle *Not*I in pSKII– NS1/NS2-Stop/Start konnte das entsprechende *Not*I/*Eag*I geschnittene PCR Produkt, das die Sequenz für zelluläre Proteine kodierte, in den Subklon ligiert werden. Der resultierende pSKII– NS1/NS2-Stop/Start Subklon, der nun neben der identisch verdoppelten Stop/Start-Gengrenze die cDNA zellulärer Proteine kodierte, wurde mit Enzymen an den singulären *Not*I und *Kpn*I Schnittstellen geschnitten. Das erhaltene cDNA Fragment wurde anschließend in den BRSV cDNA Gesamtklon ligiert, der zuvor mit identischen Enzymen geschnitten wurde (s.u.).

3.2.9.11.1 Konstruktion von pSKII– NS1/NS2 mit zusätzlicher Stop/Start Gengrenze (pSKII– NS1/NS2-Stop/Start)

Für die Konstruktion des Subklons pSKII–NS1/NS2, der die zusätzliche Gengrenze kodieren sollte, wurde dieses Konstrukt zunächst als Matrize zur PCR Amplifizierung verwendet (5´ Primer: AAAAGAAAA*GCGGCCGC*CTAAATCAATAGCCAACACCAGA TGG, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG*GGCTGGTTGGGGAACTGATTT). Die amplifizierte Gengrenze wurde mit den Enzymen *Not*I und *Eag*I geschnitten und ungerichtet in den mit *Not*I geschnittenen Subklon ligiert. Nach Überprüfung der korrekten Orientierung, wurde die Plasmid DNA für weitere Klonierungsschritte in größeren Mengen präpariert. Das resultierende Konstrukt wurde weiterhin als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start bezeichnet.

3.2.9.12 Konstruktion EGFP exprimierendem BRSV

3.2.9.12.1 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start EGFP

Zur Herstellung von BRSV, das stromaufwärts der NS Gene eine zusätzliche RNA exprimiert, wurde zunächst ein Antigenom mit EGFP kodierenden Sequenzen kloniert. Hierzu wurde in einem ersten Klonierungsschritt die EGFP cDNA aus pEGFPC3 durch PCR amplifiziert (5´ Primer: AAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCC CCTCTCTTCTTTCTACAGAAAATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG, 3´ Primer: ATAT *CGGCCG*TTACTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCC). Das PCR Produkt wurde mit den Enzymen *Not*I und *Eag*I geschnitten und in den *Not*I geschnittenen pSKII–NS1/NS2-Stop/Start Vektor ligiert. Der Subklon wurde weiterhin als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-EGFP bezeichnet.

3.2.9.12.2 Konstruktion von prBRSV EGFP

pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-EGFP wurde zur Herstellung des Gesamtklons mit den Enzymen *Not*I und *Kpn*I geschnitten und das Fragment gerichtet in den *Not*I/*Kpn*I geschnittenen pBRSV Gesamtklon ligiert. Das resultierende BRSV cDNA Plasmid wurde anschließend als prBRSV-EGFP bezeichnet.

3.2.9.13 Konstruktion von MM-1 exprimierenden BRSV

3.2.9.13.1 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start EGFP-MM-1

Zur Herstellung rekombinanter Viren, die die EGFP-MM-1 mRNA überexprimierten, wurde zunächst pSKII–NS1/NS2-Stop/Start mit *Not*I an der singulären Schnittstelle geschnitten. EGFP-MM-1 wurde von dem Konstrukt EGFPC3-MM-1 mittels PCR amplifiziert. Da nicht bekannt ist, welchen Einfluss die Nukleotide von der *Not*I Schnittstelle, bis zum NS1 Startkodon auf die Genexpression im parenteralen BRSV Gesamtklon haben, wurden diese Nukleotide für die zusätzlichen cDNAs durch PCR hinzugefügt (5´ Primer:AAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCCTCTCTTCTTTCTACAGA AAATGGTGGCAAGGGCGAGGAG, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG*TCAGGCCTTAG CA GTAGCCTG). Das PCR Produkt wurde *Not*I/*Eag*I geschnitten und ungerichtet in die *Not*I Schnittstelle des pSKII–NS1/NS2-Stop/Start Vektors ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-EGFP-MM-1 bezeichnet.

3.2.9.13.2 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start MM-1as

Analog zur Klonierungsstrategie des pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-EGFP-MM-1, wurde die MM-1 cDNA in 3´-5´ Orientierung mittels PCR amplifiziert und in den pSKII–NS1/NS2-Stop/Start Subklon ligiert (5´ Primer: AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCT CTCTTCTTTCTACAGAAATCAGGCCTTAGCAGTAGCC, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG* GATGGGGGTTGATGTCATGACTGTAG). Das Konstrukt wurde als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-MM-1as bezeichnet.

3.2.9.13.3 Konstruktion von prBRSV EGFP-MM-1 und prBRSV-MM-1as

pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-EGFP-MM-1 wurde zur Herstellung des Gesamtklons mit den Enzymen *Not*I/*Kpn*I geschnitten und das Fragment gerichtet in den *Not*I/*Kpn*I geschnittenen pBRSV Gesamtklon ligiert. Das resultierende BRSV cDNA Plasmid wurde anschließend als prBRSV-EGFP-MM-1 bezeichnet.

pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-MM-1as wurde mit identischen Enzymen geschnitten und ebenfalls in den pBRSV Gesamtklon ligiert. Das Konstrukt wurde weiterhin als prBRSV-MM-1as bezeichnet.

3.2.9.14 Konstruktion von prBRSV-p68 Antigenomen

3.2.9.14.1 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{s}

Zur Expression von p68 vom BRSV Genom wurde zunächst die kodierende Sequenz in den Subklon pSKII–NS1/NS2-Stop/Start ligiert. Hierzu wurde die p68 cDNA in einem ersten Schritt mittels PCR von pTIT-p68 mit internen Primern amplifiziert. Da sich wenige Nukleotide stromabwärts des Startkodons eine weitere *Eag*I Schnittstelle befindet, wurde mit Primern in diese Schnittstelle eine stille Mutation eingeführt, so dass die Restriktion mit *Eag*I an dieser Stelle nicht mehr möglich war (5´ Primer:TTCTACAGAAAGCGTCGGGTTATTCGAGTGACGAGACCGCGGG*CGG GACC, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG*TTATTGGGAATATCCTGTTGGGATTGG) In einem weiteren Schritt wurde dieses PCR Produkt mit externen Primern amplifiziert (5´ Primer: AAAAGGAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAGAAAATGTCGG GTTATTCG, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG*TTATTGGGAATATCCTGTTGGGATTGG). Diese beiden PCR Schritte waren nötig, da mit Primer der gesamten Länge kein PCR Produkt erhalten wurde. Das erhaltene PCR Produkt wurde mit den Enzymen *Not*I und *Eag*I geschnitten und in den pSKII–NS1/NS2-Stop/Start Subklon in die *Not*I Schnittstelle ligiert. Das erhaltene Konstrukt wurde als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{s} bezeichnet.

3.2.9.14.2 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{AUG*}

Analog zur Klonierungsstrategie von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{s} wurde pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{AUG*} kloniert. Allerdings wurde hierbei das p68 Startkodon mutiert. Der erste Schritt der PCR erfolgte mit denselben internen Primern wie bei der vorangegangenen Klonierung. Unter Verwendung des externen 5´ Primers (AAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAGAAAG*C*GTCGGGTTAT T) wurde das Startkodon mutiert, das PCR Produkt *Not*I und *Kpn*I geschnitten und in die *Not*I Schnittstelle des Subklons pSKII–NS1/NS2-Stop/Start ligiert. Das Konstrukt wurde als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{AUG*} bezeichnet.

3.2.9.14.3 Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{as}

Zur Konstruktion von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start mit der p68 cDNA in 3´-5´ Orientierung wurde die cDNA von pTIT-p68 amplifiziert (5´ Primer: AAAAGGAA AA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAGAAATTATTGGGAATATCCTGTTGCA TTGG, 3´ Primer: ATAT*CGGCCG*ATGTCGGGTTATTCGAGTGACCGAGAC). Das PCR Produkt wurde mit den Enzymen *Not*I und *Eag*I geschnitten und in den Subklon ligiert. Das Konstrukt wurde als pSKII–NS1/NS2-Stop/Start-p68^{as} bezeichnet.

3.2.9.14.4 Konstruktion von prBRSV-p68^{s}, prBRSV p68^{AUG*} und prBRSV p68^{as}

Die entsprechenden Subklone wurden mit den Enzymen *Not*I und *Kpn*I geschnitten und in den mit identischen Enzymen geschnittenen prBRSV Gesamtklon ligiert. Die resultierenden cDNA Plasmide wurden weiterhin als prBRSV-p68^{s}, prBRSV p68^{AUG*} und prBRSV p68^{as} bezeichnet. Hierbei wurden Plasmide erhalten, die für das gesamte BRSV Antigenom und zusätzlich für p68 RNAs in unterschiedlichen Orientierungen kodieren.

3.2.9.14.5 Konstruktion von prBRSV∆NS1/2-p68^{s}, prBRSV∆NS1/2-p68^{AUG*} und prBRSV ∆NS1/2-p68^{as}

Zur Konstruktion von Viren mit deletierten NS1/NS2 Genen, die die zusätzlichen p68 RNAs überexprimieren, wurde zunächst der BRSV cDNA Klon prBRSV∆NS1/2 (134) mit *Not*I geschnitten. Die p68 cDNAs in unterschiedlicher Orientierung aus pSKII–NS1/NS2-Stop/Start Subklonen wurden mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: AAAAGGAAAA*GCGGCCGC*CCCCTCTCTTCTTTCTACAG, 3´ Primer: AAAAGGAA AA*GCGGCCGC*GGCTGGTTGGGGAACTGATTT). Diese PCR Produkte wurden mit *Not*I geschnitten und ungerichtet in den prBRSV∆NS1/2 ligiert. Nach Feststellung der Orientierung wurden diese cDNAs zur Herstellung rekombinanter Deletionsviren mit zusätzlichen p68 RNAs verwendet.

3.2.9.15 Konstruktion von prBRSVΔNS1/NS2-Stop/Start

Zur Konstruktion eines BRSVΔNS1/NS2 cDNA Plasmids, das keine zusätzlichen RNAs exprimiert, sondern nur die zusätzliche NS1/NS2 Gengrenze, wurde die Stop/Start Sequenz von pSKII–NS1/NS2-Stop/Start mittels PCR amplifiziert (5´ Primer: AAAAGAAAA*GCGGCCGC*CTAAATCAATAGCCAACACCAGATGG,
3´ Primer: ATAT*CGGCCG*GGCTGGTTGGGGAACTGATTT). Das PCR Produkt wurde mit den Enzymen *Not*I und *Eag*I geschnitten und in den *Not*I geschnittenen prBRSVΔNS1/NS2 cDNA Klon ligiert. Das resultierende Konstrukt wurde als prBRSVΔNS1/NS2-Stop/Start bezeichnet.

4. Ergebnisse

4.1 Protein-Protein Interaktion viraler NS-Proteine

4.1.1 Das Prinzip des "Yeast Two Hybrid" Systems (Y2H)

Mit dem „Yeast Two Hybrid" System (Y2H) können Protein-Protein Interaktionen indirekt durch Expression von Reportergenen in Hefezellen detektiert werden. Das Prinzip beruht auf der Aktivität von zwei potentiell interagierenden Proteinen, die als Fusionsprotein mit der GAL4 Bindungsdomäne (GAL4-BD, *bait*) bzw. GAL4 Aktivierungsdomäne (GAL4-AD, *prey*) synthetisiert werden (51, 55). Das Wildtyp GAL4 Protein ist ein starker Transaktivator an entsprechenden Promotoren. Die GAL4 Promotoren sind im Y2H System stromaufwärts von Reportergenen kloniert und in den Hefestämmen genomisch integriert. Das GAL4 Protein besitzt zwei trennbare funktionelle Domänen, die DNA Bindungsdomäne und die Aktivierungsdomäne. Proteine, die jeweils mit diesen Domänen fusioniert werden, bilden bei einer Protein-Protein Wechselwirkung einen funktionellen Transkriptionskomplex an den Promotoren der Reportergene (Abb. 9). Die Reportergene kodieren für essentielle Proteine der Aminosäuresynthese, weshalb auf Mangelmedien (SD-Medien) die Expression der Reportergene nachgewiesen werden kann. Nach Expression der Reportergene durch eine Protein-Protein Wechselwirkung können die Hefezellen die Aminosäure *de n*ovo synthetisieren und wachsen unter selektiven Bedingungen. Zusätzlich eignet sich das Reportergen *LacZ* für diese Analysen, da sich positive Transformanten nach Zugabe des Substrats für β-Galaktosidase an Luftsauerstoff blau färben. Bei dem Y2H System handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, mit der Protein-Protein Wechselwirkungen detektiert werden können, die mit biochemischen Methoden oft nicht erfasst werden. Für diese Arbeit wurde das Y2H Matchmaker 3 System (Clontech) verwendet. Mit dem Hefestamm AH109 ist es möglich, besonders stringent Protein-Protein Wechselwirkungen zu detektieren, da dieser Hefestamm drei verschiedene Reportergene mit unterschiedlicher Promotorstruktur besitzt. Alle drei Promotoren besitzen ein Konsensusmotiv für die GAL4 Bindungsdomäne. Bei Interaktion der Proteine und Aufbau transkriptionsaktiver Proteinkomplexe an allen Promotoren

wachsen die Hefezellen auf Mangelmedien bei zusätzlicher Färbung der Transformanten im Galaktosidase Test.

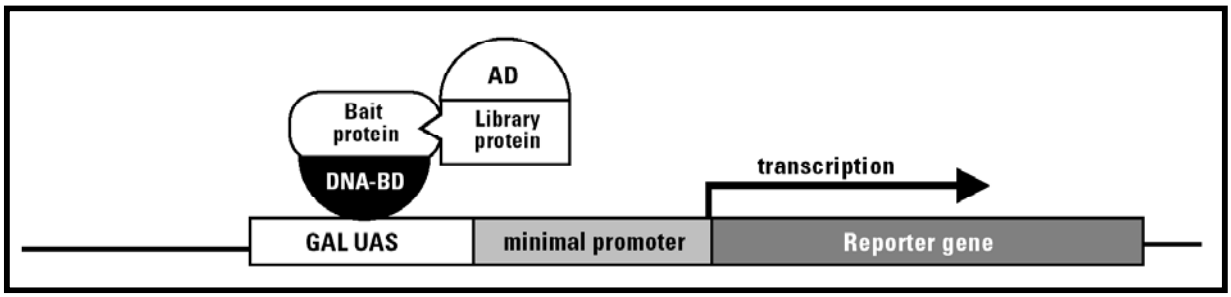


Abb. 9 Prinzip des "Yeast Two Hybrid" Systems

Durch Interaktion der beiden GAL4 Fusionsproteine wird die Expression der Reportergene ermöglicht, was zum Wachstum der Hefezellen auf SD-Mangelmedien und zur Blaufärbung der Transformanten im β-Galaktosidase Test führt.

4.1.2 Etablierung des Y2H Systems für virale NS-Proteine

Um Interaktionen zwischen den NS-Proteinen zu analysieren und zelluläre Interaktionspartner für diese Proteine zu identifizieren, wurden zunächst Hefestämme konstruiert, die BRSV NS-Proteine in Fusion mit der GAL4-BD synthetisieren. Hierzu wurde der Hefestamm AH109 verwendet und mit pGBKT7-NS1 und pGBKT7-NS2 Expressionsplasmiden transformiert (AH109-BRSV NS1-BD und NS2-BD). Ebenso wurden Hefestämme konstruiert, die BRSV NS-Proteine in Fusion mit der GAL4-AD synthetisieren (AH109-BRSV NS1-AD und NS2-AD, Abb. 10A). Weitere AH109 Hefestämme wurden mit Expressionsplasmiden für GAL4-NS Fusionsproteine anderer Pneumoviren transformiert (HRSV, PVM). Nachdem gezeigt wurde, dass die konstruierten Hefestämme virale BRSV NS-Proteine in Fusion mit den GAL4 Domänen synthetisieren (Abb. 10A), wurde überprüft, ob die Fusionsanteile Reportergene in Hefe per se aktivieren oder zytotoxisch für die Hefezellen sind. Hierzu wurden die Hefestämme, die NS Fusionsproteine der Pneumoviren HRSV, BRSV und PVM synthetisieren (jeweils hNS, bNS und mNS) unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen kultiviert. Bei Kultivierung der Hefestämme unter nicht selektiven Bedingungen (SD Medium –Trp/–Leu) wurde Wachstum beobachtet (Abb. 10B), was starke zytotoxische Effekte der Fusionsproteine weitgehend ausschließt. Unter selektiven Bedingungen (SD Medium –Trp/–Leu/–Ade/–His) wurde kein Wachstum der Hefezellen beobachtet, weshalb eine Auto-Aktivierung an Reportergen-Promotoren ausgeschlossen wurde (Abb. 10C). Als Negativkontrolle

wurden jeweils Transformanten mitgeführt, die Lamin C (LamC) synthetisierten. Zur Analyse der Interaktion wurden transformierte Hefezellen jeweils 1:10 verdünnt, da nicht verdünnte Hefezellen in der Regel restliche Substrate von den –Trp–Leu Agarplatten metabolisieren und artifizielles Wachstum zeigen können. Durch Verdünnungen kann das Wachstum einzelner Hefekolonien erfasst werden, das auf Expression der Reportergene zurückgeht. Da durch Synthese der viralen NS-Proteine keine Transaktivierung der Reportergen-Promotoren beobachtet wurde, eignen sich die transformierten Hefestämme für weitere Analysen mit dem Y2H System.

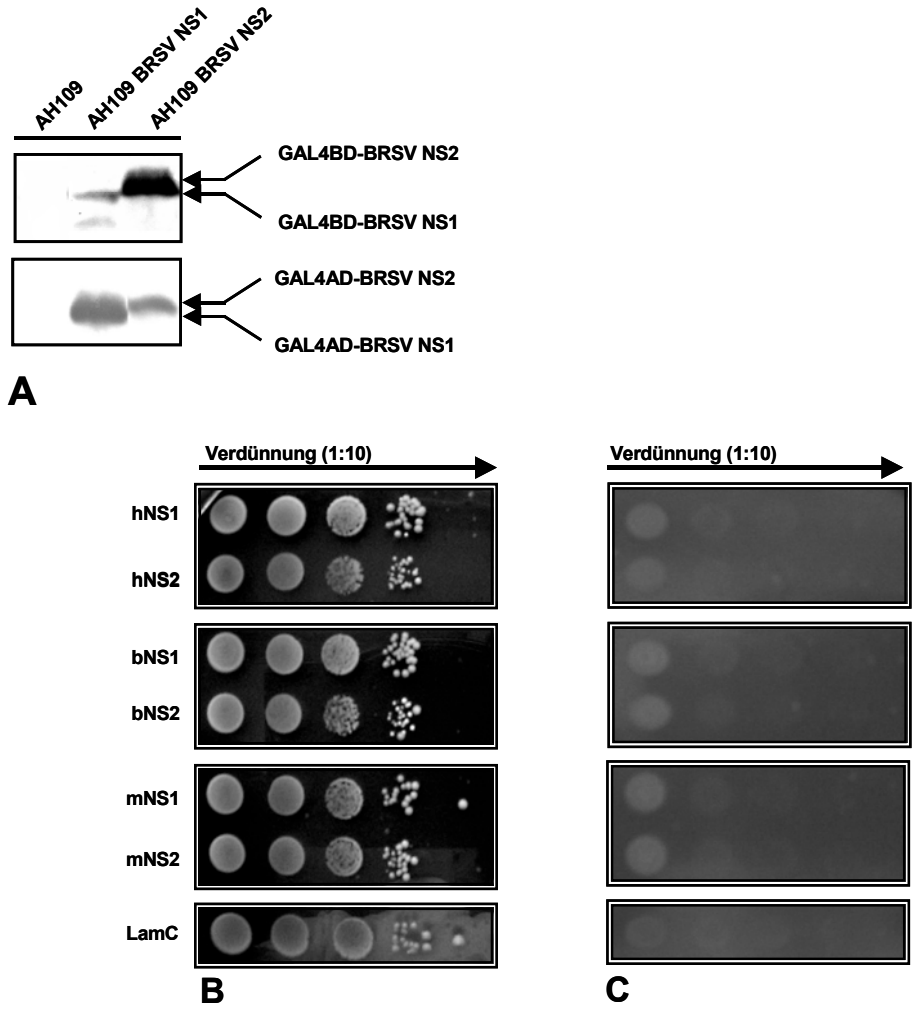


Abb. 10 Synthese von NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren in Hefezellen

(A) GAL4-BRSV NS Fusionsproteine werden in Hefe synthetisiert. Der Western Blot zeigt exemplarisch GAL4-BRSV NS Fusionsproteine aus transformierten Hefezellen. GAL4-BD BRSV NS wurde mit αc-myc Antikörpern (9E10, Verdünnung 1:1000), GAL4-AD BRSV NS Fusionsproteine wurden mit αHA Antikörpern (Y11, Verdünnung 1:1000) nachgewiesen. (B) Die konstruierten Hefestämme, die jeweils NS-Proteine der Pneumoviren HRSV, BRSV und PVM exprimieren (hNS, bNS, mNS) wachsen unter nicht selektiven Bedingungen (SD-Medium –Trp/–Leu). Als Negativkontrolle wurden die Hefezellen mit LaminC (LamC) kodierender cDNA transformiert. (C) Transaktivierung der Reportergene wurde nach Synthese der Fremdproteine unter selektiven Bedingungen (–Ade, –His,–Trp, –Leu) nicht beobachtet.

4.1.3 Interaktion der NS-Proteine in Hefezellen

4.1.3.1 Interaktion der BRSV NS-Proteine in Hefezellen

Wie aus vorherigen Arbeiten bereits bekannt ist, wirken die NS-Proteine in infizierten Zellen gemeinsam als Interferonantagonisten (134). Aufgrund des kooperativen Mechanismus der Proteine wurde zunächst spekuliert, dass die NS-Proteine untereinander Komplexe bilden. Um mögliche Interaktionen der NS-Proteine zu analysieren, wurden AH109-BRSV NS1-BD und AH109-BRSV NS2-BD jeweils mit pGADT7-NS1 und pGADT7-NS2 Plasmiden transformiert. Somit wurden mögliche Interaktionen in allen Kombinationen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass BRSV NS-Proteine sowohl homo- (NS1/NS1, NS2/NS2) als auch heteromere Komplexe (NS1/NS2) in Hefe bilden (Abb. 11A). Hefestämme, die Lamin C (*bait*) und NS-Proteine (*prey*) synthetisierten, zeigten dagegen kein Wachstum auf Mangelmedien (SD Medium –Trp/–Leu/–Ade/–His) und Blaufärbung im α- bzw. β-Galaktosidase Test. Der Hefestamm Y187 wurde mit den gleichen Expressionsplasmiden transformiert und die β-Galaktosidase Aktivität nach Synthese der Fusionsproteine durch Zugabe von ONPG als Substrat *in vitro* gemessen (Abb. 11B). Hierbei wurde ebenfalls eine ca. 5-10 fach erhöhte β-Galaktosidase Aktivität erfasst, womit die Interaktion der Fusionsproteine in diesem Hefestamm bestätigt wurde.

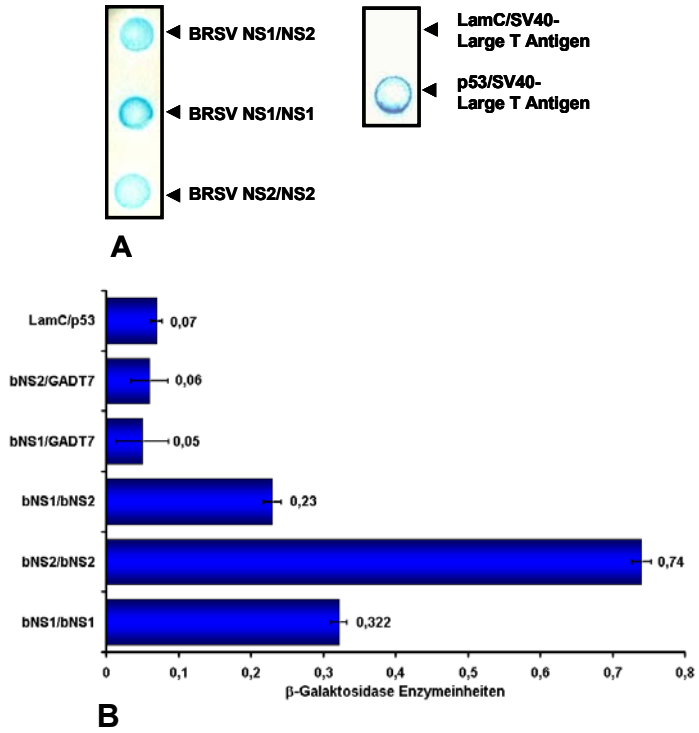


Abb. 11 Nachweis von Protein-Protein Wechselwirkungen der BRSV NS-Proteine

(A) AH109 Transformanten sind nach Synthese von BRSV NS1/NS2, NS1/NS2 und NS2/NS2 positiv im β-Galaktosidase Test auf Filtern. (B) Der β-Galaktosidase Test mit ONPG als Substrat zeigt eine deutliche Erhöhung der β-Galaktosidase Aktivität bei Y187 Transformanten im Vergleich zu den Negativkontrollen *in vitro*.

4.1.3.2 Interaktion zwischen NS-Proteinen anderer Pneumoviren in Hefezellen

Um zu zeigen, dass es sich bei den NS-Protein Interaktionen um eine generelle Eigenschaft der Pneumovirus NS-Proteine handelt, wurden Hefestämme mit Expressionsplasmiden für die NS-Proteine von HRSV und PVM transformiert. HRSV NS-Proteine interagieren in gleicher Weise wie BRSV NS-Proteine miteinander (nicht gezeigt). Allerdings wurde mit dem Y2H System keine Interaktion der PVM NS-Proteine untereinander festgestellt (nicht gezeigt).

BRSV und HRSV NS-Proteine sind zudem austauschbar, d.h. BRSV NS-Proteine können zusätzlich mit den heterologen HRSV NS-Proteinen in Hefe interagieren (nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Sequenzunterschiede der NS-Proteine zwischen beiden RSV Spezies keinen Einfluss auf die Heteromer- bzw. Homomer-Bildung haben.

4.1.3.3 Mutationsanalyse der Interaktion mit BRSV NS1

Zur Analyse der Spezifität der Interaktion zwischen BRSV NS1 Homo- und Heteromeren, wurden Hefezellen mit cDNAs (B. Bossert, nicht publiziert) transformiert, die jeweils für NS1-Proteine mit 9-15 deletierten Aminosäuren kodieren (Abb. 12).

Alle Deletionsmutanten des BRSV NS1 bilden hierbei keine Homomere mit dem Wildtyp NS1. Für die Interaktion zwischen BRSV NS1 und NS2 ist der NS1 C-Terminus für die Interaktion nicht relevant. BRSV NS1 (*bait*) mit Deletionen im Bereich der Aminosäuren 93-100 und 102-110 (bNSΔ93-100 und bNSΔ102-110) führte nach Expression nach wie vor zum Wachstum der Hefezellen, wenn BRSV NS2 in Fusion mit der Aktivierungsdomäne in AH109 synthetisiert wurde (Abb. 12B). Mit dem Y2H System wurde somit gezeigt, dass diese Deletionen großen Einfluss auf die Interaktion der BRSV NS-Proteine haben.

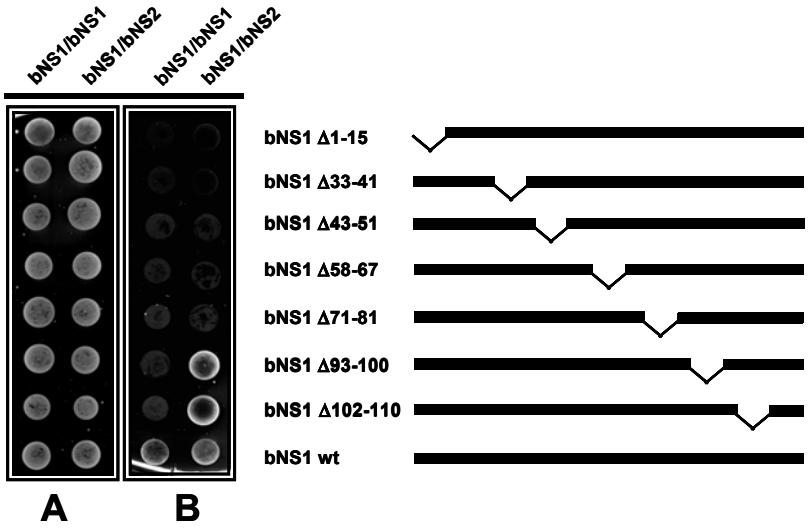


Abb. 12 Mutationsanalyse der Interaktion mit BRSV NS1

(A) AH109 Hefezellen, die deletierte bNS1 Proteine in Kombination mit bNS1 bzw. bNS2 synthetisieren, wachsen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Die Bildung von bNS1 Homomeren ist bei Synthese von bNS1 Deletionsmutanten (bNS1-BD) in Kombination mit bNS1wt nicht mehr möglich. Dagegen interagieren die bNS1 Deletionsmutanten bNSΔ93-100 und bNSΔ102-110 uneingeschränkt mit bNS2wt.

4.1.3.4 Ko-Immunpräzipitationen mit BRSV NS-Proteinen

Nach Vaccinia Virus (vTF7-3) vermittelter Expression der cDNAs in BSR Zellen wurden Ko-Immunpräzipitationen mit rekombinanten NS Fusionsproteinen (c-myc, HA) durchgeführt, um die Interaktion der Proteine untereinander zu bestätigen. Die NS2/NS2 Interaktion wurde hierdurch bestätigt (nicht gezeigt). Die im Y2H gezeigten schwächeren Interaktionen zwischen NS1/NS1 und NS1/NS2 konnten durch Ko-Immunpräzipitation allerdings nicht bestätigt werden. Diese Interaktionen lassen sich demnach nur mit dem sensitiveren Y2H System demonstrieren.

4.2 Interaktion der NS-Proteine mit Proteinen der Wirtszelle

4.2.1 Identifizierung zellulärer Bindungspartner für BRSV NS1

Die RSV NS-Proteine verhindern die Induktion von Interferon und vermitteln Interferonresistenz. Die Deletion von NS Genen führt aber auch in IFN-inkompetenten Zellen zu einer deutlichen Attenuierung, sodass den NS-Proteinen zusätzliche Funktionen im Replikationszyklus des Virus und/oder in der Beeinflussung der Wirtszelle zuzuschreiben sind. Mit Hilfe des Y2H Systems sollten

zelluläre Interaktionspartner zunächst für NS1 identifiziert werden. Dazu wurde der zuvor beschriebene Hefestamm AH109-BRSV NS1-BD mit einer cDNA Expressions-bibliothek aus Lungengewebe transformiert. Positive Transformanten, die auf Selektionsagar (–Ade/–His/–Trp/–Leu) wuchsen und ebenfalls positiv im β-Galaktosidase Test waren, wurden hierbei weiter durch Verdünnungsausstriche selektiert. Die Transformation der Hefezellen mit der Expressionsbibliothek wurde in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt, um die Relevanz der isolierten cDNA Klone zu bestätigen. Hierzu wurden jeweils 3 x 10^6 Hefezellen mit cDNA Klonen der Expressionsbibliothek transformiert. In beiden Ansätzen wurden mehrere positive Transformanten durch Blaufärbung identifiziert. Die Expressionsplasmide aus den auxotroph wachsenden Hefezellen wurden isoliert und AH109-BRSV NS1-BD erneut transformiert, um die Interaktion zu bestätigen. Insgesamt wurden so 61 cDNAs präpariert, deren Genprodukte mit bNS1 interagierten. Die cDNAs wurden sequenziert und mit DNA Sequenzen aus der NCBI Datenbank verglichen. In Tabelle 3 sind die identifizierten cDNAs mit Sequenzhomologien zu Sequenzen aus der Datenbank aufgelistet. Bei den mehrfach isolierten cDNAs handelt es sich meistens um identische Klone.

Klon #	**DNA Sequenzhomologie nach NCBI Blast (3)**
1	Thymosin beta 4
2	Membrangebundenes Interferon-reguliertes Glykoprotein (nicht publiziert)
3	**Ran bindendes Protein16 (RanBP16)**
4	**Ran bindendes Protein16 (RanBP16)**
5	Thymosin beta 4
6	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**
7	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
8	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
9	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
10	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
11	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
12	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
13	**Ran bindendes Protein16 (RanBP16)**
14	Thymosin beta 4
15	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
16	Thymosin beta 4
17	Thymosin beta 4
18	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
19	**p68 nukleäre DEAD Box Helikase**

20	Lung surfactant Protein A
21	Thymosin beta 4
22	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
23	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
24	KIAA0092
25	KIAA0092
26	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
27	KIAA0092
28	KIAA0092
29	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
30	Hitzeschock Protein
31	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
32	Thymosin beta 4
33	Thymosin beta 4
34	Cathepsin C
35	Thymosin beta 4
36	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**
37	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
	2. Transformation der cDNA Expressionsbibliothek
38	EE-3 nukleäres Protein
39	Glutathion-S-Transferase
40	Cathepsin C
41	RAL assoziiertes Protein (RalBP1)
42	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
43	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
44	Zink Finger Protein (unbekannte Funktion)
45	Cathepsin C
46	PM5 Protein (unbekannte Funktion)
47	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**
48	**β-Coatomer Protein I (β CopI)**
49	Nicht näher charakterisierte Sequenz (*homo sapiens*)
50	**CDK4 bindendes Protein (CDK4BP, p34^{SEI-1})**
51	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**
52	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
53	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**
54	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
55	Citrat Lyase
56	**β-Coatomer Protein I (β COPI)**
57	**Ran bindendes Protein16 (RanBP16)**
58	KIAA0092
59	PM5 Protein (unbekannte Funktion)

60	Cathepsin C
61	**c-myc bindendes Protein (MM-1)**

Tab. 3 DNA Sequenzhomologien identifizierter cDNAs

Fett markierte cDNAs wurden im Rahmen dieser Arbeit weiter analysiert.

Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, wurden neben Sequenzen bekannter Protein-kodierender Gene auch Sequenzen identifiziert, die Homologien zu sequenzierten Genabschnitten haben und deren Genprodukte bislang nicht charakterisiert wurden. In diesem Fall wurde die Sequenz mit „*nicht näher charakterisierte Sequenz (homo sapiens)*“ bezeichnet, wobei es sich allerdings nicht um die gleiche Sequenz handelt. Weiterhin wurden die Plasmide, die weiter für diese Arbeit verwendet wurden, fett markiert. Wie gezeigt, war CDK4BP ($p34^{SEI-1}$) einmal, p68 einmal, RanBP16 4 mal, der c-Myc Modulator (MM-1) 6 mal und das β-Coatomer Protein I (β-COPI) 10 mal vertreten. Mit Ausnahme der CDK4BP und der p68 cDNA wurden die anderen cDNAs in den beiden unabhängigen Ansätzen mehrfach isoliert.

Über die theoretischen Genprodukte der nicht näher charakterisierten Genabschnitte kann in Hinblick auf eine mögliche Interaktion mit NS1 nichts gesagt werden, da nicht klar ist, ob zu diesen Sequenzen überhaupt authentische Proteine in der Zelle existieren oder ob es sich um artifizielle Peptidsequenzen handelt.

Um unspezifische Bindungspartner auszuschließen, wurden Hefezellen, die LamC-BD exprimieren, mit sämtlichen isolierten cDNA Klonen aus der Expressionsbibliothek transformiert. Lam C wurde hierbei als Negativkontrolle verwendet, da dieses Protein keine Interaktionen mit anderen Proteinen eingeht. Durch Transformation von AH109-LamC-BD mit den cDNAs für Thymosin beta 4, CathepsinC, PM5, Glutathion-S-transferase und Citrat Lyase wurde gezeigt, dass es sich bei diesen Proteinen um falsch positive Interaktionen handelt, da diese Proteine Reportergene auto-transaktivieren. Diese Transformanten waren ebenfalls positiv (Wachstum/Blaufärbung), weshalb endogene Hefeproteine an der Interaktion aber nicht BRSV NS1 bzw. Lamin C beteiligt sein mussten.

Für die weiteren Arbeiten wurden in erster Linie NS1 interagierende Proteine ausgewählt, die zumindest in Ansätzen charakterisiert waren. Wie oben beschrieben, ist NS1 im Zytoplasma und im Nukleus infizierter Zellen lokalisiert. Interessant in diesem Zusammenhang waren vor allem die Proteine CDK4BP ($p34^{SEI-1}$), MM-1, RanBP16 und p68, da diese Proteine ebenfalls im Zellkern lokalisiert sind. β-COPI ist dagegen ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert. Dieses Protein wurde am

häufigsten als Interaktionspartner in unabhängigen Transformationen der Hefezellen identifiziert. Die Synthese dieses Proteins in AH109 in Kombination mit bNS1 verursachte ein starkes Signal im β-Galaktosidase Test, weshalb von einer starken Interaktion zwischen den beiden Proteinen ausgegangen wurde.

4.2.2 Charakterisierung der Interaktion identifizierter zellulärer Proteine mit NS-Proteinen

Aufgrund des bereits beschriebenen kooperativen Mechanismus der NS-Proteine im Hinblick auf die Interferonresistenz wurde zunächst untersucht, ob BRSV NS2 ebenfalls die identifizierten Proteinfragmente in Hefe binden kann. Weiterhin wurden für alle identifizierten Interaktionspartner cDNAs voller Länge für die weitere Charakterisierung in verschiedene Expressionsvektoren kloniert, um weiterführende Testsysteme zu etablieren.

4.2.2.1 Synthese von BRSV NS1 und NS2 als GST Fusionsproteine in *E.coli*

Zur näheren Charakterisierung der Interaktion der identifizierten zellulären Proteine mit NS1 wurde das BRSV NS1- und BRSV NS2-Protein für weitere Interaktionsstudien zunächst als GST Fusionsproteine in *E.coli* BL21 (DE) synthetisiert und aus Lysaten affinitätsgereinigt. Nach Transformation der Bakterien mit entsprechenden Plasmiden für GST, GST-BRSV NS1 und GST-BRSV NS2 wurden Bakterienklone identifiziert, die die jeweiligen Proteine in ausreichender Menge nach Induktion der Proteinsynthese mit IPTG synthetisierten. Mit diesen Proteinen wurden weitere Interaktionsstudien *in vitro* durchgeführt.

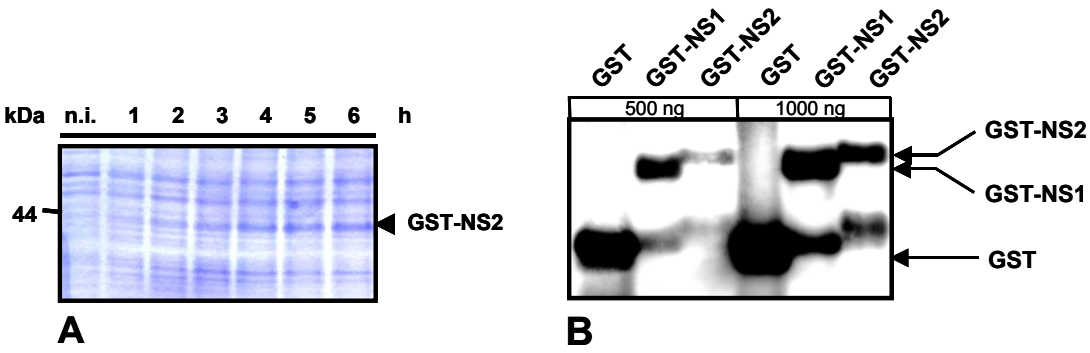


Abb. 13 Synthese von GST-Fusionproteinen in *E.coli.*

(A) Die Synthese von GST-BRSV NS2 in Abhängigkeit von der Zeit nach Induktion (1-6 h) mit 1 mM IPTG ist exemplarisch für GST-Fusionsproteine im Coomassie Gel gezeigt (n.i.=nicht induziert). Proteinlysate aus jeweils 10 µl transformierten *E.coli* BL21 wurden im Polyacrylamidgel aufgetrennt

und mit Coomassie R250 gefärbt. (B) Gereinigte GST und BRSV NS Fusionsproteine wurden im Western Blot mit spezifischen αGST Antikörpern nachgewiesen (αGST C20, Verdünnung 1:1000).

4.2.3 Interaktion viraler NS-Proteine mit CDK4BP (p34^{SEI-1}, TRIP-Br1)

Durch Transformation der AH109-BRSV NS1-BD Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek wurde eine cDNA identifiziert, deren Genprodukt, ein Cyklin abhängige Kinase 4 bindendes Protein (CDK4BP, p34^{SEI-1}), in Hefe mit BRSV NS1 interagiert (Klon 50). Dieses Protein wurde erstmals im Zusammenhang mit einer Interaktion des Zellzyklus-regulierenden Protein p16^{INK4a} aus einer cDNA Expressionsbibliothek isoliert (144). p16^{INK4a} inhibiert Cyklin abhängige Kinasen (CDK4 und CDK6). Es zeigte sich, dass CDK4BP nicht nur mit p16^{INK4a}, sondern auch mit CDK4 interagiert und die inhibitorische Wirkung von p16^{INK4a} aufheben kann, weshalb ein Komplex aus mindestens drei Proteinen angenommen wird. Die Expression des entsprechenden Gens (*SEI-1*) wird in Fibroblasten durch Serum stimuliert (144). Weiterhin wurde CDK4BP als Bindungspartner für DP1 beschrieben, das in Verbindung mit E2F-1 spezifische Gene beim Übergang von der G1 in die S Phase des Zellzyklus reguliert (79). Die hier isolierte cDNA kodiert für das gesamte Protein und nicht für ein Proteinfragment. Da dieses Protein unterschiedliche Namen hat (p34^{SEI-1}, TRIP-Br1), wird dieses Protein zur Vereinfachung im Folgenden als CDK4BP bezeichnet.

Um festzustellen, ob auch BRSV NS2 dieses Protein binden kann, wurde der Hefestamm AH109-BRSV NS2-BD mit der identifizierten cDNA transformiert. Weiterhin wurden Hefestämme, die NS-Proteine anderer Pneumoviren synthetisieren, mit der CDK4BP cDNA transformiert.

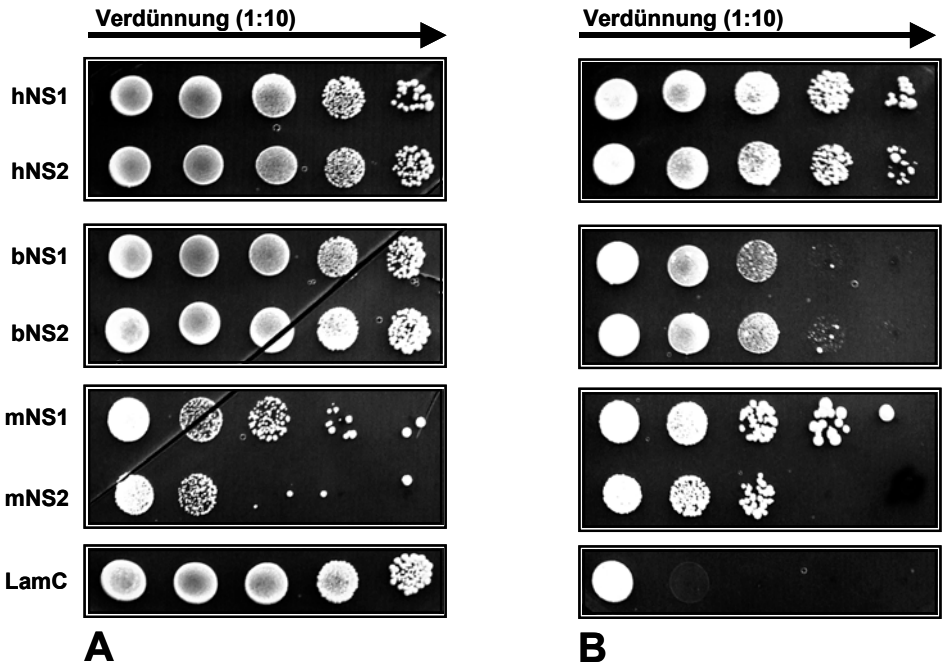


Abb. 14 Interaktion von CDK4BP mit NS-Proteinen unterschiedlicher Pneumoviren

(A) Unter nicht selektiven Bedingungen (–Trp, –Leu) wachsen die CDK4BP/NS-Protein exprimierenden Hefen. Lediglich in Verbindung mit mNS1 und mNS2 ist das Wachstum der Hefezellen leicht eingeschränkt. (B) Unter selektiven Bedingungen (–Ade, –His, –Trp, –Leu) wird Wachstum durch Expression der entsprechenden Reportergene im Gegensatz zur Negativkontrolle (LamC) ermöglicht. Hefezellsuspensionen wurden standardisiert jeweils in 1:10 Verdünnungen auf die Platten aufgetragen.

Hierbei wurde gezeigt, dass humanes CDK4BP an die NS-Proteine aller Pneumoviren in Hefe bindet und dadurch Wachstum der Hefezellen unter selektiven Bedingungen ermöglichte. Daher wurde CDK4BP als potentieller Bindungspartner für diese viralen Proteine in Betracht gezogen. Interessanterweise weisen die PVM NS-Proteine nur sehr geringe Sequenzhomologien zu den übrigen RSV NS-Proteinen auf (27). Trotzdem interagieren diese Proteine mit CDK4BP, weshalb hier eine sequenzspezifische Bindung unwahrscheinlich ist und eher eine konservierte Struktur für die Bindung verantwortlich zu sein scheint.

4.2.3.1 Interaktion von CDK4BP und BRSV NS1 Deletionsmutanten in Hefe

Um die Spezifität der Interaktion von CDK4BP zu überprüfen, wurden Hefestämme, die BRSV NS1 Deletionsmutanten synthetisierten, mit der CDK4BP cDNA transformiert. Die Interaktion zwischen diesen Proteinen wurde durch die Deletionen stark beeinträchtigt (Abb. 15) Lediglich zwei Deletionsmutanten (bNS1Δ71-81 und

bNS1Δ93-100) zeigten nach Transformation der Expressionsplasmide sehr schwaches Wachstum auf Selektionsmedien.

Dieser Befund macht deutlich, dass geringe Veränderungen des Wildtyp BRSV NS1 in unterschiedlichen Bereichen erhebliche Auswirkungen auf die Interaktion mit diesem zellulären Protein haben. Dies deutet darauf hin, dass strukturelle Voraussetzungen für die Bindung gegeben sein müssen.

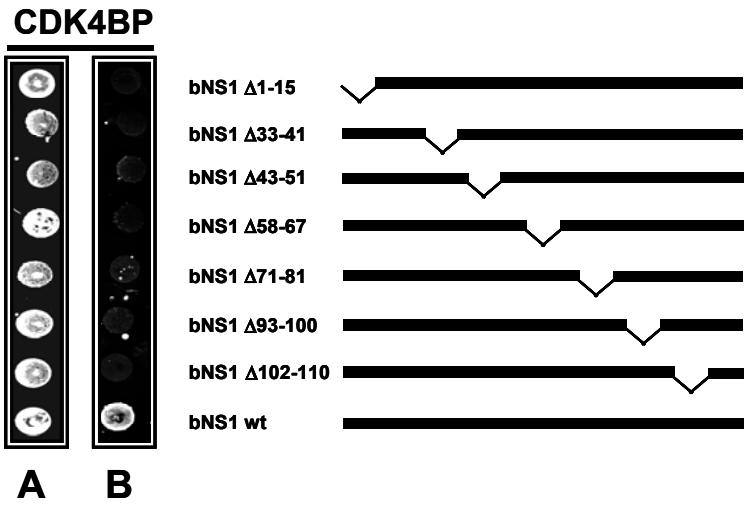


Abb. 15 Interaktion von CDK4BP und BRSV NS1 Deletionsmutanten in Hefe

(A) Unter nicht selektiven Bedingungen wachsen Hefezellen, die CDK4BP und BRSV NS1 Deletionsmutanten synthetisieren.(B) Unter selektiven Bedingungen wachsen die Hefezellen nur bei Synthese von Wildtyp BRSV NS1 und CDK4BP Fusionsproteinen.

4.2.3.2 Ko-Immunpräzipitation von BRSV NS-Proteinen durch CDK4BP

Zur Bestätigung der Interaktion wurden Ko-Immunpräzipitationen rekombinanter Proteine aus Lysaten transfizierter BSR Zellen durchgeführt.

Für die Ko-Immunpräzipitationen wurden BSR Zellen mit Vaccinia Viren (vTF7-3), die T7 Polymerase exprimieren, infiziert und anschließend mit pGADT7-BRSV NS1 und NS2 (jeweils HA fusioniert) sowie mit pTIT-myc-CDK4BP Plasmiden transfiziert. Hierbei wurden durch die vTF7-3 vermittelte Überexpression hohe Konzentrationen der entsprechenden Proteine synthetisiert (Abb. 16). Als Positivkontrolle für eine Protein-Protein Wechselwirkungen wurden zusätzlich Vaccinia infizierte BSR Zellen mit kodierenden cDNAs für c-Myc (c-myc) und Max (HA) transfiziert. Diese Proteine bilden stabile Heteromere und eignen sich daher ideal als Positivkontrolle.

Unspezifische Präzipitationen durch Protein A Sepharose oder HA Antikörper konnten ausgeschlossen werden (Abb. 16, Spur 3) . Um zudem auszuschließen,

dass es sich bei den ko-immunpräzipitierten Proteinen um Vaccinia Virus Proteine handelt, wurden neben der Mock Kontrolle Lysate von infizierten Zellen mit entsprechenden HA Antikörpern immunpräzipitiert (Abb. 16, Spur 2). Als Positivkontrolle wurde das c-Myc Protein durch den zellulären Bindungspartner Max mit HA Antikörpern ko-immunpräzipitiert. Nach Überexpression der NS cDNAs alleine oder in Kombination, wird durch NS-Proteine das CDK4BP ko-immunpräzipitiert (Abb. 16).

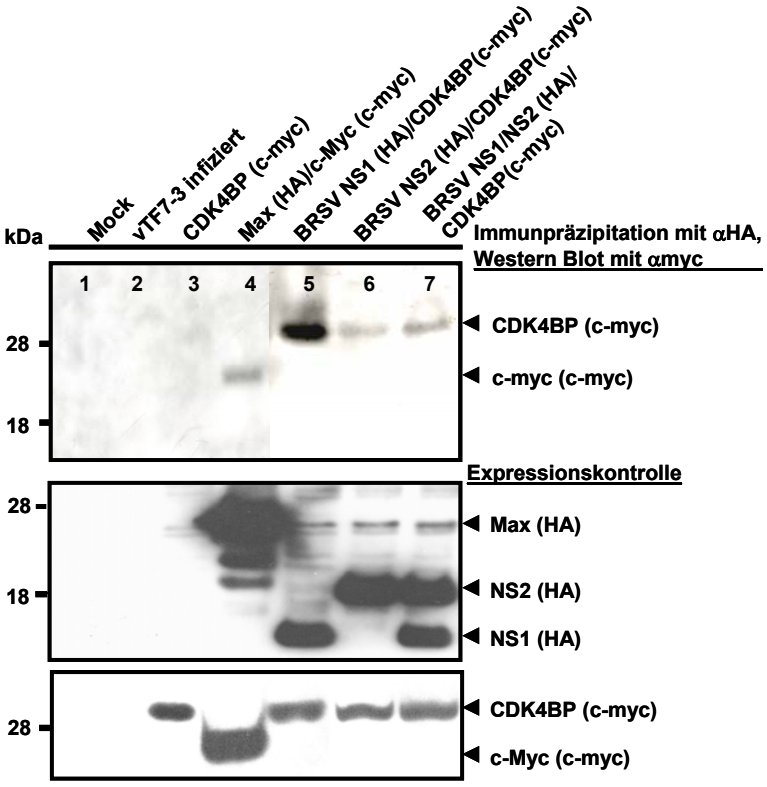


Abb. 16 BRSV NS-Protein Interaktion mit CDK4BP in BSR Zellen

BSR Zellen wurden mit Vaccinia Viren (vTF7-3) infiziert (MOI = 5) und anschließend mit den angegebenen cDNAs transfiziert. 24 h nach Expression der cDNAs wurden Ko-Immunpräzipitationen mit HA Antikörpern (Y11) durchgeführt. Neben der Mock Kontrolle wurden Lysate von infizierten Zellen mit Y11 Antikörpern inkubiert und präzipitiert (Spur 2). Überexprimiertes CDK4BP in Zellen wird nicht durch HA Antikörper präzipitiert (Spur 3). Wie erwartet wurde das c-Myc Protein durch den zellulären Bindungspartner Max mit HA Antikörpern ko-immunpräzipitiert (Spur 4). Nach Überexpression der NS cDNAs alleine oder in Kombination, wird CDK4BP ko-immunpräzipitiert (Spur 4-6). Rekombinante Proteine wurden jeweils mit spezifischen Antikörpern gegen das fusionierte Epitop (9E10 bzw. Y11, Verdünnung 1:1000) auf dem Western Blot nachgewiesen. Expressionskontrollen zeigen rekombinante Proteine. Die fusionierten Epitope sind in Klammern angegeben.

4.2.3.3 Ko-Lokalisation von BRSV NS1 mit CDK4BP in infizierten Zellen

Um die Lokalisationen des identifizierten CDK4BP in BRSV-infizierten Zellen zu studieren, wurden BSRT7-5 Zellen mit pTIT-myc-CDK4BP transfiziert und mit spezifischen Antikörpern gegen das fusionierte c-myc Epitop nachgewiesen. Nach Expression der cDNA war das Protein ausschließlich im Zellkern lokalisiert (nicht gezeigt). Zur Vereinfachung des Testsystems wurden die Zellen mit dem EGFP-C3-CDK4BP Konstrukt transfiziert. Hierbei wurde eine identische Lokalisation festgestellt und daher dieses Konstrukt weiter verwendet. Die Fusion mit EGFP hatte somit keinen Einfluss auf das Verhalten des CDK4BP in BSRT7-5 Zellen. Nach Infektion mit BRSV NS1 (HA) wurde durch Immunfluoreszenz Ko-Lokalisation des NS1 Proteins mit CDK4BP im Zellkern demonstriert (Abb. 17). Die spezifische Lokalisation des zellulären Proteins änderte sich demnach nicht durch Infektion mit BRSV, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Interaktion von NS1 mit CDK4BP im Nukleus infizierter Zellen stattfindet.

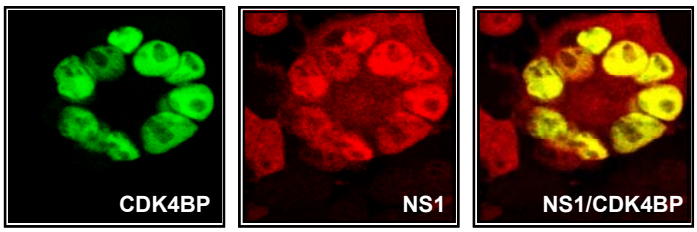


Abb. 17 Ko-Lokalisation des BRSV NS1(HA) mit EGFP-CDK4BP im Nukleus infizierter BSRT7-5 Zellen
EGFP-CDK4BP exprimierende BSRT7-5 Zellen wurden mit BRSV NS(HA) infiziert (MOI = 0,1). EGFP Fluoreszenz wird nur im Nukleus nachgewiesen. Die Immunfluoreszenz des NS1 (HA) nach Infektion zeigt eine deutliche Anfärbung des charakteristischen Synzytiums. Hier ist NS1 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus nach Infektion lokalisiert. Das dritte Bild zeigt die Überlagerung beider Kanäle und die Ko-Lokalisation im Zellkern (gelb). NS1 (HA) wurde mit spezifischen Antikörpern gegen das HA-Epitop und sekundären Cy3 gekoppelten Antikörpern nachgewiesen (Y11, Verdünnung 1:100; Cy3, Verdünnung 1:100)

4.2.4 Interaktion viraler NS-Proteine mit β-COPI

4.2.4.1 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit dem Proteinfragment β-COPI*

Durch Transformation der Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek wurde aus insgesamt 10 Hefetransformanten in unabhängigen Experimenten eine cDNA isoliert, die für ein C-terminales Fragment des zytoplasmatischen Proteins β-COPI kodiert

(Aminosäuren 762-953). β-COPI bildet zusammen mit den Untereinheiten α-, β´-, γ-, δ-, ε- und ζ-COPI den sogenannten Coatomer Komplex, der nicht-Clathrin enthaltende Vesikel umhüllt. Diese Vesikel vermitteln unter anderem retrograden Transport vom Golgi Apparat zum Endoplasmatischen Retikulum. Zusätzlich wird für dieses Protein auch eine Funktion beim endosomalen Transport diskutiert (160).

Zunächst wurde das Proteinfragment (β-COPI*) in Hefezellen, die NS1 exprimierten, synthetisiert und die spezifische Bindung im qualitativen β-Galaktosidasetest bestätigt. Im Gegensatz zu CDK4BP ließ sich keine Bindung von β-COPI* an BRSV NS2 durch β-Galaktosidaseaktivität auf den Filtern nachweisen (Abb. 18A). Im quantitativen β-Galaktosidasetest mit dem Hefestamm Y187 wurde eine starke Bindung zwischen NS1 und β-COPI* bestätigt (Abb. 18B). In diesem Testsystem wurde auch eine leicht erhöhte β-Galaktosidaseaktivität durch Transformation der Hefezellen mit NS2 Plasmiden nachgewiesen.

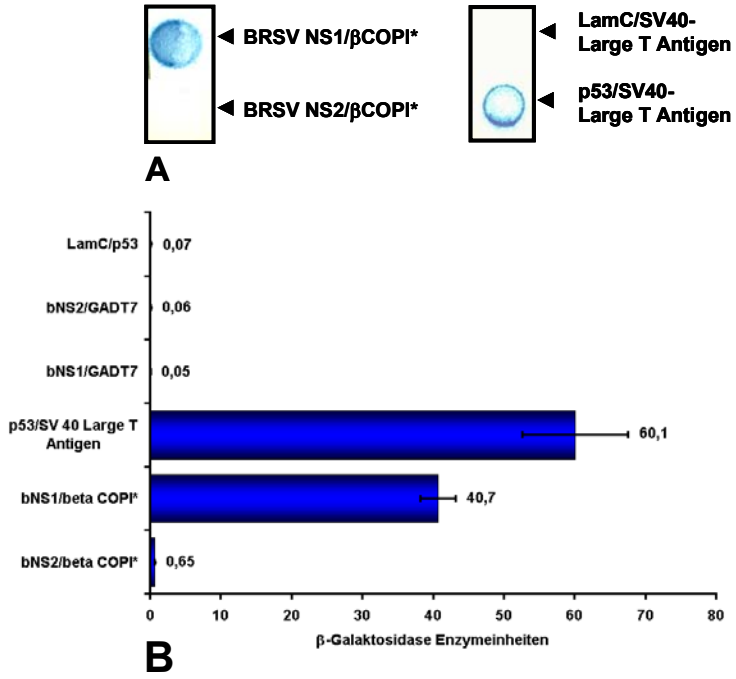


Abb. 18 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit β-COPI*

(A) Mit dem cDNA Fragment β-COPI* transformierter AH109-BRSV NS1-BD ist positiv im β-Galaktosidase Test. Allerdings zeigen AH109-BRSV NS2-BD Hefezellen, die mit dem gleichen Plasmid (β-COPI*) transformiert wurden, keine erhöhte β-Galaktosidaseaktivität in diesem Testsystem. (B) Durch Transformation des Hefestamms Y187 mit NS- und β-COPI*-kodierenden Plasmiden wurde die Interaktion mit β-COPI bestätigt und zudem eine leicht erhöhte β-Galaktosidaseaktivität durch Transformation der Hefezellen mit bNS2 cDNAs gemessen.

4.2.4.2 Interaktion der Pneumovirus NS-Proteine mit dem β-COPI Protein

Um die Bindung des gesamten β-COPI an BRSV NS1 in Hefe zu bestätigen, wurde die kodierende cDNA für das vollständige Protein in pGADT7 mittels RT-PCR kloniert und AH109-BRSV NS1-BD mit diesem Konstrukt transformiert. Auch das gesamte Protein und nicht nur das Proteinfragment interagierte mit BRSV NS1, was durch α-Galaktosidase Aktivität auf Selektionsplatten demonstriert wurde (nicht gezeigt). Interessanterweise interagierte das gesamte Protein nun ebenfalls deutlich mit NS2 in Hefezellen, was auf unterschiedliche Bindungsstellen der NS-Proteine schließen lässt (Abb. 19). LamC zeigte dagegen keine Interaktion mit β-COPI. Durch Transformation der gesamten β-COPI cDNA wurden zudem Interaktionen der NS-Proteine von HRSV und PVM mit β-COPI demonstriert.

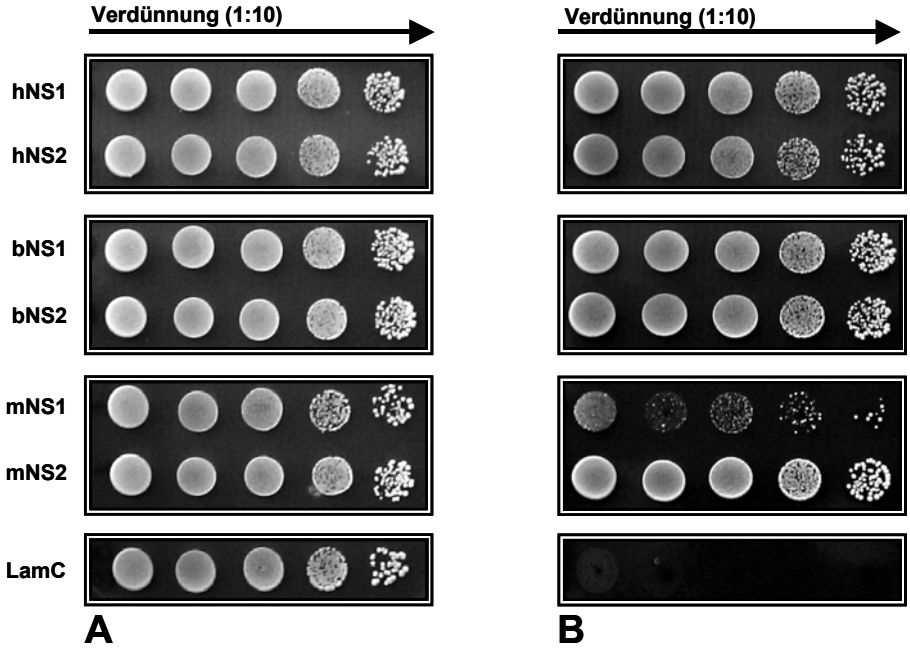


Abb. 19 Interaktion von β-COPI mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren

(A) Mit β-COPI cDNA voller Länge transformierte, NS exprimierende Hefen wachsen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen zeigen die jeweiligen Hefestämme Wachstum durch Expression der Reportergene im Gegensatz zur Negativkontrolle (LamC).

4.2.4.3 Interaktion von β-COPI* und BRSV NS1 Deletionsmutanten in Hefe

Zum Test der Spezifität der NS1/β-COPI* Interaktion wurden die Hefestämme, die verschiedene BRSV NS1 Deletionsmutanten synthetisieren, mit der β-COPI* cDNA transformiert. Auch hier wurde die Bindung von β-COPI* in Hefe durch Deletionen weniger Aminosäuren in NS1 stark beeinträchtigt. Allerdings wurde eine deutliche Bindung der Deletionsmutante bNS1Δ93-100 an β-COPI* in Hefe nachgewiesen (Abb. 20).

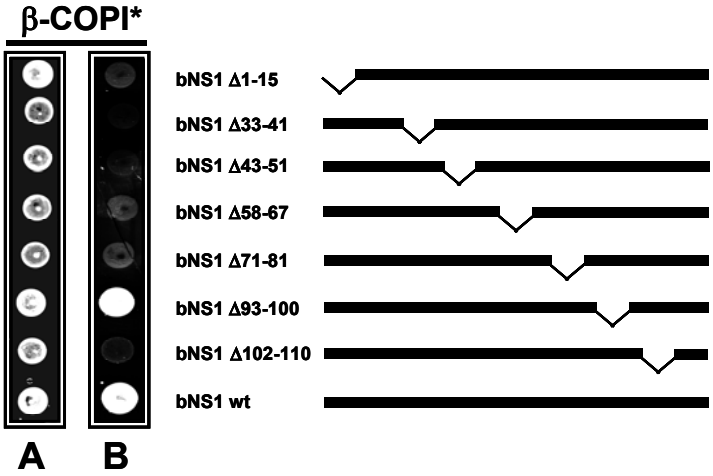


Abb. 20 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 (bNS1) und β-COPI*

(A) Wachstum von transformierten Hefen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen bindet bNS1wt und die Deletionsmutante bNS1Δ93-100 das β-COPI* Proteinfragment. Die übrigen Deletionen haben dagegen großen Einfluss auf die Interaktion.

4.2.4.4 Ko-Immunpräzipitation von NS-Proteinen durch β-COPI

BSR Zellen wurden mit vTF7-3 infiziert und die Zellen mit pGBKT7-BRSV NS1 und NS2 (c-myc) sowie mit pGADT7-β-COPI (HA) kodierenden Plasmiden unter Kontrolle des T7 Promotors transfiziert. Beide rekombinanten BRSV NS-Proteine wurden durch Immunpräzipitation von β-COPI durch entsprechende Antikörper ko-immunpräzipitiert (Abb. 18). Die NS-Proteine interagieren darüber hinaus auch einzeln mit β-COPI (nicht gezeigt). Hiermit wurden die Ergebnisse aus dem Y2H System in Zellen biochemisch bestätigt.

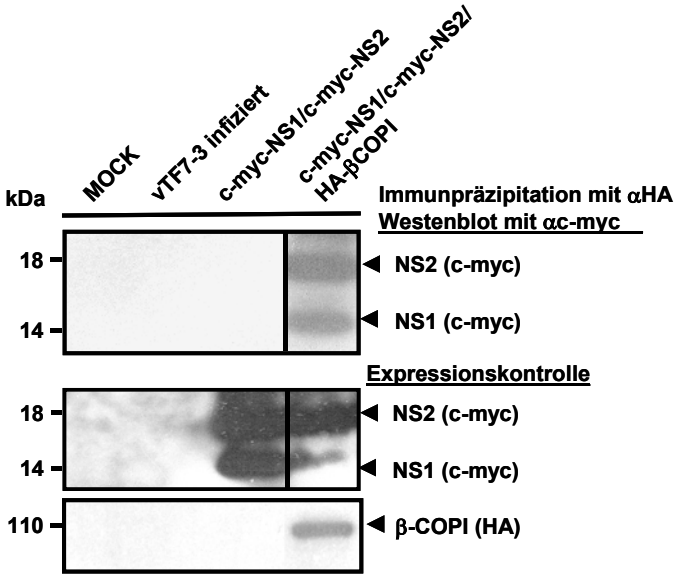


Abb. 21 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch β-COPI

BSR Zellen wurden mit Vaccinia Viren (vTF7-3) infiziert (MOI = 5) und anschließend mit 2 µg der angegebenen cDNAs transfiziert. 24 h nach Expression der cDNAs wurden Ko-Immunpräzipitationen mit HA Antikörpern durchgeführt. Neben der Mock Kontrolle wurden Lysate von Vaccinia infizierten Zellen mit αHA Antikörpern inkubiert (Spur 2). c-myc fusionierte BRSV NS-Proteine werden durch HA spezifische Antikörper nicht immunpräzipitiert (Spur 3). Nach Überexpression der β-COPI cDNA ko-immunpräzipitieren beide NS-Proteine mit β-COPI. Die ko-immunpräzipitierten Proteine sind hier und im Folgenden aus Gründen der Übersichtlichkeit getrennt dargestellt (Original Abbildung im Anhang).

4.2.4.5 Ko-Lokalisation von BRSV NS1/NS2 und β-COPI in infizierten Zellen

Nach Expression klonierter β-COPI Fusionskonstrukte (c-myc, EGFP), wurde eine gleichmäßige Verteilung des rekombinanten Proteins im Zytoplasma transfizierter BSR Zellen beobachtet. Rekombinant synthetisiertes β-COPI bildet allerdings keine deutlichen vesikulären Strukturen im Zytoplasma (nicht gezeigt). Nach Infektion mit BRSVwt verändert sich die Lokalisation des Proteins ebenfalls nicht. Es ist daher davon auszugehen, dass die Interaktion im Zytoplasma stattfindet.

4.2.5 Interaktion viraler NS-Proteine mit RanBP16

4.2.5.1 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit dem RanBP16* Proteinfragment

In unabhängigen Transformationen der AH109-BRSV NS1-BD Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek wurde eine cDNA mehrfach isoliert, die für ein Protein der β Importin Familie kodiert (96). Die identifizierte RanBP16 cDNA kodiert für ein C-

terminales Proteinfragment (Aminosäuren 822-1087). Dieses Protein bindet die GTPase Ran, das das zentrale Protein für den nukleären Im- und Export von Proteinen ist. Bisher konnte RanBP16 keine definierte Funktion zugeordnet werden. Bekannt ist lediglich die Interaktion mit der GTPase Ran. Weiterhin sind keine Proteine bekannt, die mit RanBP16 interagieren und hierdurch in den Nukleus importiert oder exportiert werden könnten. RanBP16 und das homologe RanBP17 sind im Vergleich zu anderen Ran bindenden Proteinen gering konserviert. Wie alle übrigen RanBP ko-lokalisiert RanBP16 mit dem sogenannten nukleären Poren Komplex und ist vorwiegend im Nukleus lokalisiert (96).

AH109-BRSV NS1-BD Hefezellen wurden mit dem RanBP16 cDNA Fragment retransformiert. Im Gegensatz zu Transformanten, die BRSV NS1 in Kombination mit diesem Proteinfragment synthetisierten, wurde bei AH109-BRSV NS2-BD Hefezellen keine β-Galaktosidase Aktivität gemessen (Abb. 22), weshalb zunächst eine spezifische Interaktion mit NS1 angenommen wurde.

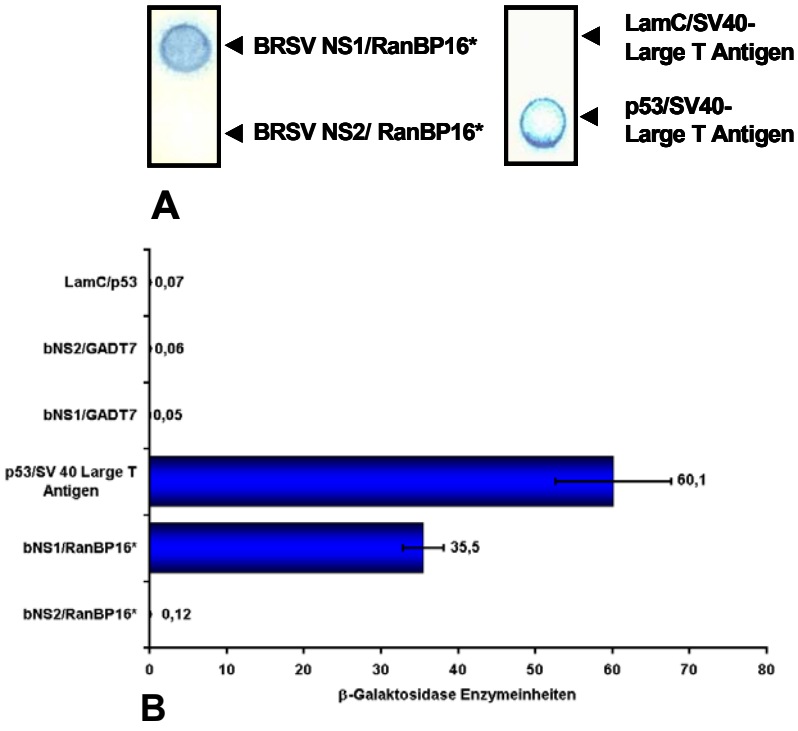


Abb. 22 Interaktion von BRSV NS-Proteinen mit RanBP16*

(A) Filtertest zum Nachweis von β-Galaktosidase. Erhöhte β-Galaktosidase Aktivität wird hierbei nur durch Expression von bNS1 und RanBP16* in AH109 gemessen. (B) Quantitativer Nachweis von β-Galaktosidase. Transformierte Y187 Hefezellen bestätigen die Interaktion von RanBP16* mit BRSV NS1 durch erhöhte β-Galaktosidase Aktivität. Y187 Hefezellen wurden zur Negativkontrolle entweder mit pGADT7 Vektoren oder LamC/p53 cDNAs transformiert.

4.2.5.2 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und RanBP16*

Um die Spezifität der Interaktion zu analysieren, wurde das C-terminale RanBP16* Proteinfragment in AH109 Hefezellen synthetisiert, die entsprechende Deletionsmutanten des BRSV NS1 synthetisierten. Hierbei hatten wiederum geringfügige Deletionen des NS1 Proteins großen Einfluss auf die Interaktion. Nach Transformation der Hefezellen wurde nur Wachstum bei Interaktion mit Wildtyp NS1 beobachtet. Sämtliche Deletionsmutanten interagierten dagegen nicht mehr mit dem C-terminalen RanBP16* Fragment.

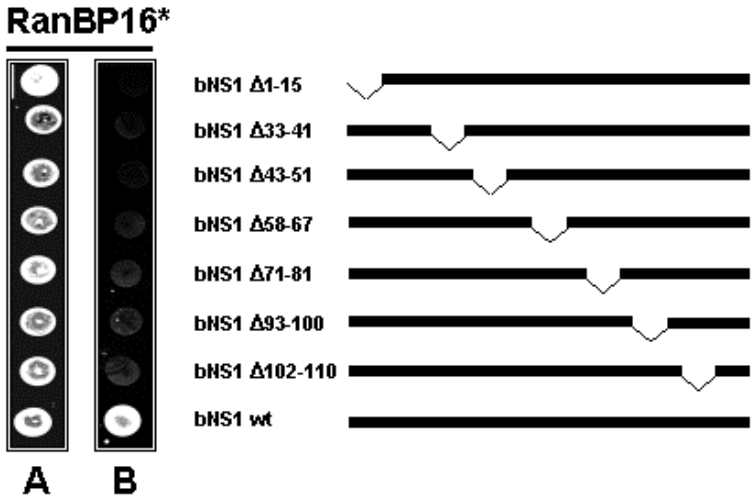


Abb. 23 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und RanBP16*

(A) Hefewachstum unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen bindet nur bNS1wt das RanBP16* Proteinfragment.

4.2.5.3 Interaktion der Pneumovirus NS-Proteine mit RanBP16

Durch Expression der isolierten RanBP16 cDNA aus der Expressionsbibliothek wurde in verschiedenen Hefestämmen mit unterschiedlichen Testsystemen eine Interaktion dieses Proteinfragments mit BRSV NS1 identifiziert und charakterisiert. BRSV NS2 bindet RanBP16* offensichtlich nicht. Um zu testen, ob BRSV NS1 und NS2 mit dem gesamten Protein interagieren kann, wurden zusätzlich AH109-BRSV NS2-BD Hefezellen mit der gesamt cDNA für RanBP16 transformiert. Die Bindung an NS1 wurde hierdurch bestätigt und zusätzlich eine Bindung an BRSV NS2 festgestellt. Interessanterweise reagierten die NS-Proteine des HRSV und PVM ebenfalls mit dem gesamten RanBP16 (Abb. 24), was zusätzlich durch α-

Galaktosidaseaktivität der Transformanten auf Agarplatten demonstriert wurde (nicht gezeigt).

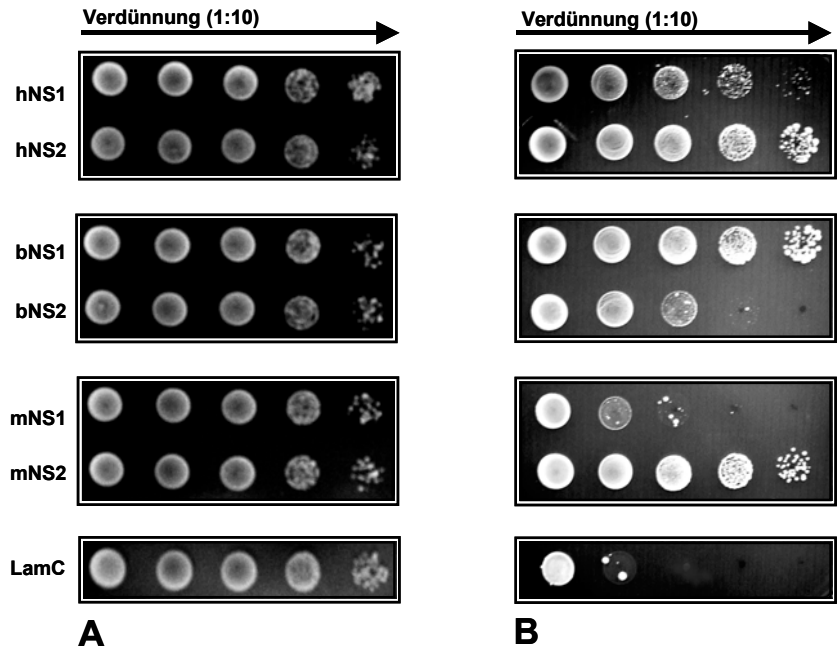


Abb. 24 Interaktion von RanBP16 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren

(A) Mit vollständiger RanBP16 cDNA transformierte Hefen wachsen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen zeigen die jeweiligen Hefestämme besseres Wachstum als die Negativkontrolle (LamC).

4.2.5.4 Ko-Immunpräzipitation von BRSV NS-Proteinen durch RanBP16

Durch Analysen mit dem Y2H System wurde die Interaktion von RanBP16 mit beiden NS-Proteinen identifiziert und charakterisiert. Um die Interaktion rekombinanter Proteine in BSR Zellen zu zeigen, wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierbei interagierte RanBP16 tatsächlich mit beiden NS-Proteinen entweder einzeln überexprimiert (nicht gezeigt) oder in Kombination (Abb. 25).

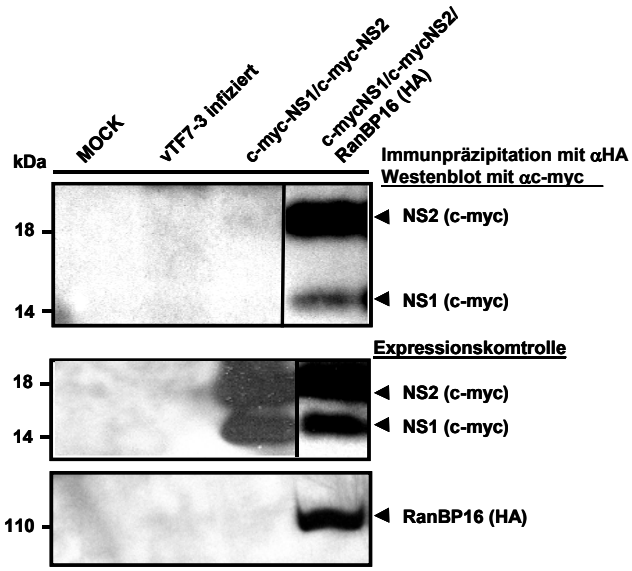


Abb. 25 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch RanBP16

BSR Zellen wurden mit Vaccinia Viren (vTF7-3) infiziert (MOI = 5) und anschließend mit 2 µg der angegebenen cDNAs transfiziert. 24 h nach Expression der cDNAs wurden Ko-Immunpräzipitationen mit αHA Antikörpern durchgeführt. Neben der Mock Kontrolle wurden Lysate von Vaccinia infizierten Zellen mit αHA Antikörpern inkubiert (Spur 2). c-myc fusionierte BRSV NS-Proteine werden durch HA spezifische Antikörper nicht immunpräzipitiert (Spur 3).Nach zusätzlicher Transfektion der Zellen mit der RanBP16 cDNA werden die viralen NS-Proteine durch rekombinantes RanBP16 ko-immunpräzipitiert (Spur 4).

4.2.5.5 Ko-Lokalisation von BRSV NS1 und RanBP16

Nachdem verschiedene RanBP16 Fusionskonstrukte (c-myc, EGFP) in BSRT7-5 Zellen exprimiert wurden und sich die Lokalisation des Proteins durch die Fusion nicht änderte (nicht gezeigt), wurde für weitere Analysen RanBP16 zur Vereinfachung als EGFP Fusionsprotein exprimiert. RanBP16 ist vorwiegend im Kern lokalisiert, wurde jedoch z.T. im Zytoplasma nachgewiesen (Abb. 26). Da EGFP-RanBP16 die nukleäre Pore passieren kann, handelt es sich nicht ausschließlich um ein Kernprotein. Nach Expression von EGFP-C3-RanBP16 und Infektion mit BRSV NS1(HA) wurde eine deutliche Ko-Lokalisation der Proteine im Zellkern beobachtet.

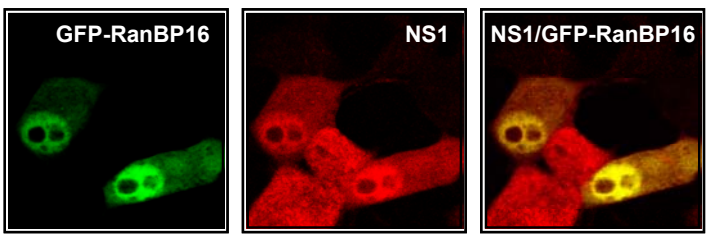
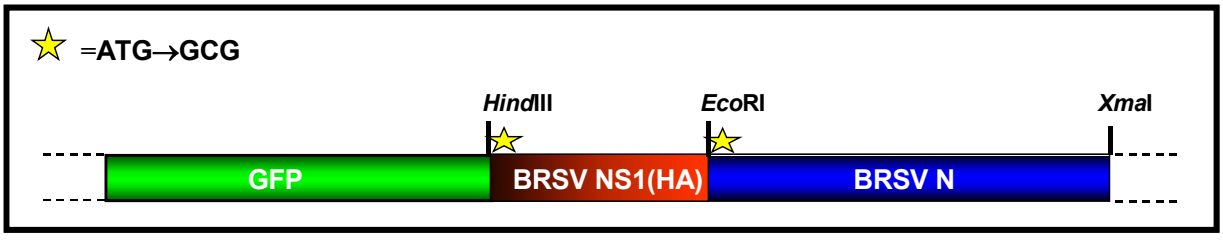


Abb. 26 Ko-Lokalisation von EGFP-RanBP16 mit BRSV NS1 nach Infektion in BSRT7-5 Zellen

Die Abbildung zeigt einzelne BRSV-infizierte Zellen. Das EGFP-RanBP16 Fusionsprotein (grün) ist vorwiegend im Nukleus lokalisiert. NS1 (HA) wurde in infizierten Zellen mit spezifischen HA Antikörpern nachgewiesen (Y11, Verdünnung 1:100; sekundärer Cy3 gekoppelter Antikörper, Verdünnung 1:100). Die dritte Abbildung zeigt eine gemeinsame Lokalisation der Proteine im Zellkern nach Überlagerung beider Kanäle.

4.2.5.6 Nachweis des NS1 Fusionsproteins im Zellkern

Durch die Identifizierung des RanBP16 Proteins als Interaktionspartner für NS-Proteine, wurde ein erster Hinweis auf einen aktiven Transport der NS-Proteine in den Nukleus erhalten. Um einen weiteren Hinweis auf einen aktiven Transport zu erhalten, wurde ein Fusionskonstrukt kloniert, das zur Synthese eines ca. 75 kDa Proteins in transfizierten Zellen führt. Hierzu wurde die EGFP cDNA in Fusion mit der NS1- und BRSV N cDNA kloniert. Aufgrund der Größe des Fusionsproteins kann eine Diffusion in den Zellkern ausgeschlossen werden, da Protein mit einer Molekülgröße von mehr als 50 kDa nicht in den Zellkern diffundieren (106). Zudem wurde mit BRSV N ein ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiertes Protein fusioniert, das zusätzlich eine Lokalisation im Zytoplasma gewährleisten sollte. Nach Transfektion von BSR Zellen fluoreszierte der Nukleus und das Zytoplasma deutlich nach Anregung des EGFP. Durch Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen das HA Epitop und das BRSV N wurde deutlich, dass das gesamte Fusionsprotein in den Nukleus transportiert wird. Der NS1 Fusionsanteil ist offensichtlich für einen aktiven Transport des Proteins in den Zellkern verantwortlich, da das Fusionsprotein genau wie Wildtyp NS-Proteine nach Infektion in beiden zellulären Kompartimenten lokalisiert ist. Mit Hilfe dieses Fusionskonstrukts sollte es in Zukunft möglich sein, durch *in vitro* Mutagenese Sequenzen zu identifizieren, die für den Transport des NS-Proteins in den Zellkern verantwortlich sind und die Bedeutung der RanBP16 Interaktion für den nukleären Transport zu validieren.



A

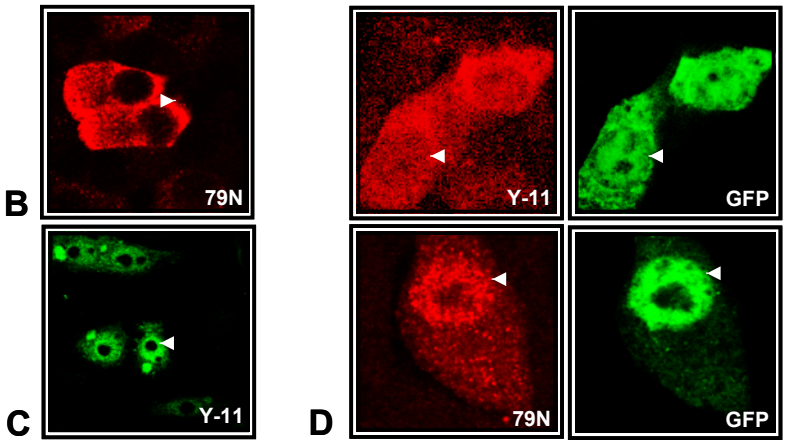


Abb. 27 Nachweis des EGFP-NS1-N Fusionsproteins im Nukleus transfizierter BSR Zellen

(A) Schematische Darstellung des artifiziellen Fusionskonstrukts. Die Startkodons der NS1 und N Fusionsanteile wurden jeweils mutiert (ATG→GCG), um interne Initiation der Translation zu vermeiden. (B) Mit 1 µg BRSV N cDNA transfizierte BSR Zellen zeigen zytoplasmatische Lokalisation des Proteins (Antikörper 79N/Cy3 jeweils in Verdünnung 1:100). (C) NS1 ist in infizierten Zellen im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert (Antikörper Y11/FITC jeweils Verdünnung 1:100). (D) Nach Transfektion ist das Fusionskonstrukt im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert, was durch EGFP Fluoreszenz und Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen NS1-HA (Y11) und N (79N, jeweils sekundäre Cy3 gekoppelte Antikörper, Verdünnung 1:100) nachgewiesen wurde. Weiße Pfeilspitzen markieren jeweils den Nukleus.

4.2.6 Interaktion viraler NS-Proteine mit MM-1

4.2.6.1 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit dem MM-1 Proteinfragment

Eine weitere cDNA, die für ein Proteinfragment des Kernproteins c-Myc Modulator 1 (MM-1, Aminosäuren 18-167) kodiert, wurde ebenfalls aus der Expressionsbibliothek isoliert. MM-1 wurde als Kernprotein beschrieben, das mit dem Proto-Onkogen c-Myc interagiert. MM-1 reprimiert spezifisch E-Box abhängige, c-Myc vermittelte Transkription nach Überexpression der MM-1 cDNA (115). Weitere Studien gaben Hinweise auf den molekularen Mechanismus der c-Myc Repression. MM-1 interagiert demnach mit dem Ko-Repressor TIF1β/KAP1 und rekrutiert einen Komplex aus den Proteinen c-Myc, mSin3 und HDAC1 (Histon Deacetylase 1). MM-1 wird daher als Adapterprotein zur Rekrutierung dieses Repressorkomplexes an c-Myc und zelluläre Promotoren diskutiert (131). Weiterhin wird eine Interaktion des MM-1 mit p73 diskutiert, das Homologien zum Tumorsupressor p53 aufweist. Wie p53 arretiert p73 nach Überexpression den Zellzyklus, wobei nur p73 durch MM-1 aktiviert wird. c-Myc

bindet ebenfalls p73 und kann hierdurch den Zellzyklus Arrest verhindern (155). MM-1 inhibiert demnach die Aktivität von c-Myc an verschiedenen Promotoren und scheint daher ein c-Myc Repressor zu sein.

Durch Re-Transformation der Hefezellen wurde die Bindung von BRSV NS1 an das MM-1 Proteinfragment bestätigt (Abb. 28A). Da MM-1 Reportergene in Hefe nicht transaktiviert, ist die Expression der Reportergene auf die Interaktion der NS Fusionsproteine mit MM-1 zurückzuführen. Durch Transformation des Hefestamms Y187 mit entsprechenden cDNAs wurde die zuvor identifizierte Interaktion durch erhöhte β-Galaktosidase Aktivität *in vitro* bestätigt (Abb. 28B). Durch Transformation BRSV NS2 exprimierender Hefezellen mit dem MM-1 cDNA Fragment wurde zusätzlich eine Interaktion mit NS2 festgestellt.

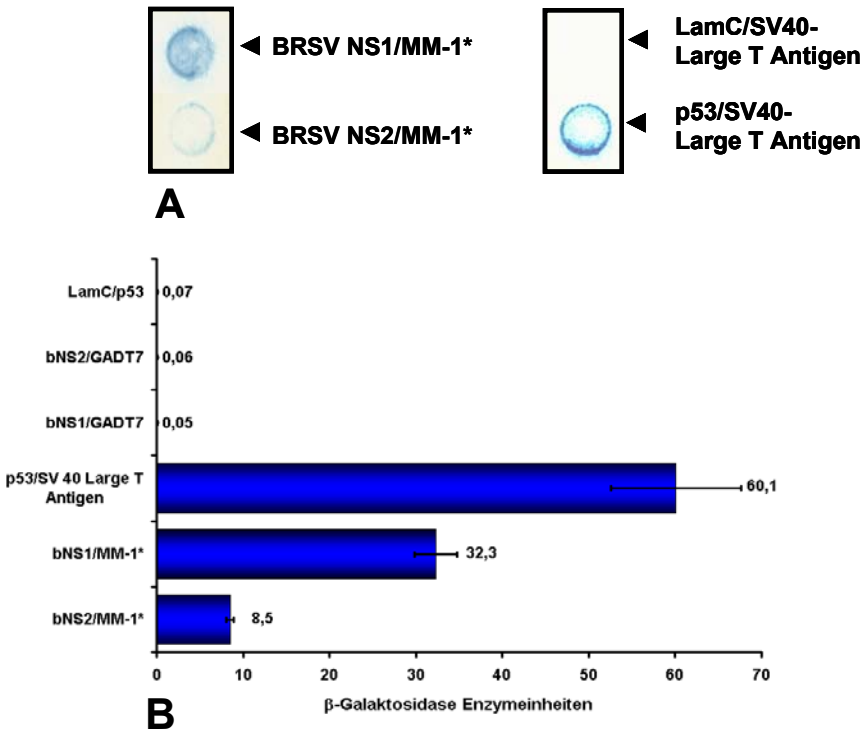


Abb. 28 Interaktion des MM-1 Proteinfragments (MM-1*) mit BRSV NS-Proteinen in Hefe

(A) Mit MM-1* transformierte AH109 Hefezellen zeigen erhöhte β-Galaktosidase Aktivität auf Filtern. (B) Transformierte Y187 Hefezellen bestätigen die MM-1*/NS-Interaktion durch erhöhte β-Galaktosidase Aktivität *in vitro*.

4.2.6.2 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und MM-1*

Die Spezifität der Interaktion von MM-1* wurde anschließend durch Mutationsanalyse mit BRSV NS1 in Hefe gezeigt (Abb. 29). Hierbei wird die Interaktion zwischen MM-1* und BRSV NS1 durch Deletionen des NS1 Proteins im Bereich der Aminosäuren 58-67 nicht und 93-100 nur unwesentlich in Hefe beeinträchtigt. Die Deletionsmutante bNS1Δ102-110 zeigte nach Expression in Kombination mit MM-1* sehr schwaches Wachstum, weshalb hier noch eine schwache Interaktion stattfinden sollte. Wie bereits für die Interaktion zwischen BRSV NS1 und NS2 gezeigt, wirken sich Deletionen im C-terminalen Bereich des NS1 Proteins weniger schwerwiegend auf die Interaktion aus.

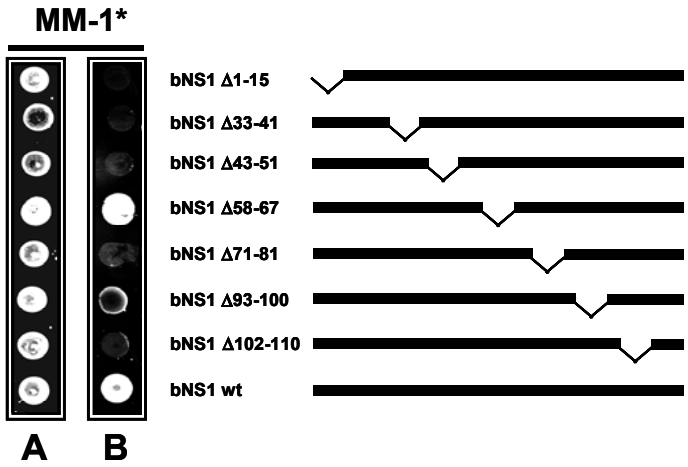


Abb. 29 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und MM-1

(A) Hefen unter nicht-selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen zeigen die Deletionsmutanten bNS1Δ58-67 und bNS1Δ93-100 keine Beeinträchtigung des Wachstums. Die Deletionsmutante bNS1Δ102-110 zeigt stark eingeschränktes Wachstum.

4.2.6.3 Interaktion der Pneumovirus NS-Proteine mit MM-1

Um die Interaktion von MM-1 mit den anderen NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren zu zeigen, wurden entsprechend konstruierte AH109 Hefestämme mit der vollständigen MM-1 cDNA transformiert. Obwohl geringfügige Deletionen von wenigen Aminosäuren des BRSV NS1 Proteins die Interaktion mit MM-1 verhindern können, bindet das MM-1 Protein neben den HRSV NS-Proteinen auch die PVM NS-Proteine in Hefe (Abb. 30).

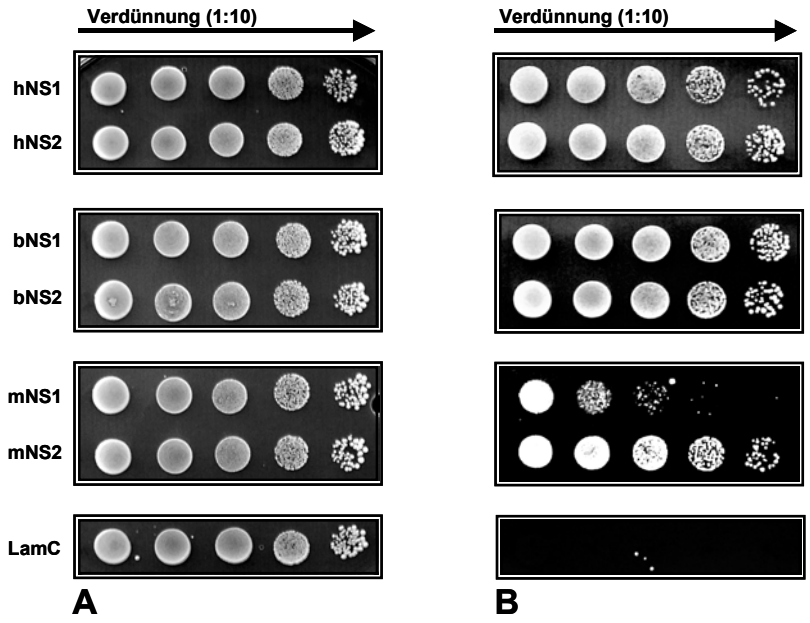


Abb. 30 Interaktion von MM-1 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren

(A) Hefen unter nicht-selektiven Bedingungen. (B) Unter selektiven Bedingungen wachsen Hefezellen nach Synthese der unterschiedlichen Virusproteine und MM-1. MM-1 transaktiviert dagegen die Reportergene bei Expression von LamC nicht.

4.2.6.4 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch MM-1

Zur Bestätigung der Interaktion wurden Ko-Immunpräzipitationen nach Infektion mit vTF7-3 und Synthese der Proteine in BSR Zellen durchgeführt. Hierbei wurde rekombinantes MM-1 in Fusion mit dem HA Epitop synthetisiert und mit spezifischen Antikörpern präzipitiert. Hierbei ko-immunpräzipitierten rekombinante BRSV NS-Proteine sowohl einzeln (nicht gezeigt) als auch in Kombination (Abb. 31).

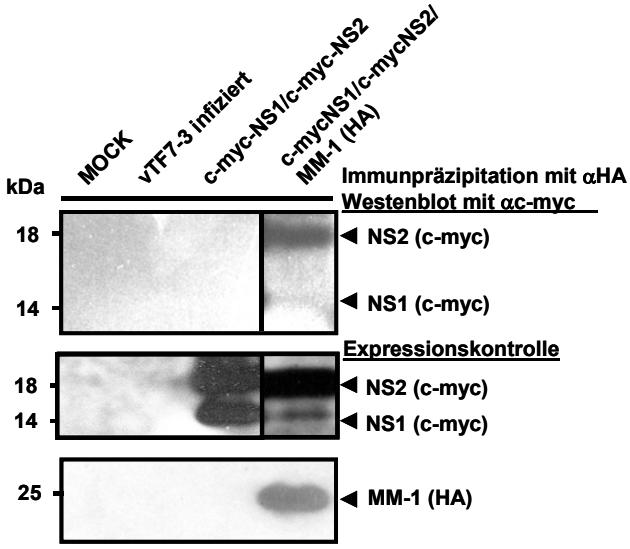


Abb. 31 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch MM-1

NS- und MM-1 cDNAs wurden in BSR Zellen rekombinant exprimiert und mit αHA Antikörpern immunpräzipitiert. Negativkontrollen zeigen auf dem Western Blot keine Signale (Spur 1 und 2). Durch Inkubation mit HA spezifischen Antikörpern (Y11) werden NS1 und NS2 nicht präzipitiert (Spur 3). Nach Synthese von MM-1 (HA) in BSR Zellen, werden beide rekombinanten NS-Proteine durch MM-1 ko-präzipitiert (Spur 4).

4.2.6.5 Interaktion von MM-1 mit BRSV NS-Proteinen *in vitro* (GST *pull down*)

Um die direkte Interaktion des zellulären Proteins mit den NS-Proteinen in einem weiteren unabhängigen Testsystem zu zeigen, wurden GST *pull down* Experimente durchgeführt. Hierzu wurden bakteriell synthetisierte BRSV GST-NS Fusionsproteine verwendet (4.2.2.1) und mit *in vitro* translatiertem ^{35}S markiertem MM-1 inkubiert. Nach Inkubation wurden GST Fusionsproteine mit Glutathionagarose präzipitiert. Nach Auftrennung im Polyacrylamidgel wurde mittels Autoradiographie ko-präzipitiertes MM-1 detektiert. Durch GST *pull down* wurde somit die direkte Interaktion zwischen MM-1 und den NS-Proteinen gezeigt.

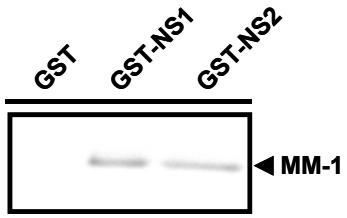


Abb. 32 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit MM-1 *in vitro*

Autoradiographie ko-präzipitierter MM-1 Proteine im GST *pull down*. 1,5 µg der GST Fusionsproteine wurden jeweils mit 5 µl ^{35}S radioaktiv markiertem MM-1 inkubiert (4 °C, 4 h). Die Proben wurden mit 50 µl Glutathionagarose inkubiert, zentrifugiert, 3x mit Puffer gewaschen und im Polyacrylamidgel aufgetrennt. GST ko-präzipitiert *in vitro* translatiertes MM-1 nicht (Negativkontrolle, Spur 1).

BRSV NS1 und NS2 in Fusion mit dem GST Epitop präzipitieren dagegen MM-1 *in vitro* (Spur 2 und 3).

4.2.6.6 Ko-Lokalisation von NS1 und MM-1

Da MM-1 bereits als Kernprotein beschrieben wurde, wurde zunächst von einer Ko-Lokalisation mit den NS-Proteinen in diesem Kompartiment ausgegangen. Die Expression der klonierten Konstrukte pTIT-c-myc-MM1 und EGFP-C3-MM-1 zeigten zunächst eine Lokalisation der Fusionsproteine im Zellkern. Allerdings wurden in Abhängigkeit von der Expressionszeit nach Transfektion der BSRT7/5 Zellen auch ausschließlich zytoplasmatische Lokalisationen des Proteins festgestellt. Da sowohl EGFP-MM-1 als auch c-myc fusioniertes MM-1 dieses Verhalten in Zellkultur zeigte, wurde der Einfluss der BRSV Infektion nach Transfektion der Zellen mit den EGFP Fusions cDNAs analysiert. Hierbei veränderte sich allerdings die unterschiedliche Lokalisation des Proteins nicht (Abb. 33).

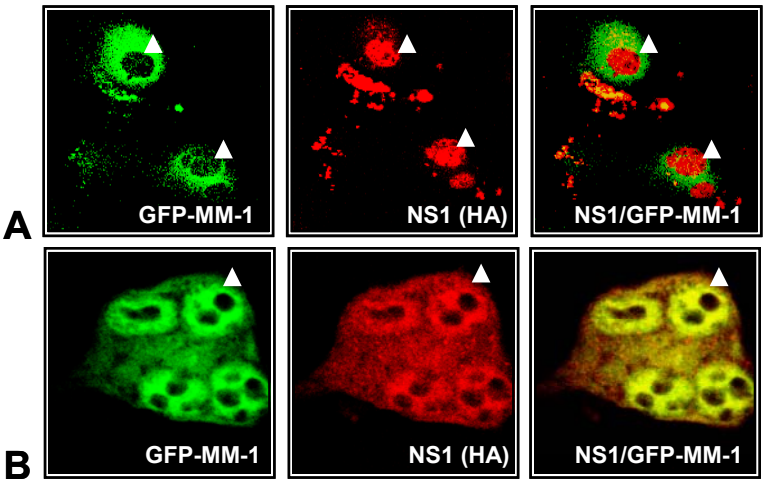


Abb. 33 Unterschiedliche Lokalisationen von EGFP-MM-1

BSR Zellen wurden mit 2 µg EGFP-MM-1 cDNA transfiziert und mit BRSV infiziert (MOI = 0,1). (A) 48 h nach Transfektion von BSR Zellen mit der EGFP-MM-1 cDNA ist rekombinantes MM-1 vorwiegend im Zytoplasma der Zellen lokalisiert. (B) Nach Transfektion der EGFP-MM-1 cDNA wurde bei einem Teil der Zellen eine vorwiegend nukleäre Lokalisation beobachtet, die nicht durch Infektion der Zellen mit BRSV beeinflusst wird. Neben der EGFP Fluoreszenz zum Nachweis des MM-1 Fusionsproteins, wurde NS1 mit HA spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Y11, Verdünnung 1:100; Cy3, Verdünnung 1:100). Zellkerne sind jeweils durch weiße Pfeilspitzen angedeutet.

4.2.6.7 Nachweis von zellulärem MM-1 mit spezifischen Antikörpern

Da in dieser Arbeit für MM-1 bisher nur Fusionsproteine synthetisiert wurden, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass für die unterschiedlichen Lokalisationen des MM-1 die jeweiligen Fusionsanteile verantwortlich sind. Um die Lokalisation des zellulären MM-1 zu analysieren, wurden polyklonale Peptidantikörper in Kaninchen synthetisiert. Zur Charakterisierung des MM-1 Antikörpers wurde MM-1 zunächst durch Western Blots in unterschiedlichen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 34A). Präimmunseren, die vor der Immunisierung mit dem MM-1 Peptid aus Kaninchen gewonnen wurden, erkennen MM-1 nicht. Der MM-1 Antikörper aus dem Immunserum erkennt neben dem rekombinanten- auch das endogene MM-1 in verschiedenen Zelllinien. Weiterhin eignet sich der Antikörper für die Immunfluoreszenz. Hier wurde gezeigt, dass zelluläres MM-1 ebenfalls seine Lokalisation in der Zelle ändern kann und entweder nur im Zytoplasma oder vorwiegend im Nukleus lokalisiert ist (Abb. 34A,B). Dieses Verhalten ist allerdings unabhängig von der BRSV Infektion,

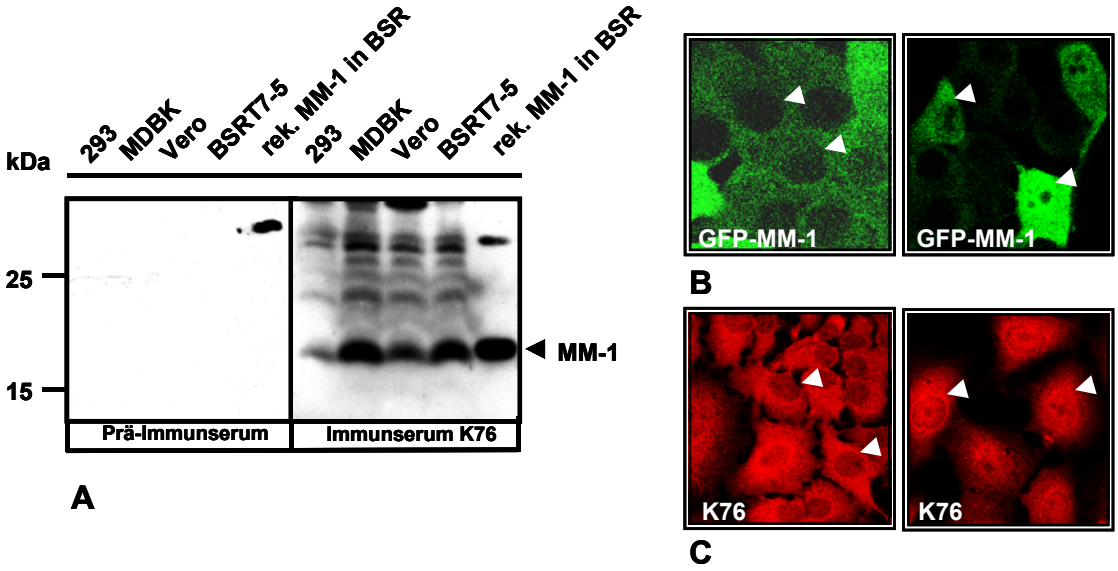


Abb. 34 Nachweis von MM-1 mit polyklonalem Serum (K79)

Charakterisierung des MM-1 spezifischen Immunserums K76. (A) Präimmunserum erkennt im Western Blot kein Protein mit der Größe des MM-1. Das MM-1 Immunserum erkennt dagegen MM-1 in verschiedenen Zelllinien. Als Positivkontrolle wurden Lysate MM-1 transfizierter Zellen aufgetragen (Spur 5). (B) Stabil exprimierende EGFP-MM-1-BSRT7/5 Zellen zeigen unterschiedliche Lokalisationen des Fusionsproteins. (B) Immunfluoreszenz mit dem spezifischen Serum zeigen identische Lokalisation in BSR Zellen (K79, Verdünnung 1:100, Cy3, Verdünnung 1:100). Weiße Pfeilspitzen deuten den Nukleus an.

4.2.6.8 Analyse der MM-1 Lokalisation mittels Videomikroskopie

Nachdem gezeigt wurde, dass rekombinantes EGFP-MM-1 und das endogene MM-1 identisch in Zellen lokalisiert sind, wurde die EGFP-MM-1-BSRT7/5 Zelllinie für die Videomikroskopie verwendet. Es zeigte sich, dass EGFP-MM-1 in der stabilen Zelllinie seine Lokalisation ändern kann und im Zellkern akkumuliert. Für diese Analysen wurden Zellen im Videomikroskop betrachtet, in denen EGFP-MM-1 ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war. Das Verhalten des rekombinanten Proteins wurde 11 h mit dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet, indem in Abständen von jeweils 20 min eine Aufnahme gemacht wurde, die als Film abgespielt werden können. In der Abbildung 36 ist eine Auswahl von Bildern zusammengestellt, die den Transport des Proteins in den Zellkern demonstrieren.

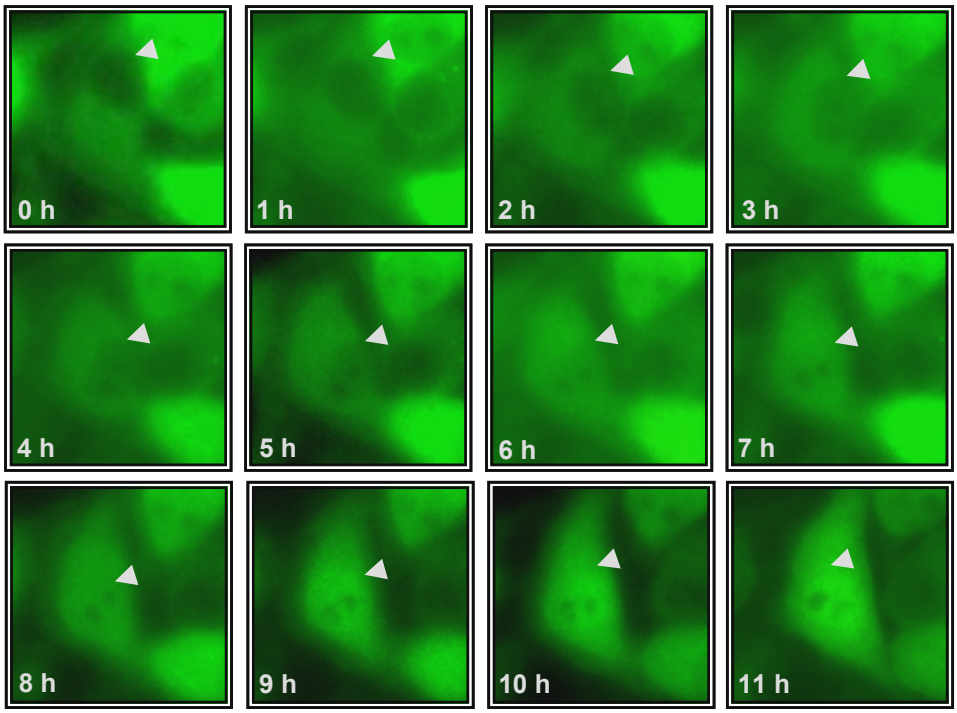


Abb. 35 Videomikroskopische Einzelaufnahmen der EGFP-MM-1 BSRT7/5 Zelllinie

Rekombinantes MM-1 strömt in den Nukleus und ist nach ungefähr 11 h vorwiegend im Nukleus lokalisiert.

4.2.6.9 Charakterisierung von BRSV Wachstum in Abhängigkeit von MM-1

Um den Einfluss des MM-1 auf das BRSV Wachstum zu studieren, wurden Infektionen von EGFP-MM-1-BSRT7/5 und BSRT7/5 Zellen mit BRSVwt und BRSV∆NS1/2 durchgeführt und das Viruswachstum im Abstand von 24 h bestimmt. Bei diesen Exprimenten wurde allerdings keine signifikante Veränderung des Viruswachstums in den beiden Zelllinien festgestellt (nicht gezeigt). Allerdings ist nicht klar, ob humanes MM-1 in Fusion mit EGFP in dieser Zelllinie funktionell ist, auch wenn sich das rekombinante Protein im Hinblick auf die Lokalisation nicht von zellulärem MM-1 unterscheidet.

4.2.7 Einfluss der Zellteilung auf BRSV Wachstum

Mit dem Y2H System wurden mit CDK4BP und MM-1 Kernproteine identifiziert, die im direkten Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus stehen. Während CDK4BP den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus stimulieren kann, wird für MM-1 eine Repressorfunktion durch Inhibition des c-Myc Proteins vermutet. Aufgrund dieser Daten wurde angenommen, dass die Proliferation der Zellen einen Einfluss auf die RSV Replikation haben könnte. Um zu untersuchen, inwieweit Zellteilung bzw. Wachstum der Wirtszelle die BRSV Replikation beeinflussen kann, wurden gehungerte (arretierte) Vero Zellen mit Wildtyp- und NS Deletionsviren infiziert und das Viruswachstum im Abstand von 24 h bestimmt. Durch den Entzug des FKS (0 % FKS, 48 h) aus dem Kulturmedium wird Wachstum und Teilung der Zellen stark eingeschränkt. In Vero Zellen ist BRSV∆NS1/2 gegenüber BRSVwt unter standardisierten Kulturbedingungen (2,5 % FKS) attenuiert. Es zeigte sich, dass Teilung bzw. Wachstum der Zellen eine wichtige Voraussetzung für optimales Viruswachstum ist, da beide Viren in gehungerten Zellen identisch replizierten. Durch Zusatz von 2,5 % FKS wird Wachstum bzw. Teilung der Zellen gewährleistet und BRSVwt wächst im Gegensatz zu BRSV∆NS1/2 deutlich schneller und zu höheren Virustitern (10 x), wogegen die Synthese der NS-Proteine in arretierten Vero Zellen kein Vorteil für BRSV ist. Diese Daten zeigten erstmals die Bedeutung der Zellteilung für BRSV.

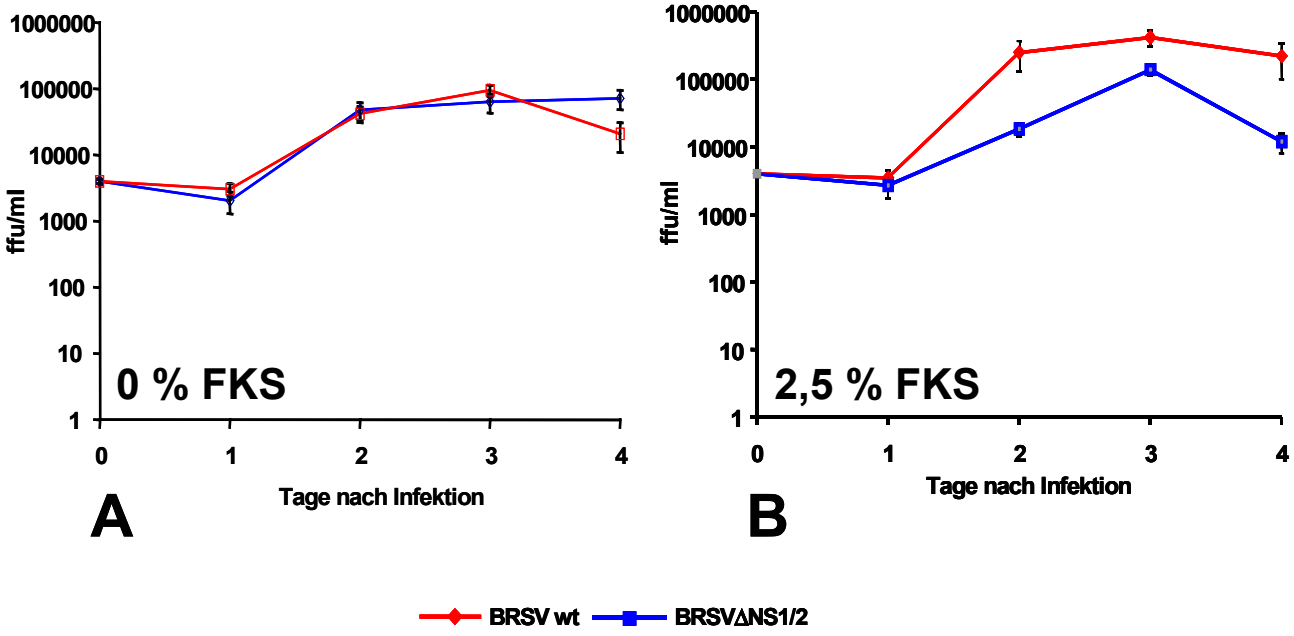


Abb. 36 Wachstum von BRSVwt und BRSVΔNS1/2 in Abhängigkeit von FKS

Vero Zellen wurden mit BRSVwt und BRSVΔNS1/2 infiziert (MOI = 0,1) und die Virustiter im Abstand von 24 h bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente. (A) In gehungerten Vero Zellen sind BRSVwt und BRSVΔNS1/2 attenuiert und wachsen zu identischen Titern. (B) Unter standardisierten Kulturbedingungen der Zellen (2,5 % FKS) wächst BRSVwt deutlich schneller zu höherem Virustiter im Vergleich zu BRSVΔNS1/2.

4.2.8 Interaktion viraler NS-Proteine mit der nukleären DEAD Box Helikase p68

4.2.8.1 Interaktion viraler NS-Proteine mit dem p68 Proteinfragment

Der fünfte isolierte NS1-Interaktionspartner ist ein C-terminales Fragment der nukleären DEAD Box Helikase p68 (Aminosäuren 266-614). Hierbei interagiert BRSV NS1 mit p68 unabhängig von der DEAD Box, die dem C-terminalen Proteinfragment fehlt. Biochemisch ist p68 recht gut charakterisiert, allerdings wurden definierte biologische Funktionen erst kürzlich vorgeschlagen. Neben der ATP abhängigen RNA Helikaseaktivität, die durch die DEAD Box Domäne vermittelt wird (76, 80), wurde p68 als Koaktivator der Genexpression durch Interaktion mit CBP/p300 beschrieben (47, 130). Weiterhin wird p68 als essentieller Splicingfaktor diskutiert (66, 103). Diese Funktionen sind jedoch unabhängig von der Helikaseaktivität. Somit handelt es sich bei p68 offensichtlich um ein multifunktionelles Protein. Die p68 Expression wird in Zellkultur durch Serum

induziert, weshalb von einer temporären Funktion im Zellzyklus ausgegangen wird (143).

Durch Re-Transformation der Hefezellen mit der isolierten p68* cDNA wurde die Interaktion mit BRSV NS1 zunächst in Hefe bestätigt und zusätzlich auch hier eine schwache Interaktion zwischen BRSV NS2 und dem C-terminalen p68 Proteinfragment identifiziert. Offensichtlich ist für die Interaktion beider NS-Proteine das C-terminale Fragment ausreichend.

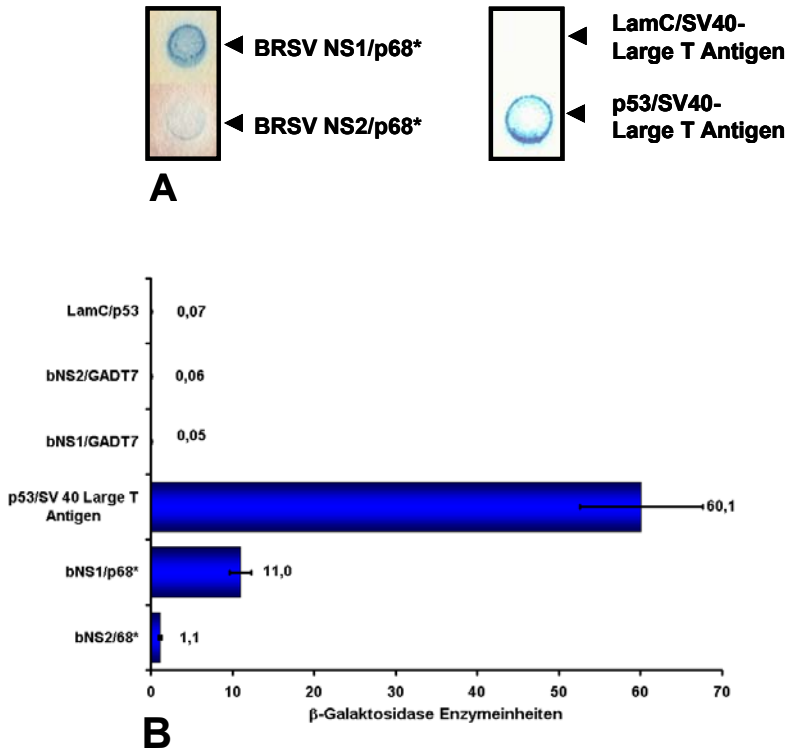


Abb. 37 Interaktion des p68 Proteinfragments (p68*) mit BRSV NS-Proteinen in Hefe

AH109 Transformanten zeigen β-Galaktosidaseaktivität auf Filter durch Interaktion beider NS-Proteine mit p68* (A). Y187 Transformanten zeigen deutlich erhöhte β-Galaktosidaseaktivität *in vitro* im Vergleich zu den Negativkontrollen (B).

4.2.8.2 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und p68*

Um die Spezifität der Interaktion zu analysieren, wurden Hefezellen, die NS1 Deletionsmutanten synthetisieren, mit der p68* cDNA transformiert. Wie schon bei Mutationsanalysen mit MM-1 und β-COPI gezeigt, ist auch hier der C-Terminus für diese Interaktion von geringerer Bedeutung. Deletionen im Bereich des N-Terminus wirken sich wesentlich schwerwiegender auf die Interaktion der Proteine aus.

Positive Interaktionen mit p68 wurden neben dem Wildtyp NS1, nur mit den Deletionsmutanten bNS1Δ43-51, bNS1Δ93-100 und bNS1Δ102-110 beobachtet.

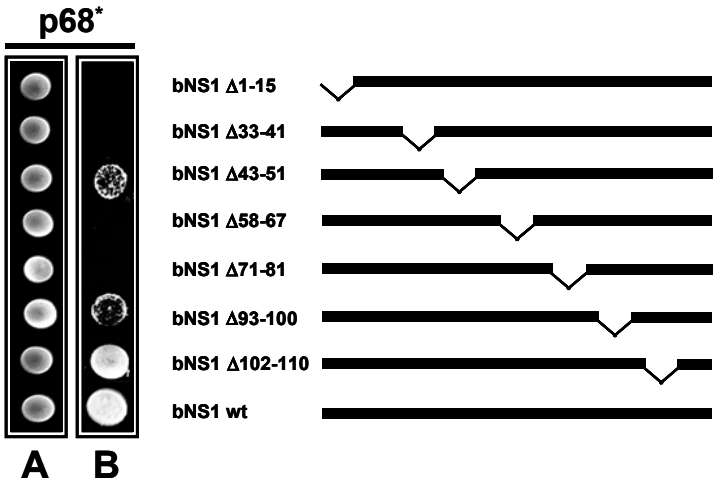


Abb. 38 Mutationsanalyse der Interaktion zwischen BRSV NS1 und p68*

(A) Hefen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) Deletionen im Bereich des NS1 C-Terminus (bNS1Δ93-100 und bNS1Δ102-110) ermöglichen Wachstum der Hefezellen durch Interaktion mit p68*. Außerdem beeinflusst die Deletion der Aminosäuren 43-51 nicht die Interaktion mit dem zellulären Protein.

4.2.8.3 Interaktion der Pneumovirus NS-Proteine mit p68

Um zu zeigen, dass die NS-Proteine anderer Pneumoviren ebenfalls mit p68 interagieren, wurden AH109 Hefezellen mit der gesamt cDNA im Hefeexpressionsvektor transformiert. Wie bereits für die anderen interagierenden zellulären Proteine beschrieben, interagiert p68 auch mit den NS-Proteinen des HRSV und PVM.

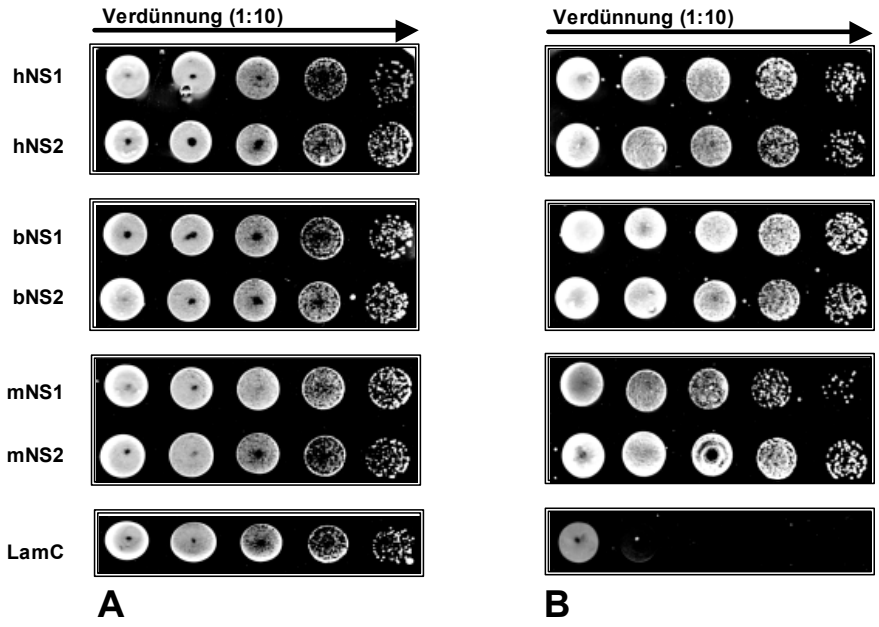


Abb. 39 Interaktion von p68 mit NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren

(A) Hefen unter nicht selektiven Bedingungen. (B) AH109 Hefezellen, die NS-Proteine verschiedener Pneumoviren und das vollständige p68 Protein synthetisieren, wachsen durch Interaktion mit p68 im Gegensatz zur Negativkontrolle.

4.2.8.4 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch p68

Zur Bestätigung der Interaktion zwischen BRSV NS-Proteinen und der nukleären DEAD Box Helikase p68 wurden Ko-Immunpräzipitationen durchgeführt. Hierzu wurden BSR Zellen mit Vaccinia Viren infiziert und die entsprechenden cDNAs unter Kontrolle des T7 Promotors überexprimiert. Da für diese Ko-Immunpräzipitationen ein spezifischer monoklonaler Antikörper (C10) zur Verfügung stand, wurde das authentische p68 ohne Fusionsanteile exprimiert. Durch Immunpräzipitation des endogenen p68 wurde BRSV NS2 schwach ko-immunpräzipitiert. Durch Überexpression der p68 cDNA wurden beide viralen NS-Proteine durch das rekombinante p68 ko-immunpräzipitiert und auf dem Western Blot nachgewiesen (Abb. 40).

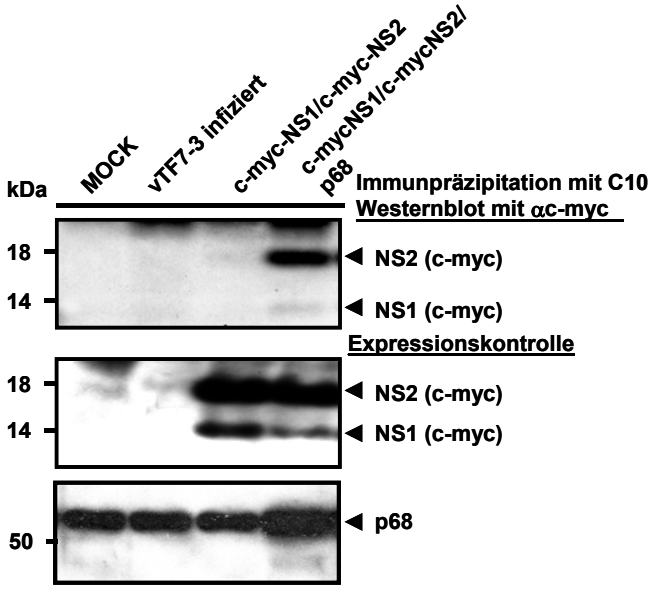


Abb. 40 Ko-Immunpräzipitation der BRSV NS-Proteine durch p68

NS- und p68 cDNAs wurden in BSR Zellen rekombinant exprimiert und mit αp68 (C10) Antikörpern immunpräzipitiert. Negativkontrollen sind in Spur 1 und 2 gezeigt. Durch Immunpräzipitation des zellulären p68 ko-immunpräzipitiert NS2 sehr schwach mit p68 (Spur 3). Durch Überexpression der p68 cDNA ko-immunpräzipitieren beide NS-Proteine mit p68. In der Expressionskontrolle ist in Spur 4 deutlich mehr rekombinantes p68 zu erkennen, verglichen mit dem zellulären Protein. Ko-immunpräzipitierte NS-Proteine wurden mit c-myc spezifischen Antikörpern (Verdünnung 1:1000) auf dem Western Blot nachgewiesen.

4.2.8.5 Interaktion von BRSV NS-Proteinen mit p68 *in vitro* (GST *pull down*)

Um eine direkte Bindung von p68 an NS1 und NS2 unter Ausschluss weiterer zellulärer Proteine zu demonstrieren, wurden Präzipitationen in Form von GST *pull down* durchgeführt. Hierzu wurde das verkürzte p68* Fragment und die gesamte p68 cDNA *in vitro* translatiert und ^{35}S radioaktiv markiert. Für die *pull down* Experimente wurden GST-BRSV NS Fusionsproteine entweder einzeln oder in Kombination eingesetzt. Sowohl das p68* als auch das gesamte p68 Protein interagierte hierbei direkt mit den beiden viralen NS-Proteinen *in vitro* (Abb. 41). Während bei der Präzipitation durch GST eine schwache Hintergrundbande detektiert wurde, ko-präzipitierte wesentlich mehr p68 Protein durch GST-NS1 und GST-NS2. Die Kombination beider NS-Proteine beeinflusste hierbei die Interaktion nicht. Weiterhin wurde eine Bindung an ein verkürztes, intern initiiertes p68 beobachtet. Die N-terminalen Aminosäuren des p68 besitzen somit für die Interaktion mit den NS-Proteinen keine Relevanz.

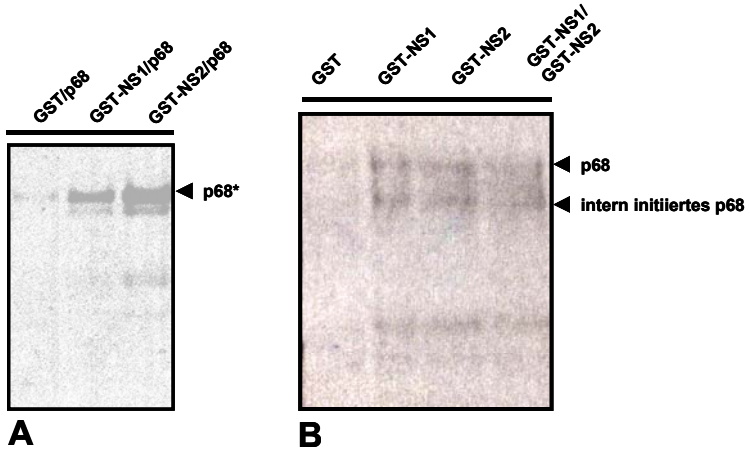


Abb. 41 Interaktion der BRSV NS-Proteine mit p68 *in vitro*

Autoradiographie ko-präzipitierter p68 Proteine im GST *pull down.* 1,5 µg der GST Proteine wurden jeweils mit 5 µl des gleichen Translationsansatzes inkubiert (4 °C, 4 h), mit 50 µl Glutathionagarose präzipitiert und autoradiographisch sichtbar gemacht. (A) GST-BRSV NS-Proteine ko-präzipitieren ^{35}S markiertes p68* im Gegensatz zu GST. (B) NS Fusionsproteine interagieren auch mit dem gesamten p68 Protein. Das bei der *in vitro* Translation intern initiierte p68 interagiert ebenfalls mit beiden NS-Proteinen.

4.2.8.6 Ko-Lokalisation von BRSV NS1 und p68

Um das Verhalten von p68 in BRSV-infizierten Zellen zu analysieren, wurden Immunfluoreszenzen nach Infektion von Vero Zellen durchgeführt. Hierbei wurde zelluläres p68 direkt nachgewiesen, da sich der spezifische monoklonale Antikörper (C10) ebenfalls für die Immunfluoreszenz eignete. Die Lokalisation des p68 wurde zu frühen und späten Zeitpunkten der BRSV-Infektion analysiert. Wie bereits zuvor erwähnt, ist p68 im Nukleus lokalisiert. Nach Infektion mit BRSV verändert sich die nukleäre Lokalisation des p68 auch in der späten Phase der Infektion nicht, weshalb die Interaktion mit NS1/2 im Nukleus infizierter Zellen stattfinden sollte. Rekombinantes p68 in Fusion mit EGFP zeigte im Vergleich zum endogenen Protein eine veränderte Lokalisation im Zellkern. Offensichtlich tolerieren mit EGFP-C3-p68 transfizierte Zellen die starke Überexpression des Fusionsproteins nicht, so dass weiterhin nur zelluläres p68 nach Infektion analysiert wurde.

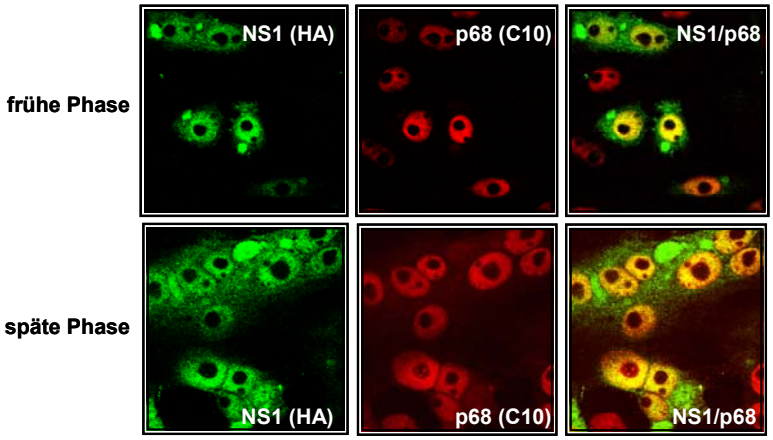


Abb. 42 Ko-Lokalisation von NS1 und p68 in infizierten Zellen

Frühe und späte Phase der BRSV Infektion von Vero Zellen. Die frühe Phase der Infektion zeigt einzelne infizierte und nicht infizierte Zellen. Die Lokalisation des zellulären p68 ist in beiden Fällen identisch. Auch in der späten Phase der Infektion, nach Ausbildung charakteristischer Synzytien, ändert sich die nukleäre Lokalisation des p68 nicht. Die Überlagerung der Kanäle demonstriert die Ko-Lokalisation beider Proteine in Zellkernen infizierter Zellen. NS1 wurde mit HA spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Y11, Verdünnung 1:100, sekundärer FITC gekoppelter Antikörper, 1:100). Zelluläres p68 wurde mit spezifischen Antikörpern (C10, Verdünnung 1:1000, sekundärer Cy3 gekoppelter Antikörper, Verdünnung 1:100).

4.3 Etablierung eines BRSV Expressionssystems zur Modulation zellulärer Proteinkonzentrationen nach Infektion

Um die Relevanz der identifizierten Interaktionen für BRSV in Zellkultur zu studieren, wurde ein Expressionssystem kloniert, mit dem zelluläre Konzentrationen interagierender Proteine moduliert werden sollten. Hierzu wurde BRSV selbst als Expressionsvektor verwendet. Durch Klonierung viraler Vektoren auf Basis des BRSV cDNA Antigenoms wurden zunächst Viren hergestellt, die die kodierende RNA der NS-interagierenden Proteine überexprimierten und somit eine erhöhte Proteinsynthese nach Infektion vermittelten. In einem weiteren Schritt wurden Viren hergestellt, die die komplementäre mRNA der Proteine überexprimierten. Durch Transkription dieser „antisense“ RNA sollte eine Inhibition der Translation und damit eine Reduktion der zellulären Konzentrationen der zellulären Proteine erreicht werden. Mit Hilfe dieses Systems wurde analysiert, ob veränderte Proteinkonzentrationen der interagierenden Proteine das Viruswachstum positiv oder negativ beeinflussen.

Um die Bedeutung der NS-Proteine bei eventuellen Veränderungen der Virusreplikation zu analysieren, wurden zusätzlich virale Vektoren kloniert, deren NS Genen deletiert wurden. Dies wurde für die „sense“ und „antisense“ exprimierenden Viren durchgeführt.

4.3.1 Expression des EGFP Gens durch BRSV

Um zu zeigen, dass die Expression einer zusätzlichen RNA durch BRSV möglich ist und keinen wesentlichen Effekt auf das Viruswachstum hat, wurde ein BRSV hergestellt, das EGFP stromaufwärts der NS Gene kodiert. Das zusätzliche Gen wird durch BRSV exprimiert und verursacht keine Änderung des Viruswachstums in Vero Zellen (Abb. 43C). Daher eignet sich BRSV offensichtlich als Expressionssystem für diese Experimente, da Proteinkonzentrationen in infizierten Zellen durch die modifizierten BRS-Viren verändert werden können.

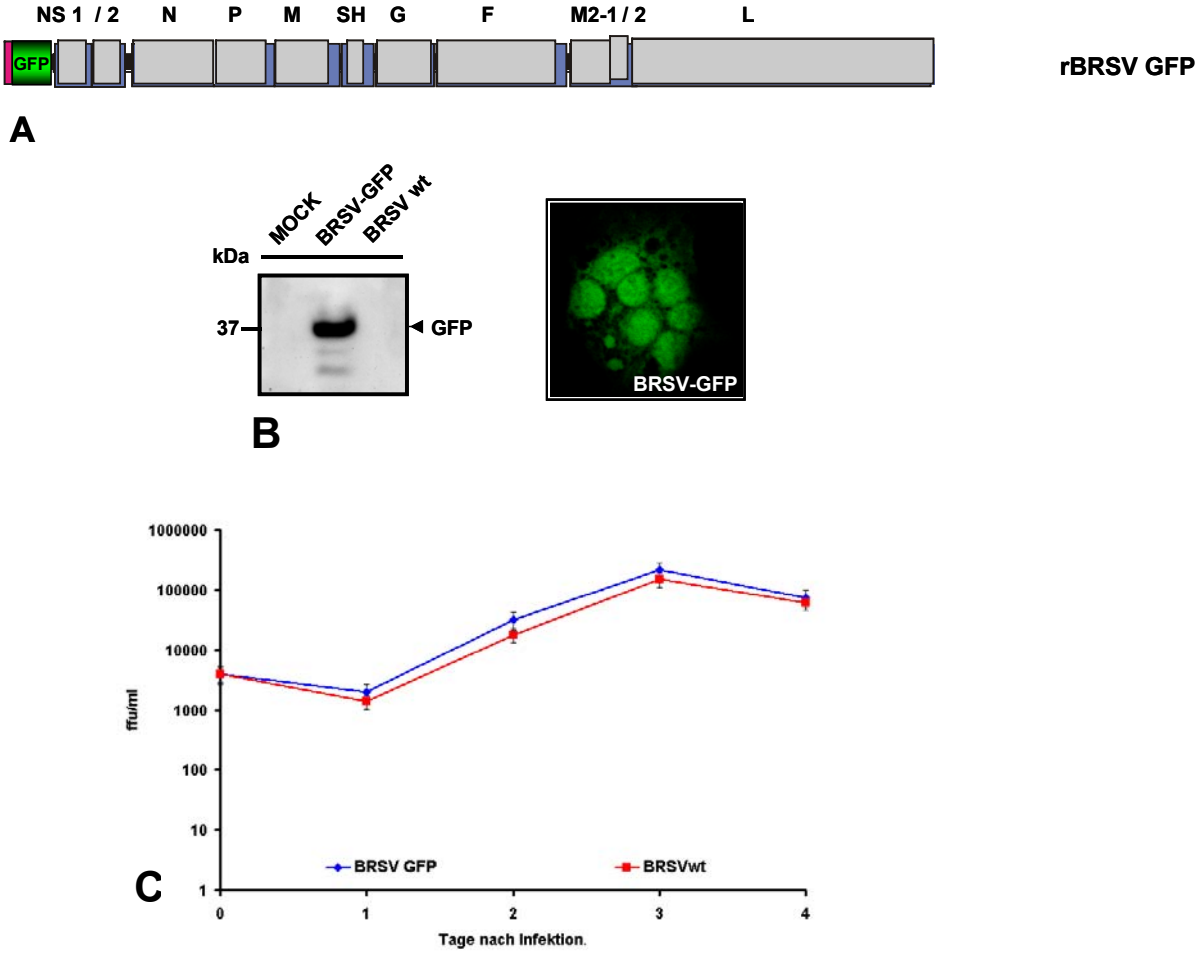


Abb. 43 Charakterisierung des rBRSV-EGFP

(A) Schematische Darstellung des modifizierten BRSV Genoms mit zusätzlichem Gen für EGFP. (B) BRSV EGFP Viren exprimieren das zusätzliche Protein, gezeigt durch Western Blot (GFP Antikörper, Verdünnung 1:3000) und durch Fluoreszenz infizierter Vero Zellen. (C) Vero Zellen wurden mit BRSVwt und BRSV-EGFP unter Standardbedingungen infiziert (MOI = 0,01) und die Virustiter im Abstand von 24 h bestimmt. Beide Viren wachsen vergleichbar in Vero Zellen unter standardisierten Kulturbedingungen.

4.3.2 Expression der MM-1 RNAs durch BRSV

Um die MM-1 Proteinkonzentration in infizierten Zellen zu modulieren, wurden BRS-Viren hergestellt, die entweder EGFP-MM1 RNA überexprimieren (rBRSV-EGFP-MM-1) oder komplementäre („antisense“) MM-1 RNA exprimieren (rBRSV-MM-1as). In BRSV-EGFP-MM-1 infizierten Zellen wurde EGFP-MM-1 deutlich überexprimiert und das Protein lokalisierte zudem vorwiegend im Kern infizierter Zellen (nicht gezeigt). Allerdings hatte die Überexpression keinen signifikanten Einfluss auf das Viruswachstum in Vero oder MDBK Zellen. Die Expression komplementärer MM-1 RNA zur Reduktion der Proteinkonzentration in infizierten Zellen führte nicht zu einer signifikanten Reduktion der zellulären Proteinkonzentration, was durch „Western blot“ bzw. Immunfluoreszenz mit K76 Serum festgestellt wurde (nicht gezeigt).

4.3.3 Modifizierte BRSV mit zusätzlichem p68 Gen

4.3.3.1 Expression der p68 RNA durch BRSV

Um den Einfluss von unterschiedlichen p68 Konzentrationen auf das BRSV Wachstum zu analysieren, wurde die p68 cDNA in unterschiedlichen Orientierungen stromaufwärts der NS Gene kloniert. Zusätzlich wurde ein weiteres Virus hergestellt, das p68 RNA mit mutiertem Startkodon exprimierte, wodurch die rekombinante Synthese des gesamten Proteins ausgeschlossen werden konnte. Allerdings sollte ein verkürztes p68 Protein durch interne Initiation der Translation von einem alternativen Startkodon synthetisiert werden, was bereits in der *in vitro* Translation gezeigt wurde. Dieses verkürzte Protein besitzt nach wie vor die intakte Interaktionsdomäne und interagiert zudem mit BRSV NS1 und NS2 *in vitro* (Abb. 41). Um zu zeigen, dass p68 RNA in „sense“ und „antisense“ Polarität durch BRSV exprimiert wird, wurden „Northern blot“ Analysen mit Strang-spezifischen, *in vitro* transkribierten Sonden durchgeführt. Wie in Abbildung 44 zu sehen, exprimieren

BRSV p68^{s} und BRSVp68^{AUG*} spezifisch p68 positiv-Strang RNA (mRNA „sense“) und BRSV p68^{as} p68 negativ-Strang RNA (mRNA „antisense“).

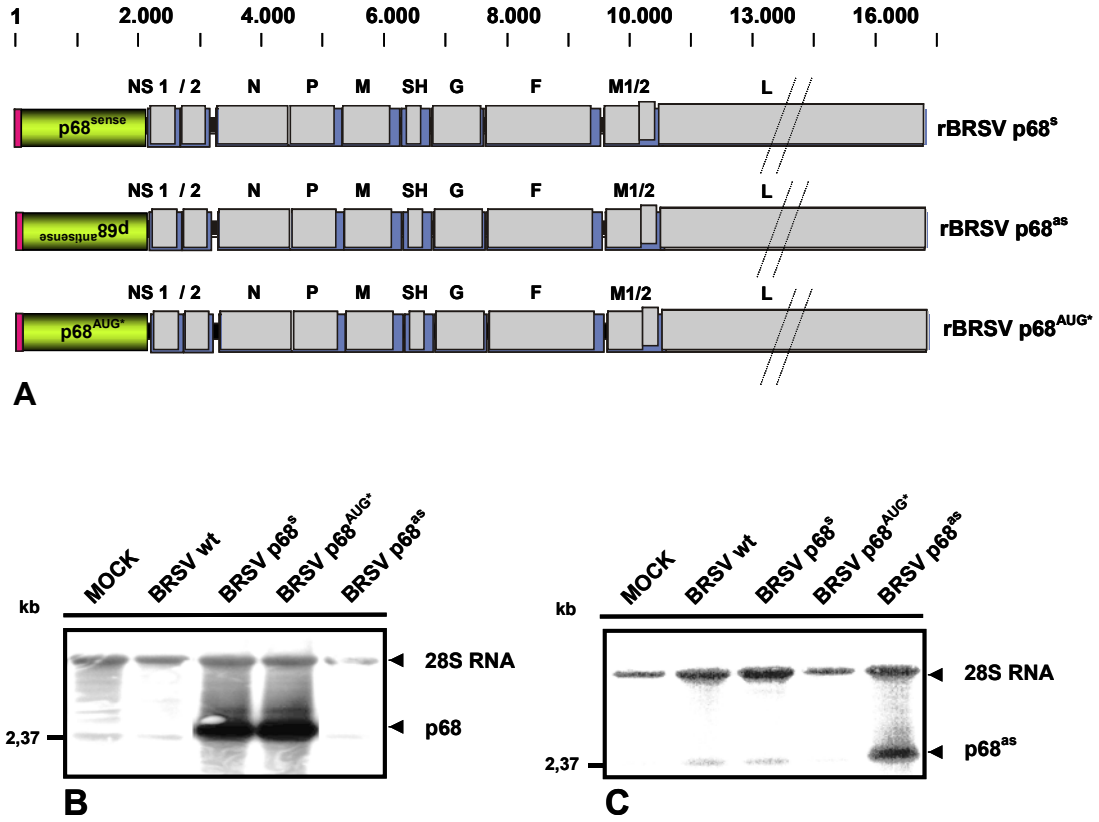


Abb. 44 Expression zusätzlicher p68 RNA durch BRSV

(A) Schematische Darstellung der modifizierten Virusgenome mit zusätzlichem p68 Gen. (B, C) Hybridisierung mit Strang-spezifischen, *in vitro* transkribierten RNA-Sonden demonstriert die Expression der zusätzlichen p68 RNAs unterschiedlicher Polarität.

4.3.3.2 Expression der p68 RNA durch BRSVΔNS1/2

Um den Einfluss der NS-Proteine auf eventuelle Veränderungen des Viruswachstum durch veränderte p68 Proteinkonzentrationen zu analysieren, wurden NS-Deletionsviren kloniert, die p68 RNAs überexprimieren (Abb. 45).

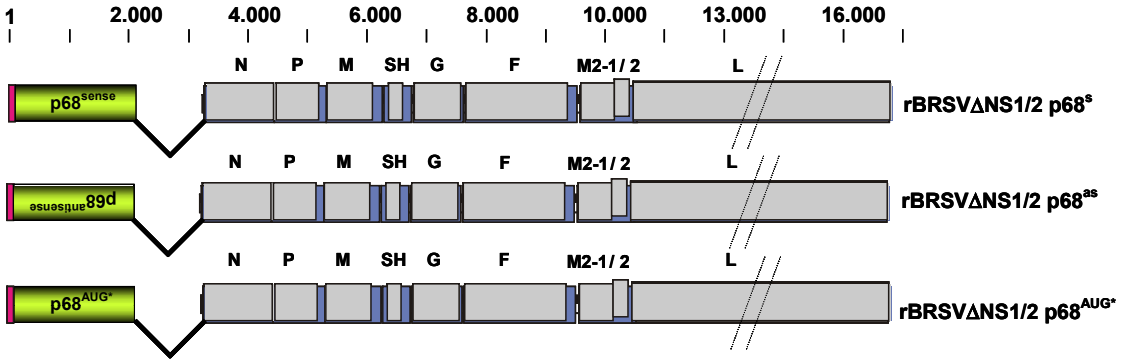


Abb. 45 Schematische Darstellung modifizierter BRSV Genome mit deletierten NS1/NS2 Genen

4.3.3.3 Charakterisierung modifizierter BRS-Viren

Alle oben beschriebenen Viren konnten ausgehend von cDNA (1.7.1 u. 3.2.5.1) in Zellkultur hergestellt werden. Zur Charakterisierung der Viren wurde die Expression der RNAs mittels Northern Blot analysiert (Abb. 44A). BRSVwt und BRSVΔNS1/2 vermitteln demnach effiziente Expression der p68 RNA in „sense“ und „antisense“ Orientierung.

Durch Western Blot wurde gezeigt, dass die zelluläre p68 Konzentration nach Infektion von Vero Zellen mit BRSV $p68^{s}$ und BRSVΔNS1/2 $p68^{s}$ ansteigt und dass zusätzliche Banden auf der Membran durch p68 spezifische Antikörper detektiert wurden (Abb. 46B,C). Offensichtlich reagieren intern initiierte oder verkürzte p68 Formen mit dem Antikörper nach BRSV Infektion, was besonders deutlich bei Überexpression der p68 RNA wird. Die zusätzlichen Banden werden auch in BRSVΔNS1/2 infizierten Zellen beobachtet.

Die BRS-Viren, die die komplementäre p68 RNA exprimieren, verursachten dagegen keine signifikante Reduktion der zellulären p68 Konzentration nach Infektion der Zellen. Offensichtlich lässt sich die Translation des p68 Proteins nicht durch Expression komplementärer p68 RNA effizient inhibieren.

BRS-Viren, die p68 RNA mit mutiertem Startkodon exprimieren, zeigten dagegen keine erhöhte zelluläre Konzentration des p68 nach Infektion der Zellen (BRSV $p68^{AUG*}$ und BRSVΔNS1/2 $p68^{AUG*}$). Allerdings wurde eine vermehrte Synthese des verkürzten p68 durch interne Initiation der Translation erreicht, sodass ein verkürztes p68 Protein mit intakter Interaktionsdomäne (Abb. 41) für NS1/2 in erhöhter Konzentration in infizierten Zellen synthetisiert wurde.

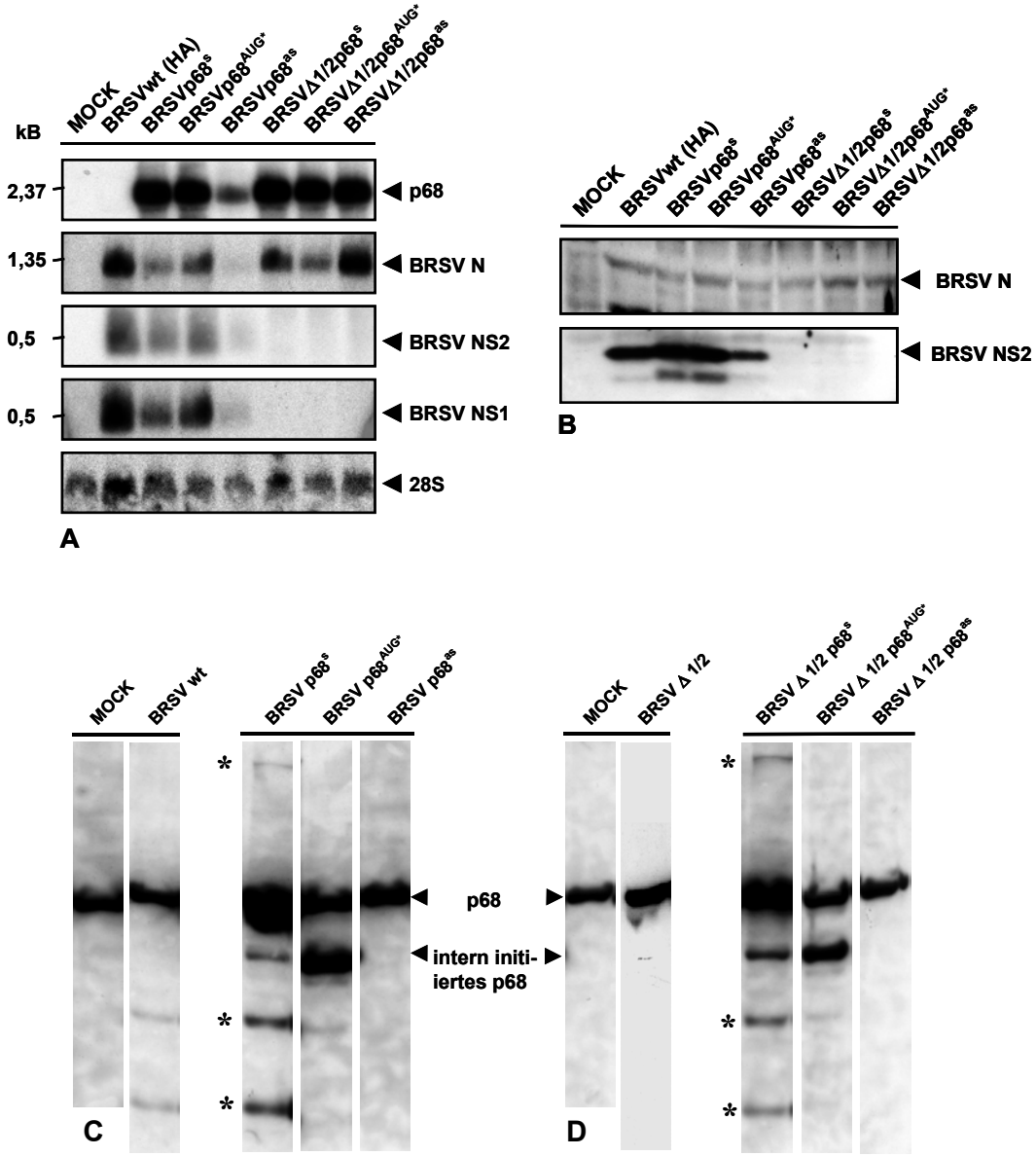


Abb. 46 Charakterisierung modifizierter BRS-Viren

(A) Vero Zellen wurden mit den oben beschriebenen Viren infiziert (MOI = 0,1) und die gesamt-RNA 48 h p.i. für Northern Blot Analysen isoliert. p68 RNA wird von allen modifizierten Viren exprimiert. Als Kontrolle für eine erfolgreiche Virusinfektion wurde N mRNA nachgewiesen. BRSVΔNS1/2 zeigt keine Signale bei Hybridisierung der NS1 und NS2 Proben. (B) Proteinlysate parallel infizierter Zellen wurden mittels Western Blot analysiert. NS1 und NS2 wird durch modifizierte Wildtyp-Viren, jedoch nicht von entsprechenden Deletionsviren synthetisiert (nachgewiesen mit I/CC Antikörpern, Verdünnung 1:500). Infektionskontrollen mit BRSV N Antikörpern. (C) Zelluläre p68 Konzentrationen sind nach Expression durch BRS-Viren stark erhöht und zeigen zusätzliche Signale (*). Intern initiiertes p68 wird durch BRSV $p68^{AUG*}$ deutlich überexprimiert. Durch Expression komplementärer p68 RNA ($p68^{AUG*}$) wird die zelluläre Konzentration nicht signifikant reduziert. (D) NS-Deletionsviren mit zusätzlichem p68 Gen zeigen ebenfalls mehrere p68 Formen nach Infektion und keine signifikante Reduktion der p68 Konzentration.

4.3.3.4 Konfokale Lasermikroskopie zur Analyse der p68 Expression

Zur Analyse der p68 Expression in infizierten Zellen wurden Immunfluoreszenz Analysen in infizierten und nicht infizierten Zellen durchgeführt. Durch Infektion mit BRSVwt wurde die Fluoreszenz und die Lokalisation des zellulären p68 nicht verändert, da BRSV keine p68 mRNA exprimiert. Wie bereits durch Western Blot Analysen gezeigt, wird durch Infektion mit BRSVp68^{s} und BRSVΔNS1/2p68^{s} die p68 Konzentration deutlich erhöht (Abb. 47). Allerdings wurde hierbei auch eine veränderte Lokalisation des Proteins im Zellkern beobachtet. In der Regel ist p68 gleichmäßig im Zellkern verteilt. Durch BRSV vermittelte Überexpression der p68 RNA lokalisierte das Protein allerdings vorwiegend an der Kernmembran. Zudem zeigten die Zellkerne nicht die üblich annähernd runde, sondern eine längliche Morphologie. Durch BRSV vermittelte Expression der p68 RNA mit mutiertem Startkodon (BRSV p68^{AUG*} und BRSVΔNS1/2 p68^{AUG*}) war die Konzentration des Proteins im Zellkern in der Immunfluoreszenz deutliche erhöht, allerdings wurde hier trotzdem eine normale, gleichmäßige Verteilung des Proteins beobachtet. Wie bereits durch Western Blot Analysen gezeigt, wurde auch in einzelnen, mit BRSVp68^{as} und BRSVΔNS1/2p68^{as} infizierten Zellen keine signifikante Reduktion der Proteinkonzentration beobachtet.

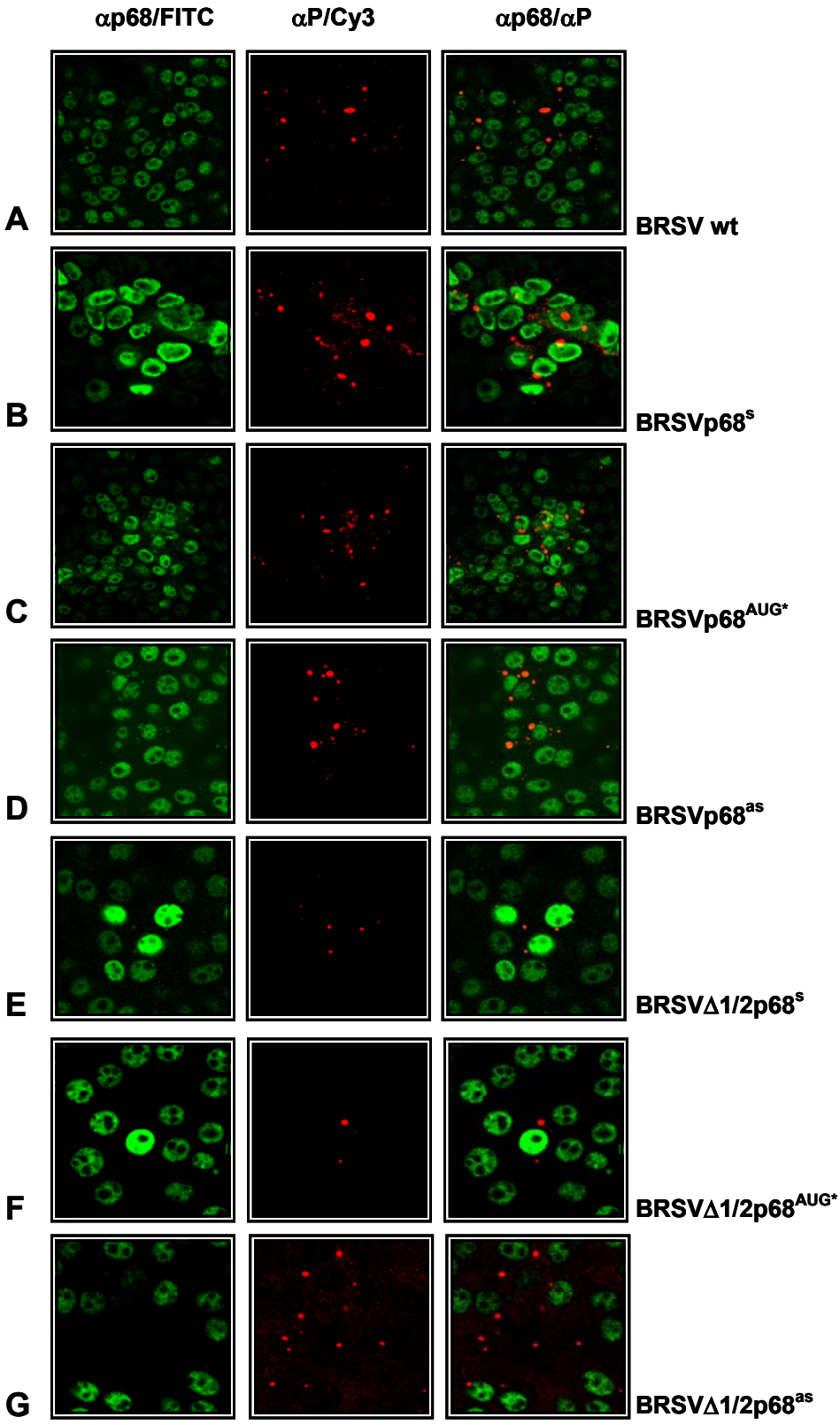


Abb. 47 Immunfluoreszenz Analyse der p68 Expression in infizierten Vero Zellen

(A) BRSVwt verändert weder die p68 Lokalisation noch die Intensität der Fluoreszenz in infizierten Zellen. (B) Die vermehrte Synthese des p68 Proteins durch BRSVp68^{s} führt jedoch zu veränderter Lokalisation des Proteins und veränderter Morphologie der Zellkerne. (C) Die vermehrte Synthese des verkürzten p68 Proteins führt ebenfalls zur erhöhten p68 Konzentration aber nicht zur veränderten

Morphologie der Zellkerne. (D) Expression der komplementären p68 RNA durch BRSVp68^{as} führt nicht zu signifikant reduzierten p68 Konzentrationen. (E-G) Die entsprechenden BRSVΔNS1/2 Viren zeigen vergleichbare Effekte in Bezug auf p68. BRSV P wurde mit E2F-1 Antikörpern nachgewiesen (Infektionskontrolle),(E2F-1, Verdünnung 1:100; sekundäre Cy3 Antikörper Verdünnung 1:100). p68 wurde mit C10 Antikörpern nachgewiesen (C10, Verdünnung 1:1000; sekundäre FITC gekoppelte Antikörper, 1:100).

4.3.3.5 Wachstumseigenschaften modifizierter BRS-Viren

4.3.3.5.1 Wachstum modifizierter BRS-Viren in MDBK Zellen

Um zu analysieren, ob die Expression der RNAs und die zusätzliche Synthese des p68 Proteins Auswirkungen auf das Wachstum der Viren in Interferon produzierenden Zellen hatte, wurden MDBK Zellen mit den p68 Rekombinanten infiziert. Zunächst wurde die BRSV F Proteinsynthese nach 48 h und 96 h mittels Immunfluoreszenz analysiert. Überraschenderweise wurde bei BRS NS-Deletionsviren, die zusätzliche p68 RNAs exprimierten, ebenfalls BRSV F Proteinsynthese nachgewiesen, während hingegen das BRSVΔNS1/2 Wachstum, durch die fehlende protektive Wirkung der NS-Proteine in MDBK Zellen, stark eingeschränkt ist.

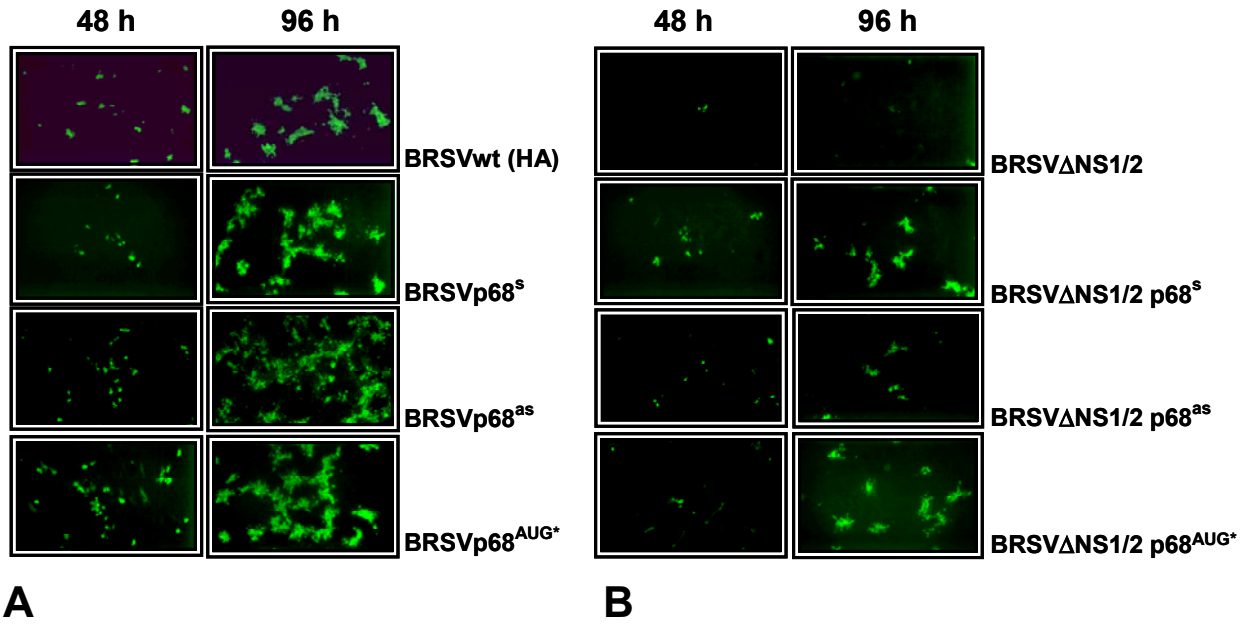


Abb. 48 Wachstum modifizierter BRS-Viren in MDBK Zellen

(A) BRSVwt und BRS-Viren mit zusätzlichen p68 RNAs zeigen Wachstum auf MDBK Zellen nach Infektion (MOI=0,1). (B) Im Gegensatz zu BRSVΔNS1/2, das auf MDBK Zellen stark attenuiert ist, scheinen die modifizierten Deletionsmutanten mit zusätzlichen p68 RNAs in MDBK besser zu wachsen. Die vermehrte Proteinsynthese nach 48 und 96 h ist durch Färbung der Präparate mit Antikörpern gegen BRSV F gezeigt (αBRSV F Antikörper, Verdünnung 1:100, FITC Antikörper 1:100)

4.3.3.5.2 Wachstum von BRSV mit zusätzlicher p68 RNA

Durch die Immunfluoreszenz wurde gezeigt, dass Wildtyp- und modifizierte Viren in MDBK-Zellkultur wachsen und sich von Zelle zu Zelle ausbreiten können. Um das Wachstum dieser Viren genauer zu charakterisieren, wurden die Virustiter im Abstand von 24 h bei Wachstum auf Interferon produzierenden-(MDBK) und nicht-produzierenden Zellen (Vero) bestimmt. Die Zellen wurden hierzu jeweils mit einer MOI von 0,01 infiziert. Im Vergleich zu BRSVwt waren die Viren BRSVp68^{s} und BRSVp68^{as} deutlich in beiden Zelllinien attenuiert (Abb. 49). Hierbei wurden bis zu zehnfach reduzierte Virustiter nach den jeweiligen Zeitabständen bestimmt, was auf eine langsamere Replikation dieser Viren hindeutet. Da bereits gezeigt wurde, dass durch Expression der komplementären RNA durch BRSVp68^{as} keine signifikante Reduktion der p68 Konzentration erreicht wurde, können unspezifische Effekte durch Expression der artifiziellen RNA auf die Zelle bei diesem Virus nicht ausgeschlossen werden. Da die Überexpression der p68 RNA durch BRSVp68^{s} eine veränderte Lokalisation des rekombinanten p68 verursacht, lassen sich unspezifische Effekte auf die Wirtszelle bei Infektion ebenfalls nicht ausschließen. Zudem zeigt p68 in Fusion mit EGFP eine ähnlich artifizielle Lokalisation in transfizierten Zellen (nicht gezeigt), wofür wahrscheinlich die hohe p68 Expression verantwortlich ist.

Interessanterweise wurden für BRSVp68^{AUG*}, das durch interne Initiation die Synthese des verkürzten p68 Protein vermittelt, im Vergleich zu BRSVwt höhere Virustiter nach 48 h bestimmt (Abb. 49). Für BRSVwt wurden, in Abhängigkeit von der Zelllinie, maximale Virustiter erst nach 72 h bzw. 96 h bestimmt. BRSVp68^{AUG*} repliziert dagegen sowohl in Vero als auch in MDBK Zellen reproduzierbar schneller als das Wildtypvirus, wächst jedoch nicht zu insgesamt höheren Virustitern heran. Offensichtlich ist die erhöhte zelluläre Konzentration des verkürzten p68 Proteins vorteilhaft für die Virusreplikation in Zellkultur. Es wird daher davon ausgegangen, dass das p68 voller Länge eher einen inhibitorischen Einfluss auf die Virusreplikation hat. Das verkürzte p68^{AUG*} dagegen Virusreplikation bzw. Wachstum unterstützt.

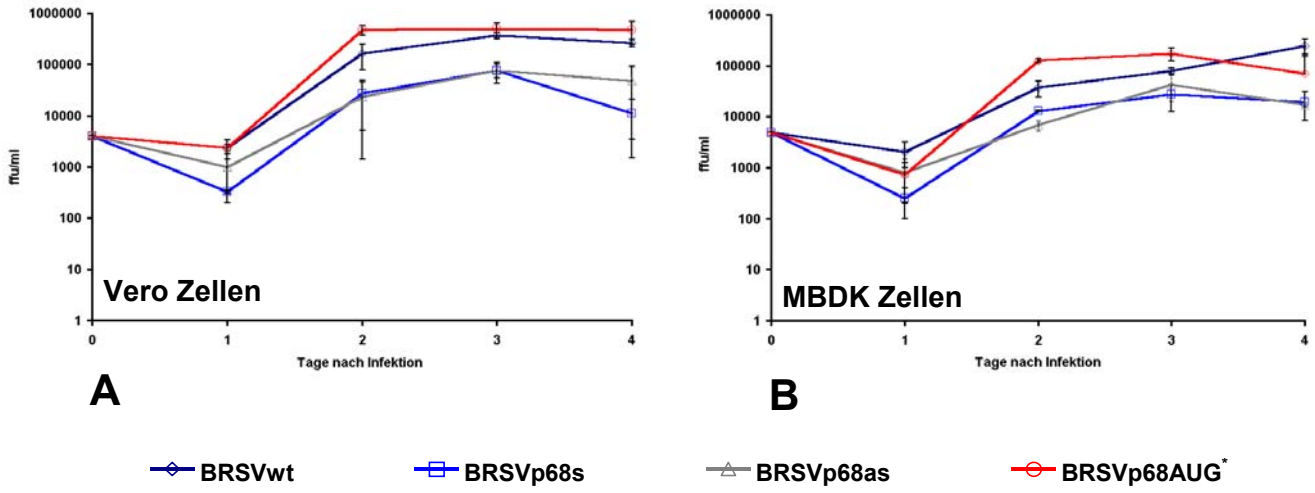


Abb. 49 Wachstum modifizierter BRS-Viren in unterschiedlichen Zelllinien

Vero und MDBK Zellen wurden jeweils mit Wildtyp und modifizierten BRS-Viren infiziert (MOI = 0,01) und die Virustiter im Abstand von 24 h bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente. Während BRSVp68^{s} und BRSVp68^{as} in Vero (A) und MDBK Zellen (B) gegenüber BRSVwt attenuiert sind, wächst BRSVp68^{AUG*} schneller als BRSVwt. BRSVp68^{AUG*} erreicht bereits nach 2 Tagen seinen maximalen Virustiter, während BRSVwt deutlich später diesen Titer erreicht.

4.3.3.5.3 Wachstum von BRSVΔNS1/2 mit zusätzlicher p68 RNA

Da die Synthese des verkürzten p68 Proteins die Replikation des BRSV in der Anfangsphase zu unterstützen scheint, wurde in einem weiteren Schritt das Viruswachstums der BRSVΔNS1/2 mit zusätzlichen p68 Genen untersucht. Hierdurch sollte der Einfluss der NS-Proteine auf die beobachtete agonistische Wirkung des verkürzten p68 auf die Virusreplikation untersucht werden. Bei Infektion von Vero Zellen zeigte sich, dass BRSVΔNS1/2, BRSVΔNS1/2p68^{s}, BRSVΔNS1/2p68^{as} und BRSVΔNS1/2p68^{AUG*} vergleichbar replizierten und somit die Expression der zusätzlichen p68 RNAs keinen Vorteil für das Viruswachstum bei Abwesenheit der NS-Proteine hatte (Abb. 50). Bei der weiteren Charakterisierung der Wachstumseigenschaften der BRSVΔNS1/2 Viren mit zusätzlichem p68 Gen wurde, wie bereits durch die Befunde der Immunfluoreszenz angedeutet (Abb. 48), Wachstum dieser Viren in der Interferon-produzierenden Zelllinie MDBK beobachtet. Die Bestimmung der Virustiter zeigte überraschenderweise, dass diese modifizierten Deletionsviren in MDBK und Vero Zellen vergleichbar replizierten, dagegen BRSVΔNS1/2 sich in MDBK Zellen nicht vermehrt. Allerdings wachsen auch die modifizierten Deletionsviren in jeder Zelllinie mit verminderten Virustitern im Vergleich zu BRSVwt. Da die Expression der komplementären p68 RNA nicht zur signifikanten

Reduktion der zellulären p68 Konzentration führt, ist nicht davon auszugehen, dass unterschiedlich hohe p68 Konzentrationen für das deutlich verbesserte Wachstum dieser Viren verantwortlich ist.

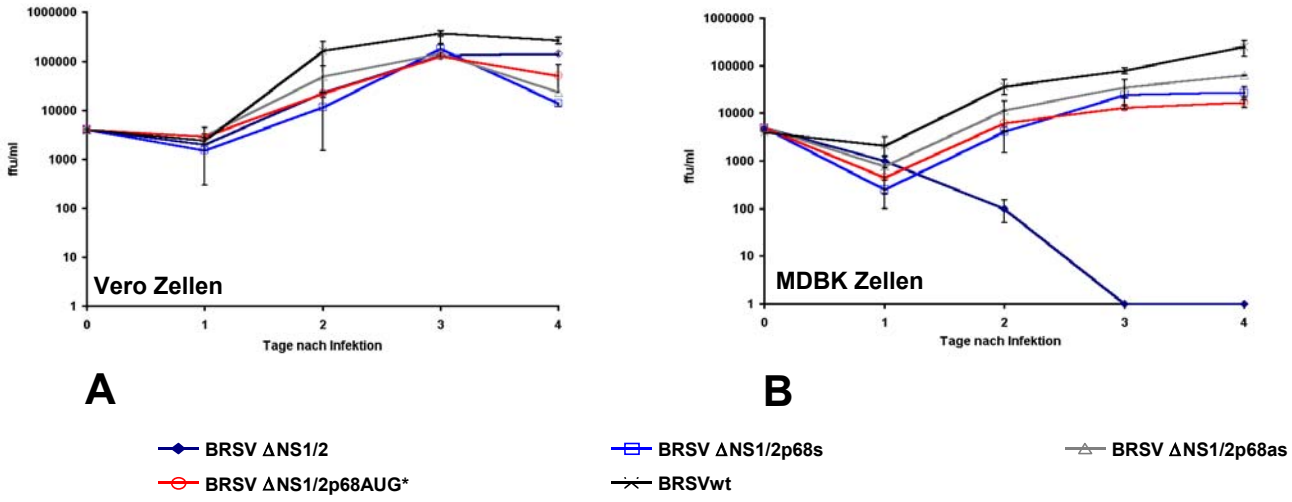


Abb. 50 Wachstum von BRSVΔNS1/2 mit zusätzlichen p68 RNAs in verschiedenen Zelllinien

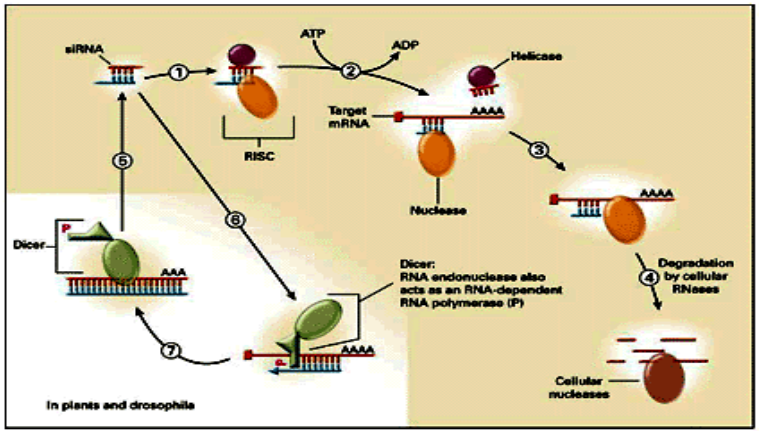
Vero und MDBK Zellen wurden jeweils mit Wildtyp und modifizierten BRS NS-Deletionsviren infiziert (MOI=0,01) und die Virustiter im Abstand von 24 h bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren drei unabhängige Experimente. (A) Im Vergleich zu BRSVwt sind alle modifizierten BRSVΔNS1/2 Viren attenuiert in Vero Zellen und wachsen vergleichbar mit BRSVΔNS1/2. (B) In MDBK Zellen kann BRSVΔNS1/2 im Gegensatz zu den modifizierten BRSVΔNS1/2 nicht wachsen. BRSVΔNS1/2p68^{s}, BRSVΔNS1/2p68^{as} und BRSVΔNS1/2p68^{AUG*} wachsen im Vergleich zu BRSVΔNS1/2 mit 1000-fach erhöhten Virustitern

4.3.4 Reduktion zellulärer Proteinkonzentration durch RNA Interferenz (RNAi)

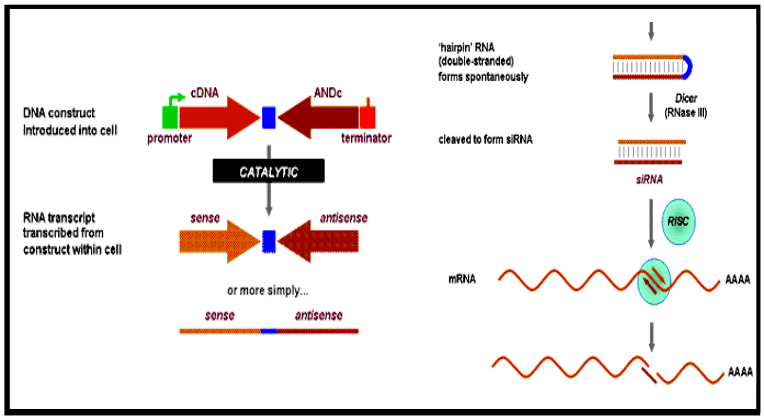
Durch Expression von komplementärer p68 RNA wurde keine signifikante Reduktion der p68 Proteinsynthese erreicht. Deshalb wurde als Alternative in dieser Arbeit die kürzlich etablierte RNA Interferenz (RNAi) Technik zur Reduktion zellulärer Proteinkonzentrationen verwendet. Diesen Mechanismus macht man sich mittlerweile zu Nutze, um als Alternative zu „knock out“ Zellen, „knock down“ Zellen mit signifikant reduzierten Proteinkonzentrationen herzustellen (45). Die Technik basiert auf dem Phänomen des sogenannten „Post Transcriptional Gene Silencing“ (PTGS), mit dem eukaryotische Zellen bereits synthetisierte mRNA spezifisch degradieren und somit ihre Proteinsynthese alternativ regulieren, d.h. zelluläre Proteinkonzentrationen reduzieren. Von einem zellulären RNase Enzymkomplex (Dicer) wird aus längeren doppelsträngigen RNAs die Synthese von „small

interfering“ RNAs (siRNAs) mit komplementären mRNA Sequenzen induziert. Anschließend wird die entsprechende mRNA durch Basenpaarung erkannt und vom sogenannten „RNA induced silencing complex“ (RISC) degradiert.

Zunächst wurden hier doppelsträngige siRNA Moleküle synthetisiert und Zellen mit diesen RNAs transfiziert. Mittlerweile wurden verbesserte Systeme entwickelt, mit denen siRNA Moleküle konstitutiv von cDNA exprimiert werden können (20). In der vorliegenden Arbeit wurden RNA Moleküle von cDNA in HeLa Zellen exprimiert, die nach Ausbildung einer Haarnadelstruktur durch den Dicer zum funktionellen siRNA Molekül geschnitten wurden und p68 mRNA degradierten.



A



B

Abb. 51 Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi)

(A) In eukaryotischen Zellen dient der RNAi Mechanismus zur spezifischen Degradation von mRNA und somit zur Regulation der Proteinkonzentration in Zellen. Durch Transfektion von doppelsträngigen RNA Molekülen wird dieser Mechanismus ausgenutzt, um mRNA zu degradieren. (B) Die konstitutive Expression der siRNA von cDNA wird mittlerweile bevorzugt. Hierbei werden RNA Moleküle von cDNA exprimiert, die Haarnadelstrukturen ausbilden und durch den Dicer zum funktionellen siRNA Molekül geschnitten werden.

4.3.5 Reduktion von p68 in HeLa Zellen durch siRNA (pSUPER)

Durch Expression einer spezifischen p68 siRNA vom Vektor pSUPER wurde bereits eine RNA Sequenz identifiziert, die die Degradation der p68 mRNA in HeLa Zellen vermittelt (66). Da durch die beschriebene „Antisense“ Technik (4.3) keine signifikante Reduktion der p68 Konzentration erreicht wurde, stellte die Expression dieser siRNA eine geeignete Alternative dar, um die Funktion des zellulären Proteins für die BRSV Replikation genauer zu charakterisieren.

Durch Transfektion von HeLa Zellen mit pSUPER-p68 wurde eine Reduktion der zellulären p68 Konzentration um ca. 90 % erreicht. Hohe p68 Konzentrationen sind offensichtlich in Zellkultur nicht essentiell, da pSUPER-p68 transfizierte HeLa Zellen mehrmals passagiert wurden, lebensfähig waren und sehr geringe Mengen p68 produzierten.

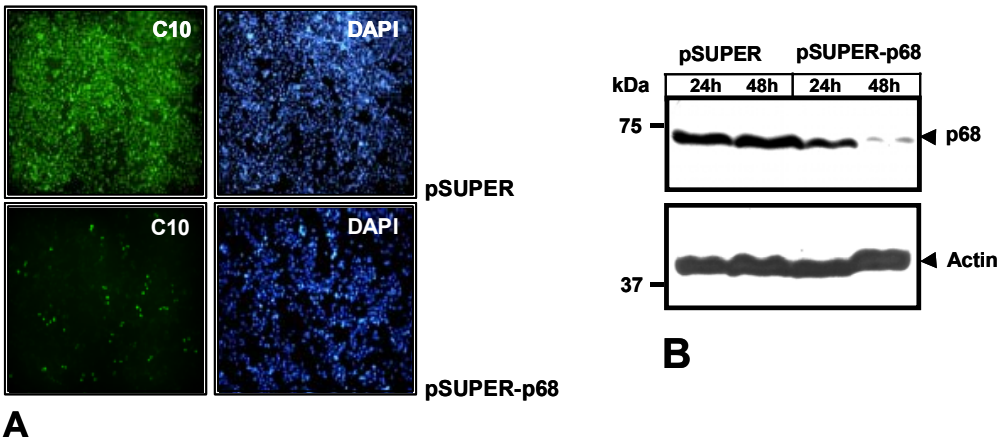


Abb. 52 p68 siRNA Expression in HeLa Zellen

HeLa Zellen wurden mit jeweils 30 µg pSUPER und pSUPER-p68 durch Elektroporation transfiziert. (A) Die p68 Proteinkonzentration in HeLa Zellen ist nach Expression von pSUPER-p68 deutlich reduziert im Gegensatz zu HeLa Zellen, die mit dem Kontrollvektor (pSUPER) transfiziert wurden. Die DAPI Färbung zeigt die Zellkerne transfizierter Zellen. p68 wurde mit C10 Antikörpern detektiert (C10, Verdünnung 1:1000; sekundäre FITC gekoppelte Antikörper, Verdünnung 1:100). (B) 48 h nach Transfektion wird die p68 Proteinkonzentration deutlich reduziert, wie durch Western Blot Analyse gezeigt (C10, Verdünnung 1:1000; Aktin Antikörper, Verdünnung 1:5000).

4.3.6 Einfluss der p68 Proteinkonzentration auf das Viruswachstum

Wie bereits gezeigt, repliziert BRSVp68^{AUG*} durch die erhöhte Proteinkonzentration des verkürzten p68 schneller als BRSVwt. Daher wurde angenommen, dass dieses Protein BRS-Virusreplikation unterstützt. Durch Reduktion der zellulären p68 Konzentration sollte BRSV demnach in pSUPER-p68 transfizierten HeLa Zellen

attenuiert sein. Um auszuschließen, dass durch die verminderte Synthese von p68 die Zellen in ihrer Fähigkeit Viruswachstum unspezifisch zu unterstützen beeinflusst werden, wurden die Zellen zur Kontrolle mit dem nicht verwandten Tollwutvirus (SAD L16) infiziert. Hierbei replizierte das Tollwutvirus sowohl in pSUPER als auch in pSUPER-p68 transfizierten HeLa Zellen vergleichbar (Abb. 53A). Das BRSVwt Wachstum wurde dagegen durch verminderte p68 Konzentrationen beeinflusst, da BRSVwt in pSUPER-p68 transfizierten HeLa Zellen deutlich attenuiert war (Abb. 53B). Damit wurde erstmals der Einfluss eines zellulären Proteins auf die BRSV Replikation durch Interaktion mit den NS1 und NS2 Proteinen demonstriert.

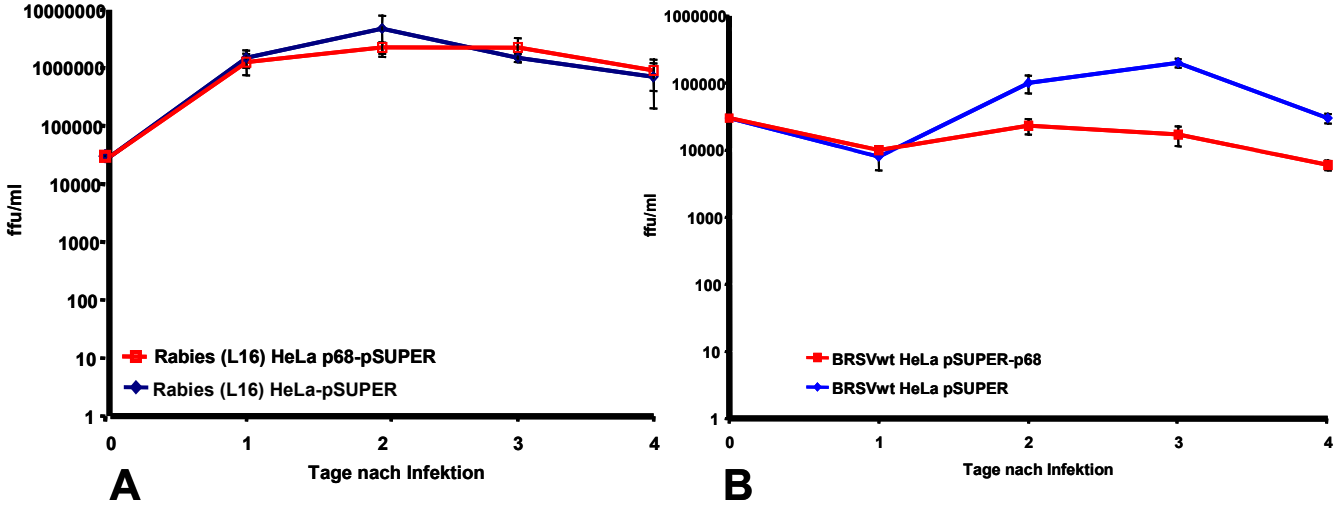


Abb. 53 Wachstum von Rabies Virus (SAD L16) und BRSVwt in HeLa- und HeLa Zellen mit reduzierter p68 Konzentration

HeLa-pSUPER und HeLa-pSUPER-p68 Zellen wurden jeweils mit Wildtyp Rabies Virus (SAD L16) und BRSV infiziert (MOI = 0,1) und die Virustiter im Abstand von 24 h bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren zwei unabhängige Experimente. (A) Rabies Virus (SAD L16) wächst auf den jeweiligen Zellen vergleichbar. (B) BRSVwt ist dagegen deutlich attenuiert in HeLa Zellen mit reduzierter zellulärer p68 Konzentration.

5. Diskussion

Das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) kodiert im Gegensatz zu allen übrigen Vertretern der Virusfamilie *Paramyxoviridae* die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2. Bis vor kurzem waren diese Proteine lediglich in Ansätzen charakterisiert und über definierte Funktionen war wenig bekannt. Obwohl RSV ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen repliziert, sind die NS-Proteine sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Da diese Proteine keine Sequenzhomologien zu zellulären oder anderen viralen Proteinen besitzen, konnte über definierte Funktionen bzw. zelluläre Interaktionspartner auch nichts vorausgesagt werden. Erst kürzlich konnte den NS-Proteinen durch Arbeiten unseres Labors eine erste definierte Funktion zugeordnet werden, und zwar bei der Vermittlung der Resistenz gegen die Typ I Interferone α und β (134). Die Interferonresistenz wird durch einen kooperativen Mechanismus beider Proteine vermittelt (1.7.2). Weiterhin verhindern ebenfalls beide NS-Proteine zusammen die Induktion von Interferon in infizierten Wirtszellen (18). Da BRSVΔNS1/2 Deletionsmutanten auch in Zellen mit deletierten Genen für Interferon α und β im Vergleich zum Wildtyp attenuiert sind, wurden weitere Funktionen der NS-Proteine postuliert. Einerseits wurde eine direkte Beteiligung des NS1 Proteins bei der viralen Replikation bzw. RNA Synthese gezeigt, andererseits wurden weitere Funktionen der NS-Proteine vermutet, die durch Interaktion mit Proteinen der Wirtszelle die optimale Replikation dieser Viren gewährleisten (5, 29). In dieser Arbeit wurden die NS-Proteine daher im Hinblick auf Interaktionen untereinander sowie auf Interaktionen mit Proteinen der Wirtszelle näher charakterisiert, und Testsysteme zur genaueren Analyse der Interaktion etabliert.

5.1 Protein-Protein Interaktion der NS-Proteine

Bei vorherigen Arbeiten mit den Pneumovirus NS-Proteinen wurde bereits der kooperative Mechanismus in bezug auf Vermittlung der Interferonresistenz erkannt. Da beide Proteine hierbei für diese Aktivität vorhanden sein müssen, wurde zunächst spekuliert, dass NS1 und NS2 miteinander interagieren oder gemeinsame Zielproteine in infizierten Zellen haben. Wie bereits in anderen Arbeiten für HRSV NS-Proteine mit nicht denaturierten PAA-Gelen gezeigt, bilden sowohl NS1

als auch NS2 Homo-Multimere in infizierten Zellen (48). Mit dem in dieser Arbeit verwendeten Y2H System wurden diese Interaktionen für BRSV NS-Proteine bestätigt. BRSV NS-Proteine bilden somit zumindest dimere Komplexe in Hefe. Darüber hinaus wurde neben der Homomer Bildung ebenfalls eine spezifische Interaktion zwischen NS1 und NS2 Proteinen des HRSV bzw. BRSV identifiziert. Dabei interagierte zudem jedes NS-Protein auch mit dem entsprechenden NS-Protein der anderen RSV Spezies. Dies zeigt, dass die Sequenzunterschiede zwischen den NS-Proteinen beider RSV Spezies die Interaktion mit heterologen NS-Proteinen nicht beeinflussen. Durch Deletionen weniger Nukleotide im BRSV NS1 Gen, die über das ganze Gen verteilt waren, wurde gezeigt, dass die hieraus resultierenden Veränderungen des NS1 Proteins großen Einfluss auf die Bildung von NS1 Homomeren in Kombination mit BRSV NS1wt haben (4.1.3.3). Keines der mutierten NS1 Proteine interagierte hierbei mit dem authentischen BRSV NS1. Allerdings interagierte BRSV NS1 mit C-terminalen Deletionen im Bereich der Aminosäuren 93-100 und 102-110 (bNS1Δ93-100 und bNS1Δ102-110) uneingeschränkt mit BRSV NS2wt in Hefe. Aufgrund dieser Daten kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei nicht um lineare Bindungsstellen bei den Interaktionen zwischen den NS-Proteinen handelt, sondern dass durch diese Deletionen Proteinstrukturen zerstört werden, die für die Interaktion entscheidend sind. Weiterhin wurde untersucht, ob die PVM NS-Proteine ähnliche Interaktionen untereinander oder mit heterologen NS-Proteine eingehen können. Nach Synthese der PVM NS-GAL4 Fusionsproteine wurden jedoch keine vergleichbaren Interaktionen festgestellt, was evtl. an der hohen Stringenz der Testbedingungen liegen könnte.

Interessanterweise wurde in unserem Labor gezeigt, dass chimäre Viren, die HRSV und BRSV NS-Proteine kodieren, interferonresistent sind (17). Chimäre Viren, die eines der PVM NS-Proteine in Kombination mit einem NS-Protein anderer RSV Spezies kodieren, verlieren dagegen ihre Resistenz gegen Typ I Interferone, obwohl beide PVM NS-Proteine bei homologer Kombination ebenfalls Resistenz vermitteln können (B. Bossert, pers. Mitteilung). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Bildung von NS1/2 Heteromeren eine essentielle Voraussetzung für die Interferonresistenz dieser Viren ist. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, können die HRSV und BRSV NS-Proteine in allen möglichen Kombinationen miteinander interagieren, so dass ein multimerer Proteinkomplex bestehend aus NS1 und NS2

Untereinheiten in infizierten Zellen vorstellbar ist. Dies würde bedeuten, dass die NS1 und NS2 Gene der RSV Spezies quasi für zwei unterschiedliche Untereinheiten des gleichen Proteins kodieren. Dieses multimere Protein könnte durch Deletion eines Gens bzw. einer funktionellen Domäne seine Aktivität verlieren, worauf Daten zur Interferonresistenz bereits hindeuten.

Allerdings ist auch nicht auszuschließen, dass die Proteine (oder Untereinheiten) zusätzliche separate Funktionen im Replikationszyklus dieser Viren erfüllen. Wie bereits durch vorherige Arbeiten gezeigt, wird NS1 als starker- und NS2 höchstens als schwacher Repressor der Transkription und Replikation des HRSV diskutiert.

Weitere Analysen unseres Labors zeigten durch Expression von NF-κB spezifischen Reportergenen die Aktivierung von NF-κB durch NS1. Bei diesem Testsystem hatten Deletionen im Bereich der Aminosäuren 93-100 und 102-110 (bNS1Δ93-100 und bNS1Δ102-110) interessanterweise keinen Einfluss auf NF-κB Aktivierung (B. Bossert, pers. Mitteilung). Dies unterstützt weiterhin die Hypothese, dass Deletionen im N-terminalen Bereich gravierende strukturelle Veränderungen des Proteins bewirken und somit auch die Aktivierung von NF-κB und die Interaktion mit NS2 verhindern.

5.2 Interaktion der NS-Proteine mit Proteinen der Wirtszelle

Durch Transformation von Hefezellen, die BRSV NS1 in Fusion mit der GAL4 Bindungsdomäne synthetisierten, mit cDNAs einer Expressionsbibliothek aus Lungengewebe wurden zunächst potentielle zelluläre Bindungspartner für NS1 identifiziert (Tab. 3). Einige der identifizierten Proteine wie Thymosin beta 4, CathepsinC, PM5, Glutathion-S-transferase und Citrat Lyase, konnten durch Kontrollexperimente in Hefe als reale Interaktionspartner für NS1 ausgeschlossen werden, da es sich hier z.T. um bekannte falsch positive Interaktionspartner handelt. Neben den falsch positiven Interaktionspartnern, wurden weitere cDNAs aus der Expressionsbibliothek isoliert, die für bisher nicht charakterisierte Proteine kodieren. Hierbei war nicht auszuschließen, dass es sich ebenfalls um Bindungen an artifizielle Moleküle handelte, da nicht klar ist, ob zu diesen Sequenzen überhaupt authentische Proteine in der Zelle existieren.

Neben diesen cDNAs wurden weitere cDNA Klone mehrfach isoliert, die Proteine oder Proteinfragmente kodierten, die zumindest in Ansätzen charakterisiert waren.

Hierbei handelte es sich um die Proteine CDK4BP (CDK4 bindendes Protein), β-COPI (β-Coatomer Protein I), RanBP16 (Ran bindendes Protein 16), MM-1 (c-Myc Modulator 1) und die nukleäre DEAD Box Helikase p68. Nach Transformation von Hefezellen, die das Protein LaminC (LamC) synthetisieren, wurde in Kombination mit diesen Proteinen keine Interaktion in Hefe festgestellt. Weitere Kontrollen mit dem Rabies Matrixprotein (RV M) und dem RSV Matrixprotein (RSV M) zeigten ebenfalls keine Bindung an die identifizierten zellulären Proteine im Y2H. Die NS-Proteine interagieren ebenfalls nicht mit LamC. Damit wurde gezeigt, das die Interaktionen auf Synthese von BRSV NS1 zurückgehen und eine unspezifische Interaktion der Proteine CDK4BP, β-COPI, RanBP16, MM-1 und p68 mit NS1 weitgehend ausgeschlossen werden kann.

5.2.1 Interaktion der NS-Proteine mit CDK4BP

Bei der zweiten Transformation der Hefezellen mit der cDNA Expressionsbibliothek wurde eine cDNA isoliert, die für ein vollständiges CDK4 bindendes Protein (CDK4BP) kodierte. Nach Transformation der Hefezellen, die BRSV NS2 synthetisierten, wurde ebenfalls eine Interaktion von NS2 mit diesem identifizierten Protein festgestellt. Darüber hinaus wurden Interaktionen mit den NS-Proteinen von HRSV und PVM nachgewiesen (Abb. 14). Insbesondere die Interaktion mit den PVM NS-Proteinen war überraschend, da diese keine signifikante Sequenzhomologie zu anderen RSV NS-Proteinen aufweisen. Mutationsanalysen mit BRSV NS1 machten dagegen deutlich, dass bereits Deletionen weniger Aminosäuren zum Verlust der Bindung in Hefe führen (Abb. 15), weshalb man davon ausgehen kann, dass das identifizierte Protein nicht an lineare Sequenzbereiche der NS-Proteine bindet. Bei dieser Interaktion ist offensichtlich die Struktur der Proteine eher entscheidend. Durch Deletionen innerhalb des NS1 kommt es vermutlich zur Zerstörung der Struktur mit der Folge, dass CDK4BP nicht mehr binden kann. Ko-Immunpräzipitationen des rekombinanten CDK4BP aus Lysaten transfizierter Zellen gaben Hinweise auf eine Interaktion mit beiden NS-Proteinen alleine oder in Kombination (Abb. 16). Verschiedene Fusionskonstrukte (c-myc, EGFP) des CDK4BP waren in eukaryotischen Zellen im Nukleus lokalisiert. Die Lokalisation änderte sich nach BRSV Infektion nicht, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die spezifische Wechselwirkung zwischen den NS-Proteinen und CDK4BP im

Nukleus infizierter Zellen stattfinden sollte (Abb. 17). Mit der Isolierung der CDK4BP cDNA wurde ein Kernprotein als Bindungspartner identifiziert, das die Arbeitshypothese der spezifischen Lokalisation und Funktion der NS-Proteine im Zellkern unterstützt.

Dem CDK4BP wurden bereits verschiedene Eigenschaften zugewiesen, die auf eine Funktion des Proteins bei der Kontrolle des Zellzyklus hinweisen. CDK4BP wurde mit Hilfe des Y2H Systems mit unterschiedlichen *bait*-Proteinen in verschieden Laboren zeitgleich identifiziert. CDK4BP ist an der Regulation des Zellzyklus auf mehreren Ebenen beteiligt. Ursprünglich wurde zunächst durch Bindung an $p16^{INK4A}$ eine dem CDK4BP entsprechende cDNA (*SEI-1*, „selected with INK4A“) aus Hefetransformanten isoliert. Für $p34^{SEI-1}$ wurde auch eine Bindung an die Cyklin abhängige Kinase 4 (CDK4) aber nicht an CDK6 nachgewiesen, weshalb hier von einem spezifischen Komplex aus mindestens drei Proteinen ($p16^{INK4A}$, CDK4, CDK4BP) ausgegangen wird (144). Der Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus wird in eukaryotischen Zellen durch CDK4 und CDK6 in Verbindung mit Cyklin D reguliert (141). In der G_0 Phase liegt der Transkriptionsfaktor E2F-1 durch Bindung an RB inaktiv vor. Die anschließende Phosphorylierung durch verschiedene CDKs führt zur Freisetzung des E2F-1, das in Verbindung mit DP1 spezifische Gene in der späten G_1 und S-Phase exprimiert. Für diesen kritischen Schritt der Regulation und Eintritt in die S-Phase werden CDKs zusätzlich durch weitere Proteine reguliert. Zu den CDK Inhibitoren (cki) zählen Proteine der KIP/CIP und der INK4 Familie. Im Unterschied zu Proteinen der KIP/CIP Familie, die ein breites Spektrum an CDKs inhibieren können, werden CDK4 und CDK6 spezifisch durch INK4 Proteine inhibiert (93, 105, 139). Es wird davon ausgegangen, dass CDK/CyklinD Komplexe stringent durch mehrere Faktoren reguliert werden. CDK4BP stimuliert spezifisch die CDK4/CyklinD Aktivität in Anwesenheit des CDK4 Inhibitors $p16^{INK4A}$. Somit wirkt CDK4BP als Antagonist von $p16^{INK4A}$ und begünstigt den Übergang von der G_1 in die S-Phase, da es zudem die Proliferation von Fibroblasten bei geringen Serumkonzentrationen deutlich erhöht (144).

Arbeiten einer anderen Arbeitsgruppen zeigten, dass CDK4BP offensichtlich weitere Funktionen besitzt. Bonventre et al. identifizierten dieses Protein als Transkriptionsfaktor für E2F-1 regulierte Gene, wobei es spezifisch mit dem E2F-1 Bindungspartner DP1 interagiert und die Genexpression ko-aktiviert (79). Das Protein wurde in diesem Zusammenhang als TRIP-Br1 (Transcriptional Regulator that

Interacts with PHD-Bromodomains) bezeichnet. CDK4BP ($p34^{SEI-1}$, TRIP-Br1) wurde in vielen Organismen nachgewiesen. Die m-RNA wird im Vergleich zu übrigen Geweben besonders hoch in Lungenzellen exprimiert (79, 144), in denen RSV repliziert.

Der Interaktionspartner DP1 wurde zunächst aufgrund von Sequenzvergleichen des CDK4BPs mit E2F-1 vermutet. Weitere potentielle saure Transaktivierungsdomänen im CDK4BP ließen auf eine Funktion bei der Transkription zellulärer Gene schließen. Tatsächlich bindet dieses Protein bedingt durch die E2F-1 Sequenzhomologien DP1 und transaktiviert zelluläre Reportergene in transfizierten Zellen. Neben DP1 interagiert TRIP-Br1 mit dem zellulären Koaktivator CBP/p300 und den Korepressoren TIF1α und TIF1β.

Die Ko-aktivierung der E2F1-/DP1 vermittelten Transkription von Reportergenen durch CDK4BP wird durch RB inhibiert. Überexpression von RB cDNA in Zellen führt daher zur Repression der E2F-1/DP1 Aktivität. Bereits für andere virale Proteine, wie dem E1A Onkogen des Adenovirus wurde gezeigt, dass diese E2F-1 Repression durch Bindung von E1A an RB und p300 aufgehoben wird (148). Tatsächlich wurde die CDK4BP abhängige Ko-Aktivierung der E2F-1 vermittelten Transkription in Anwesenheit von RB durch Expression der E1A cDNA wieder vollständig hergestellt (79). Es ist daher denkbar, dass die Pneumovirus NS-Proteine ähnliche Effekte durch Aktivierung des CK4BPs bei dieser Regulation hervorrufen können.

5.2.2 Interaktion der NS-Proteine mit β-COPI

Da Pneumovirus NS-Proteine nicht nur im Nukleus, sondern auch im Zytoplasma infizierter Zellen lokalisiert sind (Abb. 6), wurden ebenfalls Interaktionen mit zellulären Proteinen im Zytoplasma infizierter Zellen angenommen. Mittels Y2H wurde eine cDNA isoliert, die ein C-terminales Fragment des zytoplasmatischen β-COPI kodiert. Dieses Proteinfragment interagiert nicht mit BRSV NS2 in Hefe, weshalb ausschließlich eine spezifische Interaktion mit BRSV NS1 angenommen wurde (Abb. 18). Das rekombinante, vollständige Protein interagiert jedoch mit BRSV NS2. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden NS-Proteine mit unterschiedlichen Domänen des gleichen zellulären Proteins interagieren. Während NS1 den β-COPI C-Terminus bindet, scheint der N-Terminus für die Interaktion mit NS2 wichtiger zu sein. Weiterhin interagieren auch die NS-Proteine anderer Pneumoviren mit β-COPI

(Abb. 19). Mutationsanalysen zeigten einen Verlust der Bindung an BRSV NS1, sofern wenige Aminosäuren des BRSV NS1 deletiert wurden. Lediglich bei Deletionen von Aminosäuren im C-terminalen Bereich (BRSV NS1Δ93-100) wurde die Bindung an β-COPI nicht beeinträchtigt (Abb. 20). Ko-Immunpräzipitationen rekombinanter Proteine aus Lysaten transfizierter BSR Zellen demonstrierten die Interaktion mit beiden BRSV NS-Proteinen (Abb. 21). Neben bereits durch andere Arbeiten beschriebenen Interaktionen der NS-Proteine mit Proteinen des RSV RNP-Komplexes (48, 74), interagieren die NS-Proteine offensichtlich auch mit einem zellulären, zytoplasmatischen Protein der Wirtszelle.

Endozytotischer oder exozytotischer vesikulärer Transport innerhalb eukaryotischer Zellen wird durch 50-150 nm große Vesikel vermittelt, die die jeweiligen Proteine umhüllen (107). Hierbei werden Vesikel unterschieden, die entweder Derivate des Endoplasmatischen Retikulums (ER), des Golgi Apparates oder der Plasmamembran sind (94). Rezeptoren der Plasmamembran werden durch sogenannte Clathrin umhüllte Vesikel in Verbindung mit AP-2 internalisiert (129). Transportprozesse zwischen ER und Golgi werden dagegen durch eine andere Klasse von Vesikeln vermittelt, den Coatomer (COPI und COPII) umhüllten Vesikeln (9, 119, 157). COPI Komplexe bestehen aus den sieben Untereinheiten α, β, β´, γ, δ, ε, ζ COPI. Dabei erfolgt die Bindung der COPI Untereinheiten an Golgi und ER Membranen durch die GTPase ARF (ADP-Ribosylation Factor) (42, 121, 138). COPII Vesikel binden spezifisch reguliert durch eine weitere GTPase (Sar21) ER Membranen und ermöglichen vesikulären Transport zum Golgi (9).

COPI Untereinheiten vermitteln allerdings nicht ausschließlich vesikulären Transport zwischen ER und Golgi. Einige COPI Untereinheiten werden seit kurzem mit endosomalem Transport in Verbindung gebracht. Hierbei werden Rezeptoren nach Bindung eines Liganden internalisiert und der Rezeptor erneut in die Zellmembran inseriert, während der Ligand im endosomalen/lysosomalen System degradiert wird. Vor allem β-COPI wird mit diesem Prozess in Verbindung gebracht, da Antikörper gegen β-COPI Endozytose verhindern (160). Weitere Beobachtungen sprechen für eine direkte Beteiligung von COPI Untereinheiten beim endosomalen Transport, da CHO Zellen mit mutiertem ε-COPI Rezeptoren nicht wieder an die Plasmamembran rekrutieren (67, 77).

In dieser Arbeit wurde die β-COPI Untereinheit als spezifischer Interaktor für beide RSV NS-Proteine identifiziert. COPI Vesikel transportieren durch spezifische

Interaktion mit dem Aminosäuremotiv KKXX Proteine in das ER (100). Da nicht alle NS-Proteine verschiedener Pneumoviren dieses Motiv besitzen und zudem nicht im Bereich des ER lokalisiert sind, sollte der eigentliche Transportprozess für die Virusreplikation keine Rolle spielen. Ob in RSV infizierten Zellen der vesikuläre Transport oder die Zusammensetzung der Vesikel verändert ist, ist bisher nicht bekannt.

Für ein anderes virales Protein, das HIV-Nef, wurde bereits eine direkte Interaktion mit β-COPI demonstriert (85, 124). HIV-Nef ist aktiv an der Endozytose des CD4 Moleküls in infizierten Zellen beteiligt (53, 68). Hierbei wird angenommen, dass HIV-Nef mit der N-terminalen Domäne ein Di-Leucin innerhalb des CD4 bindet (1, 65). Weiterhin interagiert Nef über ein weiteres Di-Leucin Motiv innerhalb des C-Terminus mit AP2 (19, 38, 62). HIV-Nef vermittelt als Adapterprotein in einem zweitem Schritt die vermehrte Bildung von Clathrin umhüllten Vesikeln durch die direkte Interaktion mit β-COPI und somit die Endozytose des CD4. Interessanterweise enthalten NS-Proteine aller hier betrachteten Pneumoviren die charakteristischen Di-Leucin Motive. HRSV und BRSV NS1 Proteine enthalten drei-, PVM NS1 dagegen zwei Di-Leucin Motive. Sequenzvergleiche der drei NS1 Proteine verschiedener Pneumoviren zeigten dieses konservierte Motiv im C-Terminus der Proteine (AS 132-133, Abb. 3). Das charakteristische Motiv ist zudem jeweils einmal in NS2 Proteinen aller Pneumoviren enthalten. Aufgrund der spezifischen Interaktion der NS-Proteine mit β-COPI könnte man auf eine Beteiligung beider Proteine bei der Regulation der Endozytose von Oberflächenproteinen in RSV infizierten Zellen schließen. Weiterhin ist es durchaus möglich, dass RSV genau wie HIV seinen eigenen, bisher unbekannten Rezeptor internalisiert und dieser durch das endosomale/lysosomale System degradiert wird.

Studien zur Replikation von Vertretern der *Picornaviridae* zeigten eine deutliche Abhängigkeit der Replikation von der Bildung von COPI Vesikeln. Das Poliovirus (PV) bildet vesikuläre Strukturen (Replikationskomplexe) in infizierten Zellen, in denen virale Nichtstrukturproteine und RNA vorliegen (13, 14). Weiterhin haben COPI Vesikel auch eine Bedeutung für die Replikation von Parechovirus 1 (ParV1) und vor allem für das Echovirus 11 (EV11), da die Replikation dieser Viren durch Inhibition der COPI Vesikelbildung stark eingeschränkt ist (54).

Aufgrund dieser Daten könnten COPI Vesikel nicht nur in Verbindung mit NS1/NS2 endozytotische Prozesse, sondern eventuell auch direkt die Replikation der

RS-Viren beeinflussen. Im Gegensatz zu Picornaviren ist die Replikation von Negativ-Strang RNA Viren allerdings nicht membranabhängig.

5.2.3 Interaktion der NS-Proteine mit RanBP16

Mittels Y2H wurde in dieser Arbeit eine cDNA isoliert, die das erst kürzlich identifizierte und bisher nicht näher charakterisierte Kernprotein RanBP16 kodiert. Für das klonierte RanBP16 voller Länge wurde auch hier eine spezifische Interaktion mit beiden BRSV NS-Proteinen nachgewiesen (Abb. 24). In Hefe interagierte RanBP16 mit Pneumovirus Proteinen aller Spezies, allerdings interagierte keine einzige BRSV NS1 Deletionsmutante mit RanBP16*. Rekombinante BRSV NS-Proteine aus Lysaten transfizierter BSR Zellen ko-immunpräzipitierten mit RanBP16 (Abb. 25) und Immunfluoreszenz Experimente deuteten eine Ko-Lokalisation im Zellkern BRSV infizierter Zellen mit rekombinantem RanBP16 an (Abb. 26).

Die GTPase Ran reguliert als zentrales Molekül den Import und Export von Proteinen zwischen Zytoplasma und Nukleus. Proteine der Importin β Familie sind Ran-bindende nukleäre Transportrezeptoren und vermitteln den Import von Proteinen in den Nukleus (58, 109). Importin β verwandte Transportrezeptoren werden in Importine und Exportine eingeteilt, je nach Richtung des Transports. Die GTPase Ran reguliert bei diesen Transportprozessen die „Cargo“-bindung an den Ran/Importin Komplex. Bei Import eines spezifischen Proteins in den Zellkern bindet dieses an Importin β. Im Zellkern bindet Importin Ran-GTP und setzt das importierte Protein frei (59, 127). Der Ran-GTP/Importin β -Komplex wird wieder in das Zytoplasma transferiert. Dort wird GTP zu GDP hydrolysiert, wodurch die Freisetzung des Importin β erfolgt und erneute Beladung mit einem weiteren Protein und Transport in den Nukleus stattfinden kann. Im Gegensatz zu Importinen, die unabhängig von der GTP Bindung ihre Substrate in den Kern transportieren, ist für Exportine, wie beispielsweise CRM1, die Bindung an die Ran-GTP Form Voraussetzung für die Bindung und den Export ihrer spezifischen Substrate aus dem Nukleus. Bisher wurden in höheren Eukaryoten 15 Importin β Proteine mit hohen Affinitäten für unterschiedliche Substrate identifiziert. RanBP16 und RanBP17 wurden kürzlich identifiziert, wobei deren spezifische Substrate bisher unbekannt sind (96). Diese beiden Proteine erfüllen die biochemischen Eigenschaften der

Importin β Proteine, sind allerdings im Vergleich mit anderen Transportrezeptoren schwach konserviert. Aufgrund der relativ geringen Affinität zu Ran-GTP wird spekuliert, dass es sich um Proteine handeln könnte, die sowohl Import als auch Export vermitteln (96).

Immunfluoreszenzen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der BRSV Infektion zeigten, dass die NS-Proteine nach Infektion immer auch im Kern lokalisiert sind. Aufgrund unterschiedlicher Intensitäten der Fluoreszenz im Zellkern wird allerdings angenommen, dass die NS-Proteine zwischen Zytoplasma und Zellkern pendeln. In der frühen Phase der Infektion scheinen die NS-Proteine vorwiegend im Zellkern lokalisiert zu sein, in späteren Phasen dagegen hauptsächlich im Zytoplasma infizierter Zellen. Da genauere Analysen zur Lokalisation der NS-Proteine auf einen aktiven Transport in den Zellkern und spezifische Lokalisation der Proteine in diesem Kompartiment hinweisen (Abb. 27), wird von einem Ran-abhängigen Kernimport ausgegangen. Da für RanBP16 angenommen wird, dass es Kernimport und Export vermittelt, könnte dieses Protein für das Verhalten der NS-Proteine während verschiedener Zeitpunkte der Infektion verantwortlich sein.

Interessanterweise gibt es Hinweise auf eine Ran vermittelte Interaktion *in vitro* zwischen RanBP16 und der DEAD Box Helikase p68 (U. Kutay, pers. Mitteilung). Diese Daten unterstreichen die Relevanz der identifizierten Interaktionen zwischen den viralen NS- und den zellulären Proteinen, wobei eine Ran-regulierte Komplexbildung zwischen den Virus- und Wirtszell-Proteinen nicht auszuschließen ist.

Aufgrund der Interaktion mit RanBP16 wurde vermutet, dass die NS-Proteine aktiv in den Nukleus infizierter Zellen transportiert werden. Da bisher durch Sequenzvergleiche mit anderen Proteinen keine Homologien zu bekannten Signalssequenzen für den nukleären Import identifiziert wurden, gab es bislang keinen Hinweis auf aktiven Transport der NS-Proteine in den Zellkern. Zum Nachweis eines aktiven Imports der NS-Proteine wurde ein artifizielles Fusionskonstrukt kloniert, das EGFP in Fusion mit NS1 und BRSV N kodierte. Nach Transfektion von BSR Zellen mit diesem Konstrukt, wurde ein Protein mit einer Molekülgröße von ca. 75 kDa synthetisiert. Dieses sollte aufgrund der Molekülgröße nicht in den Kern diffundieren, da in der Regel nur Proteine mit einer Molekülgröße von bis zu 50 kDa die nukleäre Membran unspezifisch passieren können (106). Weiterhin wurde durch die Fusion mit BRSV N ein zytoplasmatisch lokalisiertes

Protein mit NS1 fusioniert, sodass dieser Fusionsanteil das gesamte Protein im Zytoplasma zurückhalten sollte, sofern der nukleären Lokalisation des NS1 lediglich Diffusion zugrunde liegt. Nach Synthese des artifiziellen EGFP-NS1-N Proteins in BSR Zellen wurde das Fusionsprotein tatsächlich im Nukleus und im Zytoplasma nachgewiesen (Abb. 27). Somit wird NS1 aktiv in den Nukleus transportiert.

Um den Einfluss der nukleären Lokalisation der NS-Proteine auf die Virusreplikation zu untersuchen, wurden in unserem Labor bereits Viren generiert, die das NS1 Protein in Fusion mit verschiedenen nukleären, CRM1/Exportin1-abhängigen Exportsignalen kodieren (PKI, AS 37-46: LALKLAGLDI; HIV-Rev, AS 75-84: LPPLERLTLD; nicht gezeigt). Kernproteine mit diesen Exportsignalen werden in der Regel unterschiedlich stringent und durch verschiedene Exportmechanismen in das Zytoplasma exportiert (46, 73). Im Gegensatz zu Kontrollproteinen wurde für entsprechenden BRSV NS1 Fusionsproteine kein Export aus dem Nukleus beobachtet (nicht gezeigt). Offensichtlich lässt sich NS1 durch Fusion der funktionellen, nukleären Exportsequenzen nicht in das Zytoplasma exportieren. Dies könnte einerseits auf einen stringent kontrollierten Import/(Export?) hindeuten, der nicht durch Fusion der CRM1-abhängigen Sequenzen kompetiert werden kann. Andererseits könnten auch starke spezifische Protein-Protein Interaktionen die NS1 Fusionsproteine im Zellkern zurückhalten, so dass CRM-1 vermittelter Export von NS1 in diesem Fall unwirksam ist. Diese Daten gaben zusätzliche Hinweise auf eine spezifische nukleäre Lokalisation der RSV NS-Proteine, obwohl dieses Virus ausschließlich im Zytoplasma repliziert.

5.2.4 Interaktion der RSV NS-Proteine mit MM-1

Ein weiteres zelluläres Protein, das ebenfalls mit beiden Pneumovirus NS-Proteinen interagiert, ist der c-Myc Modulator1 (MM-1), das als Regulator für das Protoonkogen c-Myc beschrieben wurde. MM-1 reprimiert die Expression c-Myc regulierter Gene und wurde als ausschließlich nukleäres Protein beschrieben (115). MM-1 interagiert ebenfalls mit dem Tumorsupressor p73, einem Protein der p53 Familie (155). p73 transaktiviert zelluläre Promotoren mit p53 Bindungsmotiven und wird als pro-apoptotisches Protein diskutiert, das unter anderem Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (112). p73 vermittelte Transkription wird hierbei durch MM-1

stimuliert. Diese Daten bestätigten die Funktion des MM-1 als Repressor und Regulator des Zellzyklus.

Neben der Interaktion des MM-1 mit den NS-Proteinen von HRSV, BRSV und PVM in Hefe (Abb. 30) wurde durch Mutationsanalyse eine spezifische Interaktion mit BRSV NS1 nachgewiesen (Abb. 29). Mit Ausnahme der Deletionsmutante bNS1Δ63-71 interagierte keine weitere N-terminale NS1 Deletionsmutante mit MM-1. C-terminale Deletionen wirken sich im Fall des MM-1 offensichtlich weniger gravierend auf die Interaktion mit BRSV NS1 aus, als bei den vorhergehend beschriebenen Interaktion mit CDK4 und RanBP16. Darüber hinaus wurde die direkte Interaktion zwischen den BRSV NS-Proteinen und MM-1 durch GST *pull down in vitro* nachgewiesen (Abb. 32). Durch Ko-Immunpräzipitationen von NS1/NS2 mit rekombinantem MM-1 aus Lysaten transfizierter BSR Zellen wurde die Interaktion mit beiden BRSV NS-Proteinen bestätigt (Abb. 31).

Um den Einfluss der BRSV Infektion auf die Lokalisation des MM-1 zu untersuchen, wurden zunächst ein mit dem c-myc Epitop fusioniertes MM-1 sowie ein EGFP-MM-1 Fusionsprotein rekombinant in BSR Zellen synthetisiert und die Zellen anschließend mit BRSV infiziert. Zunächst wurde hierbei eine deutliche Ko-Lokalisation der NS-Proteine und des MM-1 im Nukleus infizierter Zellen beobachtet. Allerdings zeigte MM-1 in einigen Zellen eine veränderte Lokalisation, da in diesen Zellen das Protein ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert war (Abb. 33). Durch Gewinnung eines MM-1 spezifischen Peptidserums wurde endogenes MM-1 in verschiedenen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 34). Immunfluoreszenz Experimente zeigten ebenfalls eine unterschiedliche Verteilung des Proteins in BSR Zellen. Da sich das zelluläre Protein im Hinblick auf seine Lokalisation gleich verhält wie rekombinantes EGFP-MM-1, beeinflusste die Fusion mit EGFP das Verhalten dieses Proteins offensichtlich nicht. Daher wird vermutet, das MM-1 zwischen diesen beiden Kompartimenten pendelt. MM-1 ist daher nicht, wie ursprünglich angenommen, ausschließlich im Zellkern lokalisiert. Um die Veränderung der Lokalisation des MM-1 Proteins genauer analysieren zu können, wurde eine Zelllinie kloniert, die EGFP-MM-1 stabil exprimiert und die unterschiedliche Lokalisation des fluoreszierenden Proteins mittels Videomikroskopie verfolgt. Hiermit wurde gezeigt, dass MM-1 aus dem Zytoplasma innerhalb von ca.10 h in den Nukleus importiert wird (Abb. 35), wobei die Regulation dieses Transports ungeklärt ist. Dieser Befund lässt auf unterschiedliche Funktionen des Proteins in beiden Kompartimenten schließen.

Andererseits ist auch eine Regulation des Proteins durch Translokation in das Zytoplasma denkbar. In welchem zellulären Kompartiment die Interaktion mit den NS-Proteinen stattfindet ist noch unklar, da die NS-Proteine ebenfalls in beiden Kompartimenten lokalisiert sind. Da MM-1 jedoch c-Myc und p73 reguliert und somit aktiv den Zellzyklus beeinflusst, ist eine funktionelle Interaktion mit Pneumovirus NS-Proteinen im Zellkern eher wahrscheinlich.

c-Myc gehört zu den zentralen nukleären Proteinen, die den Zellzyklus regulieren. Die Aktivität dieses Proteins wird durch zahlreiche zelluläre Proteine positiv oder negativ reguliert (4, 40). c-Myc transaktiviert als Heterodimer in Verbindung mit dem Bindungspartner Max die Genexpression an zellulären Promotoren, die sogenannte E-Box Motive enthalten (15, 16) und vermittelt so den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus. Durch weitere Bindungspartner wie Proteine der Mad Familie, die an Max binden wird c-Myc Transaktivierung an zellulären Promotoren inhibiert (6, 82). Durch die Bindung von Mad an Max werden Repressorkomplexe rekrutiert, die die Proteine N-Cor, Sin3 und Hisitondeacetylasen (HDAC) enthalten (2, 7, 72). Histondeacetylierung ist der Hauptmechanismus der c-Myc Inhibition. MM-1 rekrutiert genau wie Mad ebenfalls diesen Repressorkomplex, allerdings durch direkte Bindung an c-Myc (131). Wie bereits für das CDK4BP gezeigt, bindet dieses TIF1β und reguliert E2F-1 vermittelte Transkription. Interessanterweise bindet MM-1 ebenfalls TIF1β (131). Während CDK4BP den G_1-S Phasen Übergang positiv beeinflusst, bewirkt MM-1 genau das Gegenteil. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulation aufgrund der Bindung des TIF1β an CDK4BP bzw. MM-1 hin.

Mit der Identifizierung des CDK4BP und des MM-1 als spezifische Bindungspartner für NS-Proteine wurden somit Proteine identifiziert, die den Zellzyklus sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können. Daher wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Wachstum bzw. Teilung der Wirtszellen auf die BRSV Replikation untersucht. Hierzu wurden Vero Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen mit BRSVwt und BRSVΔNS1/2 infiziert und die daraus resultierenden Virustiter verglichen. Im Gegensatz zu BRSVwt ist BRSVΔNS1/2 unter standardisierten Kulturbedingungen bei Zusatz von 2,5 % FKS attenuiert und wächst deutlich langsamer und erreicht geringere Virustiter (Abb. 36B). In gehungerten, arretierten Vero Zellen ohne Zusatz von FKS, replizierten Wildtyp- und NS Deletionsviren dagegen identisch (Abb. 36A). Dies weist darauf hin, dass Wachstum und Teilung der Wirtszellen nicht essentiell für die Replikation des BRSV ist. Für eine optimale Replikation der BRS-Viren *in vitro* ist

Teilung bzw. Wachstum der Zellen jedoch Voraussetzung. Die Synthese der NS-Proteine ist demnach nur in sich teilenden Zellen vorteilhaft für BRSV.

Aufgrund dieser Hinweise kann man spekulieren, dass die NS-Proteine die MM-1 Repression von c-Myc behindern oder ausschalten- und auf der anderen Seite die CDK4BP Aktivität ko-stimulieren könnten. Tatsächlich gaben bereits erste Daten aus unserem Labor Hinweise, dass beide NS-Proteine gemeinsam die Teilung infizierter Zellen stimulieren können (J. Schlender, nicht veröffentlicht).

5.2.5 Interaktion der RSV NS-Proteine mit der DEAD Box Helikase p68

Als weiterer spezifischer Interaktionspartner für die Pneumovirus NS-Proteine wurde das p68 Protein identifiziert (Tab. 3). Aus der cDNA Expressionsbibliothek wurde hierbei ein C-terminales Fragment der nukleären DEAD Box Helikase p68 cDNA isoliert. Dieses Fragment ist ausreichend für die Bindung an beide BRSV NS-Proteine. Durch Transformation weiterer Hefestämme, die NS-Proteine der Pneumoviren HRSV, BRSV und PVM synthetisierten, wurde ebenfalls eine Interaktion des gesamten Proteins mit den NS-Proteinen verschiedener Pneumoviren gezeigt (Abb. 39). Durch Interaktionsanalysen mit partiell deletiertem BRSV NS1 wurde weiterhin die Spezifität der Bindung an p68 in Hefe gezeigt. Hier zeigte p68 im Gegensatz zu CDK4BP oder RanBP16 eine Interaktion mit den BRSV NS1 Mutanten NS1Δ43-51, NS1Δ93-100 und NS1Δ102-110 (Abb. 38). Durch rekombinante Expression der p68 cDNA wurde sowohl BRSV NS1 als auch NS2 aus Lysaten transfizierter BSR Zellen mit monoklonalen αp68 Antikörpern ko-immunpräzipitiert (Abb. 40). Diese Ergebnisse ließen sich für rekombinante HRSV NS-Proteine reproduzieren (nicht gezeigt). Die viralen Proteine interagieren offensichtlich direkt mit p68, da ^{35}S markiertes p68 in *pull down* Experimenten mit gereinigten GST-BRSV NS-Proteinen ko-präzipitiert wurde. Hierbei interagierte sowohl der verkürzte Y2H Klon als auch der Gesamtklon mit den NS-Proteinen. p68 ko-lokalisiert im Zellkern infizierter Zellen mit NS1 und NS2 und ändert nicht seine Lokalisation durch BRSV Infektion (Abb. 41). Hieraus lässt sich schließen, dass die Interaktion im Nukleus stattfindet und die NS-Proteine durch Interaktion mit p68 zelluläre Prozesse im Kern beeinflussen.

BRSV mit zusätzlichem p68 Gen zeigten nach Überexpression der RNA neben dem vollständigen p68 Protein mehrere verkürzte p68 Formen in infizierten Zellen

(Abb. 46C). Die zusätzlichen p68 Formen wurden auch bei den NS-Deletionsviren beobachtet (Abb. 46D), weshalb man davon ausgehen kann, dass das Auftreten dieser p68 Formen bei RSV Infektion auftreten, aber nicht abhängig von der NS Expression sind. Zwar ist nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um interne Initiation der Translation handelt, allerdings wurden diese verkürzten Proteine bei rekombinanter Expression von cDNA nicht nachgewiesen. Nach BRSV Infektion wurde zusätzlich durch Western Blot eine p68 Form nachgewiesen, die bei ca. 150 kDa im Polyacrylamidgel migrierte. Da eine Poly-ubiquitinylierung in Tumorzellen für dieses Protein bereits beobachtet wurde (26), ist es denkbar, dass es sich bei dieser zusätzlichen Proteinbande um poly-ubiquitinyliertes p68 handelt.

DEAD Box Proteine werden von vielen Organismen von Bakterien bis zu höheren Eukaryoten kodiert. Diese Proteine beeinflussen verschiedene zelluläre Prozesse wie RNA Splicing, nukleären Export, Ribosomenreifung und Translation (41, 136, 154). DEAD Box Proteine besitzen Sequenzmotive, die die Bindung an RNA vermitteln. Für p68 und andere DEAD Box Proteine wurde eine NTP-abhängige RNA Helikaseaktivität nachgewiesen (76, 132). Es wird allerdings davon ausgegangen, dass sich DEAD Box Proteine generell durch diese Eigenschaft auszeichnen. Weitere Funktionen bei der Regulation der Transkription werden zudem für p68 diskutiert (47, 156). Neuere Daten deuten darauf hin, dass p68 Spliceosomen bindet und alternatives Splicing des Ras Onkogens reguliert (66, 117). Dem p68 homologe Proteine wurden in verschiedenen Organismen (Hefe und Maus) identifiziert, wobei diese homologen Proteine hoch konserviert sind (83, 92). Da die p68 Expression durch Serum stimuliert werden kann, wird zusätzlich eine Funktion bei Wachstum und Teilung der Zellen angenommen (143). Aufgrund der zahlreichen Funktionen, die für das p68 Protein beschrieben wurden ist davon auszugehen, dass es sich um eine multifunktionelles Protein handelt, das an der Regulation mehrerer zellulärer Prozesse beteiligt ist.

Interessanterweise werden DEAD Box Proteine auch von verschiedenen Viren kodiert. Beispiele hierfür sind die NPH-II RNA Helikase des Vaccinia Virus (63, 102), das NS3 des Hepatitis C Virus (HCV) (44, 71, 153) und das „Large T Antigen“ des Simian Virus (SV40). Ursprünglich wurde zelluläres p68 durch Kreuzreaktion mit dem Antikörper gegen das SV40 „Large T Antigen“ identifiziert (98).

Neben der Expression von DEAD Box Proteinen durch verschiedene Viren, sind Interaktionen von Virusproteinen mit zellulären DEAD Box Helikasen bereits

beschrieben worden. Das E1E4 Protein des Humanen Papillomvirus (HPV 16) bindet das zelluläre E4-DEAD Box Protein (E4-DBP) und inhibiert dessen Helikaseaktivität (43). Für das „core“ Protein des HCV wurde zeitgleich in mehreren Laboren eine Interaktion mit dem DEAD Box Protein DBX identifiziert (108, 120, 161). Hierbei wird angenommen, dass das „core“ Protein durch diese Interaktion die Translation zellulärer mRNAs inhibiert (108). Eine spezifische Interaktion eines anderen viralen Proteins mit der DEAD Box Helikase p68, wurde für UL26.5 des humanen Zytomegalovirus (HCMV) gezeigt (K. Lorz, pers. Mitteilung).

In dieser Arbeit wurde eine Interaktion der NS-Proteine mit der DEAD Box Helikase p68 identifiziert. Allerdings interagieren in diesem Fall zwei virale Proteine bzw. zwei Domänen eines Proteinkomplexes mit dem gleichen DEAD Box Protein. Diese Art der Interaktion ist jedoch nicht einzigartig, da für die Virusproteine EBNA2 und EBNA3C des Epstein-Barr Virus (EBV) ebenfalls eine gemeinsame Interaktion mit der zellulären DEAD Box RNA Helikase DP103 beschrieben wurde (64). Hierbei wird angenommen, dass die Virusproteine durch die Interaktion mit DP103 zelluläre Genexpression beeinflussen. Weiterhin ist für EBNA2 und EBNA3C bekannt, dass zelluläre Promotoren durch Interaktion des Transkriptionsfaktors RBP-Jκ mit beiden viralen Proteinen transaktiviert werden. Offensichtlich werden daher auch bei Viren anderer Ordnungen zelluläre Prozesse durch gemeinsame Interaktion viraler Proteine mit Wirtszellproteinen beeinflusst.

5.3 Einfluss zellulärer Proteine auf die BRSV Replikation

Zur näheren Charakterisierung der identifizierten Protein-Protein Interaktionen wurde in dieser Arbeit ein Expressionssystem auf Basis des BRSV etabliert. Dieses System ermöglicht eine Überexpression zellulärer Proteine in infizierten Zellen.

BRS-Viren, die die EGFP RNA überexprimierten (BRSV-EGFP) demonstrierten, dass die Überexpression von RNAs stromaufwärts der NS Gene prinzipiell möglich ist und keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der BRS-Viren *in vitro* hat (Abb. 43). Hierbei wurde erstmals gezeigt, dass sich neben HRSV und anderen Negativ Strang RNA Viren auch BRSV als Expressionsvektor sehr gut eignet, da hierbei hohe Konzentrationen an fremder RNA nach Infektion synthetisiert werden.

Die Expression von EGFP-MM-1 führte allerdings zu keiner signifikanten Änderung des BRSV Wachstums. Auch ein Einfluss auf das Wachstum der Zellen

war hierbei nicht zu beobachten. Dieses experimentelle System erlaubt daher keine Aussage, ob MM-1 prinzipiell die RSV Replikation einschränkt oder unterstützt. Zwar wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass EGFP-MM1 genau wie das zelluläre Protein zwischen Zytoplasma und Zellkern pendeln kann, ein direkter Nachweis, ob dieses Fusionsprotein in jeder Hinsicht funktionell ist, fehlt jedoch. Die BRSV vermittelte Expression komplementärer MM-1 RNA führte auch nicht zur gewünschten Reduktion der Proteinkonzentration in infizierten Zellen und daher nicht zu signifikant verändertem BRSV Wachstum. Es ist bekannt, dass die Expression von komplementärer RNA (*antisense* RNA) nicht in jedem Fall zu einer effektiven Inhibition der Translation führt. Dies könnte mit Bindungen von regulatorischen Proteinen an die RNA zusammenhängen, die die Bildung von doppelsträngiger RNA verhindern können. Weiterhin könnte die Ausbildung von mRNA Sekundärstrukturen die Hybridisierung an den kritischen Bereichen verhindern.

Zur Veränderung der p68 Konzentration in infizierten Zellen wurden BRS-Viren generiert, die p68 Sequenzen in *sense* und *antisense* Orientierung exprimieren. Durch Expression der p68 mRNA (BRSVp68^{s}) wurde eine deutlich erhöhte p68 Konzentration in infizierten Zellen erreicht, allerdings verursachte die Überexpression eine veränderte Morphologie der Zellkerne in infizierten Zellen. Zudem zeigte das Protein eine Änderung seiner Lokalisation (Abb. 47). BRSVp68^{s} replizierte langsamer und mit geringeren Titern im Vergleich zu BRSVwt. Hierbei sind als Erklärung zytotoxische Effekte vorstellbar, weshalb versucht wurde, eine moderatere Expression durch interne Initiation der Translation zu erreichen. Infektionen mit BRS-Viren, die die p68 RNA mit mutiertem Startkodon exprimierten (BRSVp68^{AUG*}), führten zu erhöhten zellulären Konzentrationen der verkürzten p68 Form, die sich charakteristisch wie das zelluläre Protein im gesamten Zellkern verteilte. BRSVp68^{AUG*} zeigte deutlich verändertes Wachstum in Vero und MDBK Zellen. Während BRSVwt 3-4 Tage bis zum Erreichen maximaler Virustiter benötigt, wurde für dieses modifizierte Virus nach zwei Tagen der maximale Titer bestimmt. Die Expression der verkürzten p68 Form, die nach wie vor die intakte Domäne zur Interaktion mit NS-Proteinen enthält, fördert die Replikation des BRSV.

Durch Expression der komplementären p68 RNA wurde keine signifikante Reduktion der zellulären p68 Konzentration erreicht, allerdings war dieses Virus im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls in Vero und MDBK Zellen attenuiert. Durch

Expression dieser artifiziellen RNA in Wirtszellen sind ebenfalls zytotoxische Effekte denkbar, die die Virusreplikation beeinflussen könnten.

Einen deutlicheren Effekt der p68 Konzentration auf das BRSV Wachstum wurde durch alternative siRNA Experimente erzielt. Durch Reduktion der p68 Konzentration in p68 „knock down" Zellen wurde die BRSVwt Replikation im Gegensatz zu nicht verwandten Tollwut Viren (SAD L16) deutlich vermindert. Hierbei wurden für BRSVwt in HeLa Zellen mit reduzierten p68 Konzentrationen bis zu 10-fach geringere Virustiter bestimmt. Dies stimmt mit der zuvor charakterisierten Funktion des p68 für die BRSV Replikation überein. Überexpression der verkürzten p68 Form begünstigt die Virusreplikation und verminderte Konzentrationen des zellulären p68 führen zu einem attenuierten BRSV Phänotyp. Weitere Experimente bzw. Infektionen mit den modifizierten BRS-Viren von p68 „knock down" HeLa Zellen, könnten weitere Hinweise auf die p68 Funktion geben. Die Komplementierung der p68 Expression durch BRSVp68^{AUG*} könnte die Attenuierung in HeLa knock down Zellen aufheben.

In dieser Arbeit wurde weiterhin gezeigt, dass das veränderte Wachstum des BRSVp68^{AUG*} abhängig von der Expression der NS-Proteine ist. NS defiziente BRS-Viren mit zusätzlichen p68^{s}, p68^{AUG*} und p68^{as} RNAs replizierten in Vero Zellen vergleichbar mit BRSVΔNS1/2. Hierbei verursachte die Expression der verkürzten p68 Form keine veränderte Replikation der NS-Deletionsviren. Da Vero Zellen aufgrund deletierter Typ I Interferon Gene selbst keinen antiviralen Status induzieren können, ist die Funktion des p68 im Zusammenhang mit der NS Expression unabhängig von der Funktion der NS-Proteine als Interferonantagonisten zu betrachten.

Um zu testen, ob veränderte p68 Konzentrationen in infizierten Zellen die Interferonresistenz beeinflussen, wurden Infektionsexperimente mit den modifizierten p68 BRS-Viren mit verschiedenen Konzentrationen IFN α durchgeführt (nicht gezeigt). Die erhöhte Expression der p68 RNA führte allerdings nicht zu veränderter Typ I Interferonresistenz. HeLa Zellen mit reduzierter p68 Konzentration, durch Expression spezifischer siRNA, wurden zudem mit BRSVΔNS1/2 infiziert. Hierbei replizierten die NS-Deletionsviren nicht in dieser IFN kompetenten „knock down" Zelllinie, sodass man nicht davon ausgehen kann, dass p68 für IFN spezifische Signaltransduktions-Kaskaden essentiell ist, sondern hier andere zellbiologische Aspekte des Zellzyklus im Vordergrund stehen.

Die identifizierten Interaktionen der NS-Proteine betreffen vorwiegend Proteine, die im Zusammenhang mit der Regulation des Zellzyklus oder des Zellwachstums stehen. Da in dieser Arbeit die Abhängigkeit des Virus von Zellteilung bzw. Wachstum für die optimale Replikation demonstriert wurde, kann man hier auf weitere Funktionen schließen. NS1 und NS2 könnten demnach gemeinsam durch Interaktion mit diesen Proteinen den Zellzyklus aktiv beeinflussen und den Übergang von der G_1 in die S Phase stimulieren. Hierzu müsste CDK4BP aktiviert und MM-1 inhibiert werden. Tatsächlich deuten erste Daten aus FACS Analysen aus unserem Labor darauf hin, dass beide NS-Proteine gemeinsam die Proliferation der Wirtszellen begünstigen (J. Schlender, nicht veröffentlicht). Mit dem Y2H System wurden somit Hinweise auf diese neue Funktion erhalten und unterstützen Daten, die eine erhöhte Proliferation der Zellen durch Expression der NS-Proteine demonstrierten.

5.4 Bedeutung der Protein-Interaktionen für den BRSV Replikationszyklus

In dieser Arbeit wurden durch die sensitive Y2H Methode erstmals interagierende zelluläre Proteine identifiziert, die mit den HRSV, BRSV und PVM NS1/NS2 Proteinen interagieren. Durch die Identifizierung verschiedener Kernproteine als Interaktionspartner wurde die biologische Relevanz der nukleären Lokalisation der NS-Proteine unterstrichen. Die zellulären Interaktionspartner gaben somit Hinweise auf weitere Funktionen der NS-Proteine und zusammenfassend scheint klar zu sein, dass RSV durch Synthese der NS-Proteine aktiv den Zellzyklus beeinflussen kann. Darauf deuten auch experimentelle Daten aus unserem Labor hin (J. Schlender, nicht publiziert). Zudem scheint das Wachstum der Wirtszellen, wie in dieser Arbeit gezeigt, eine Voraussetzung für optimale BRSV Replikation zu sein. Interessant im Hinblick auf die zellulären Interaktionspartner ist in diesem Zusammenhang, dass es sich bei den Kernproteinen ausschließlich um Adapterproteine handelt, die wie oben beschrieben, c-Myc/p73 oder CDK4 regulieren. p68 wird ebenfalls als Ko-Aktivator diskutiert, der Transkription stimulieren kann aber offensichtlich nicht essentiell für diese zellulären Prozesse ist. Andere Viren mit onkogenem Potential aus unterschiedlichen Ordnungen binden dagegen zentrale regulatorische Proteine des Zellzyklus direkt oder verändern die Expression entsprechender Gene. Beispiele

hierfür sind Bindung und Inaktivierung des Tumorsupressors p53 durch das SV40 „Large T Antigen“, das E1B Protein des Adenovirus und das E6 Protein des humanen Papillomvirus (114). Das Epstein-Barr Virus induziert durch EBNA2 die Expression des c-myc Gens (89) und stimuliert dadurch massiv die Proliferation der Wirtszellen. Durch diese Mechanismen kann es zur Transformation der Zellen kommen. RSV besitzt dagegen kein onkogenes Potential, ist allerdings, wie gezeigt, auf Teilung der Zellen zur optimalen Replikation angewiesen. Es könnte daher möglich sein, dass durch Bindung und/oder Regulation dieser Adapterproteine keine derart drastischen Veränderungen der Zellzyklusregulation eintreten wie es bei onkogenen Viren der Fall ist, sondern dass hier eine feinere Manipulation der Proliferation infizierter Wirtszellen ermöglicht wird. Zudem ist auch von Interesse, dass die infizierten Wirtszellen des Lungenepithels bereits ausdifferenziert sind und sich in der Regel nicht mehr teilen. Untersuchungen von RSV infizierten Lungengewebe könnten Aufschluss darüber geben, ob und wie RSV die Proliferation der Wirtszellen beeinflusst.

Die identifizierten Interaktionen scheinen keine offensichtliche Rolle bei der Typ I Interferonresistenz zu spielen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass diese Proteine an IFN Signaltransduktions-Kaskaden beteiligt sind. Da RSV die IFN Signaltransduktions-Kaskade nicht inhibiert (162), könnte die Resistenz auch über Mechanismen vermittelt werden, die im Zusammenhang mit der Kernlokalisation der NS-Proteine stehen. Bekannte Proteine der IFN Signaltransduktions-Kaskade wurden nicht als NS Interaktionspartner erwartet.

Für einige Viren wurde gezeigt, dass virale Proteine durch Bindung doppelsträngiger RNA das antivirale Protein PKR inhibieren können, da dieses Protein doppelsträngige RNA zur enzymatischen Aktivierung benötigt (57). Virusproteine mit RNA bindenden Eigenschaften wurden bereits identifiziert. Hierzu zählen das E3L Protein des Vaccinia Virus (28), das NS1 Protein des Influenza Virus (104) und das NSP3 des Porcinen Rotavirus (99). Bisher liegen keine Hinweise auf eine RNA bindende Eigenschaft der NS-Proteine vor. Sollte es sich bei den RSV NS-Proteinen trotzdem um RNA bindende Proteine handeln, die durch diese Eigenschaft Interferonresistenz vermitteln, kann das Y2H System keine Hinweise auf molekulare Mechanismen liefern.

5.5 Einfluss der NS1/NS2 Gengrenze auf die BRSV Replikation in MDBK Zellen

Bei der Charakterisierung der Wachstumseigenschaften der BRSV NS-Deletionsviren mit zusätzlichen p68 RNAs wurden zunächst verblüffende Ergebnisse erhalten. Diese Viren können offensichtlich auch in Abwesenheit der NS-Proteine in der Zelllinie MDBK replizieren. Da zuvor gezeigt wurde, dass durch Expression der komplementären p68 RNA keine signifikante Reduktion der zellulären p68 Konzentration erreicht wurde, konnten unterschiedliche Proteinkonzentrationen der DEAD Box Helikase als Ursache für diesen Phänotyp ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu BRSV∆NS1/2 enthalten diese Virusgenome die kurze NS1/NS2 Gengrenze, jedoch keine kodierenden NS Sequenzen. Um zu überprüfen, ob diese kurze RNA Sequenz das Wachstum der Viren beeinflussen kann, wurde ein neues Virus durch Deletion der NS Gene hergestellt, das aber die NS1/NS2 Gengrenze exprimiert (BRSV∆NS1/2-Stop/Start). Vorhergehende Arbeiten demonstrierten eindeutig die Abhängigkeit der Interferonresistenz von der Expression der NS Gene auch bei rekombinanten Tollwut Viren, die NS-Proteine synthetisieren (134). Immunfluoreszenz Experimente mit BRSV∆NS1/2-Stop/Start infizierten MDBK Zellen mit αF Antikörpern und Western Blot Analyse mit αMxA Antikörpern zeigte allerdings, dass trotz aktivierter Interferon-spezifischer Signaltransduktions-Kaskade, Virusreplikation nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Für andere Viren wie dem EBV und Adenovirus wurde bereits gezeigt, dass kurze RNA Sequenzen zur Interferonresistenz beitragen können, indem diese RNA Moleküle PKR inhibieren und dadurch die Interferon-spezifische Signaltransduktions-Kaskade ausschalten (162). Weitere Experimente mit rekombinanten Tollwutviren, die diese BRSV RNA Sequenz exprimieren, könnten hierbei wesentlich zur Klärung der Funktion der NS1/NS2 Gengrenze bei diesem BRSV Phänotyp beitragen.

Zusammenfassung

Pneumoviren wie das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) kodieren im Gegensatz zu allen anderen Vertretern der Familie *Paramyxoviridae* zwei Nichtstrukturproteine, NS1 und NS2. Beide Proteine vermitteln kooperativ Resistenz gegenüber Typ I Interferon und verhindern die Induktion von Interferon in infizierten Zellen

Mit Hilfe des „Yeast Two Hybrid“ Systems wurden Interaktionen der NS-Proteine untereinander in allen Kombinationen demonstriert. Somit können die NS-Proteine als Homo- und Heterodimere (bzw. Oligomere) in infizierten Zellen vorliegen. Obwohl RSV ausschließlich im Zytoplasma infizierter Zellen repliziert, sind die NS-Proteine sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert. Die nukleäre Lokalisation ist auf einen aktiven Transport und nicht auf Diffusion in den Nukleus zurückzuführen, wie mit Hilfe eines EGFP-NS1-N Fusionskonstrukts in dieser Arbeit gezeigt wurde. Dieser Befund unterstreicht die funktionelle Bedeutung der Kernlokalisation der NS-Proteine.

Weiterhin wurden aus einer cDNA Expressionsbibliothek aus Lungengewebe erstmals cDNA Klone verschiedener nukleärer Proteine sowie eines zytoplasmatischen Proteins isoliert, die mit den NS1 und NS2 Proteinen des bovinen RSV (BRSV) und den NS-Proteinen anderer Pneumoviren (HRSV, PVM) interagieren. Hierbei handelt es sich um die Kernproteine CDK4BP ($p34^{SEI-1}$; TRIP-Br1), RanBP16, MM-1, die DEAD Box Helikase p68 sowie das zytoplasmatisch lokalisierte β-COPI.

Die Spezifität der Interaktionen wurde in Hefezellen durch differentielle Bindung an NS1 Mutanten demonstriert. Durch Ko-Immunpräzipitationen aus Lysaten eukaryotischer Zellen wurden die Interaktionen bestätigt. GST *pull down* Experimente lieferten eindeutige Hinweise auf eine direkte und spezifische Interaktion der NS-Proteine mit MM-1 und p68.

Rekombinante BRS-Viren, die eine verkürzte Form des p68 exprimieren, replizierten in MDBK und Vero Zellen wesentlich schneller als wildtyp-BRSV. BRSV NS1/NS2-Deletionsmutanten mit zusätzlichen p68 RNAs replizierten dagegen wie BRSVΔNS1/NS2, sodass die Synthese der NS-Proteine Voraussetzung für die verbesserte Replikation durch p68 ist. siRNA Experimente zeigten, dass eine verminderte p68 Konzentration in infizierten Zellen zu einer deutlichen Attenuierung

des BRSV führen. p68 wurde somit als ein zelluläres Zielprotein für virale NS-Proteine identifiziert, das die BRSV Replikation unterstützt.

Wachstum und Teilung der Wirtszellen ist eine Voraussetzung für die optimale BRSV-Replikation *in vitro.* Da die identifizierten Kernproteine direkt mit der Regulation des Zellzyklus bzw. der Genregulation in Verbindung gebracht werden, kann von einer Beeinflussung der Zellteilung bzw. des Zellwachstums durch die NS-Proteine ausgegangen werden. Das „Yeast Two Hybrid“ System lieferte somit Hinweise auf bisher unbekannte Funktionen der RSV NS-Proteine.

Summary

Among the *Paramyxoviridae*, only members of the subfamily *Pneumovirinae* like Respiratory Syncytial Virus (RSV) encode two nonstructural proteins, NS1 and NS2. These two proteins cooperatively mediate type I interferon resistance and prevent induction of interferon in infected cells.

Interactions of NS1 and NS2 proteins in every combination were shown by using the yeast-two-hybrid system. Therfore, NS1 and NS2 are able to form homo- and hetero(oligo)mers in infected cells. Although RSV replicates exclusively in the cytoplasm, NS-Proteins are localized in the cytoplasm as well as in the nucleus. Expression of an enlarged NS1 fusion protein, EGFP-NS1-BRSV N, resulted in the same nuclear and cytosolic localisation indicating that nuclear localisation is not due to diffusion but rather to an active transport. Thus, NS-Proteins should have particular functions in the nucleus of infected cells.

Furthermore, yeast-two-hybrid screening of a lung cDNA expression library using NS1 of bovine RSV (BRSV) as a bait, identified cDNA clones encoding several nuclear proteins and one cytosolic protein. BRSV NS2 protein and NS-Proteins from other pneumoviruses (HRSV, PVM) were also able to interact with the identified cellular proteins in yeast. The isolated cDNAs encode the nuclear proteins CDK4BP ($p34^{SEI-1}$ or TRIP-Br1), RanBP16, MM-1, DEAD Box Helicase p68 and the cytosolic β-COPI. Specific interactions were determined by mutational analysis of BRSV NS1 in yeast. Co-immunoprecipitation from lysates of eukaryotic cells confirmed the interaction of both BRSV NS-Proteins with the cellular proteins. The interaction of MM-1 and p68 with both NS-Proteins was also shown in GST pull down assay *in vitro.*

Engineered BRSV encoding a truncated p68 showed accelerated replication in MDBK and Vero cells, whereas growth of NS1/NS2 deletion mutants expressing the truncated p68 was unaffected. This indicates that the presence of NS-Proteins is a prerequisite for the acceleration of BRSV growth by truncated p68. Furthermore, replication of BRSV was attenuated on HeLa cells in which expression of p68 was knocked down by specific siRNA, whereas replication of the unrelated Rabies virus was not. Thus, p68 is a nuclear target protein for the NS-Proteins and supports BRSV replication *in vitro*.

Growth and division of host cells is necessary for optimal BRSV replication and like p68, most of the identified nuclear protein interactors are related to regulation of the cell cycle and cell division, respectively. Therefore, NS-Proteins appear to influence the cell cycle for optimal replication of BRSV by targeting such proteins. Hence, with the yeast-two-hybrid system, the first cellular interaction partners were identified indicating new functions of NS-Proteins in the viral replication cycle.

Literaturverzeichnis

1. **Aiken, C., J. Konner, N. R. Landau, M. E. Lenburg, and D. Trono**. 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. Cell **76**:853-864.

2. **Alland, L., R. Muhle, H. Hou, Jr., J. Potes, L. Chin, N. Schreiber-Agus, and R. A. DePinho**. 1997. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. Nature **387**:49-55.

3. **Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman**. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. **25**:3389-3402.

4. **Amati, B., K. Alevizopoulos, and J. Vlach**. 1998. Myc and the cell cycle. Front Biosci. **3**:D250-D268.

5. **Atreya, P. L., M. E. Peeples, and P. L. Collins**. 1998. The NS1 protein of human respiratory syncytial virus is a potent inhibitor of minigenome transcription and RNA replication. J Virol **72**:1452-1461.

6. **Ayer, D. E., L. Kretzner, and R. N. Eisenman**. 1993. Mad: a heterodimeric partner for Max that antagonizes Myc transcriptional activity. Cell **72**:211-222.

7. **Ayer, D. E., Q. A. Lawrence, and R. N. Eisenman**. 1995. Mad-Max transcriptional repression is mediated by ternary complex formation with mammalian homologs of yeast repressor Sin3. Cell **80**:767-776.

8. **Barik, S., T. McLean, and L. C. Dupuy**. 1995. Phosphorylation of Ser232 directly regulates the transcriptional activity of the P protein of human respiratory syncytial virus: phosphorylation of Ser237 may play an accessory role. Virology **213**:405-412.

9. **Barlowe, C., L. Orci, T. Yeung, M. Hosobuchi, S. Hamamoto, N. Salama, M. F. Rexach, M. Ravazzola, M. Amherdt, and R. Schekman**. 1994. COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. Cell **77** :895-907.

10. **Barr, J., P. Chambers, C. R. Pringle, and A. J. Easton**. 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.

11. **Bermingham, A. and P. L. Collins**. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **96**:11259-11264.

12. **Berthiaume, L., J. Joncas, and V. Pavilanis**. 1974. Comparative structure, morphogenesis and biological characteristics of the respiratory syncytial (RS) virus and the pneumonia virus of mice (PVM). Arch. Gesamte Virusforsch. **45**:39-51.

13. **Bienz, K., D. Egger, T. Pfister, and M. Troxler**. 1992. Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. J Virol **66**:2740-2747.

14. **Bienz, K., D. Egger, M. Troxler, and L. Pasamontes**. 1990. Structural organization of poliovirus RNA replication is mediated by viral proteins of the P2 genomic region. J Virol **64**:1156-1163.

15. **Blackwell, T. K., L. Kretzner, E. M. Blackwood, R. N. Eisenman, and H. Weintraub**. 1990. Sequence-specific DNA binding by the c-Myc protein. Science **250**:1149-1151.

16. **Blackwood, E. M. and R. N. Eisenman**. 1991. Max: a helix-loop-helix zipper protein that forms a sequence-specific DNA-binding complex with Myc. Science **251**:1211-1217.

17. **Bossert, B. and K. K. Conzelmann**. 2002. Respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural (NS) proteins as host range determinants: a chimeric bovine RSV with NS genes from human RSV is attenuated in interferon-competent bovine cells. J Virol **76**:4287-4293.

18. **Bossert, B., S. Marozin, and K. K. Conzelmann**. 2003. Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Bovine Respiratory Syncytial Virus Block Activation of Interferon Regulatory Factor 3. J Virol **77**:8661-8668.

19. **Bresnahan, P. A., W. Yonemoto, S. Ferrell, D. Williams-Herman, R. Geleziunas, and W. C. Greene**. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef acts as an internalization signal for CD4 downregulation and binds the AP-1 clathrin adaptor. Curr. Biol. **8**:1235-1238.

20. **Brummelkamp, T. R., R. Bernards, and R. Agami**. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. Science **296**:550-553.

21. **Buchholz, U. J., S. Finke, and K. K. Conzelmann**. 1999. Generation of bovine respiratory syncytial virus (BRSV) from cDNA: BRSV NS2 is not essential for virus replication in tissue culture, and the human RSV leader region acts as a functional BRSV genome promoter. J Virol **73**:251-259.

22. **Buchholz, U. J., H. Granzow, K. Schuldt, S. S. Whitehead, B. R. Murphy, and P. L. Collins**. 2000. Chimeric bovine respiratory syncytial virus with glycoprotein gene substitutions from human respiratory syncytial virus (HRSV): effects on host range and evaluation as a live-attenuated HRSV vaccine. J Virol **74**:1187-1199.

23. **Bukreyev, A., S. S. Whitehead, B. R. Murphy, and P. L. Collins**. 1997. Recombinant respiratory syncytial virus from which the entire SH gene has been deleted grows efficiently in cell culture and exhibits site-specific attenuation in the respiratory tract of the mouse. J Virol **71**:8973-8982.

24. **Burke, E., N. M. Mahoney, S. C. Almo, and S. Barik**. 2000. Profilin is required for optimal actin-dependent transcription of respiratory syncytial virus genome RNA. J Virol **74**:669-675.

25. **Calder, L. J., L. Gonzalez-Reyes, B. Garcia-Barreno, S. A. Wharton, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero**. 2000. Electron microscopy of the human respiratory syncytial virus fusion protein and complexes that it forms with monoclonal antibodies. Virology **271**:122-131.

26. **Causevic, M., R. G. Hislop, N. M. Kernohan, F. A. Carey, R. A. Kay, R. J. Steele, and F. V. Fuller-Pace**. 2001. Overexpression and poly-ubiquitylation of the DEAD-box RNA helicase p68 in colorectal tumours. Oncogene **20**:7734-7743.

27. **Chambers, P., C. R. Pringle, and A. J. Easton**. 1991. Genes 1 and 2 of pneumonia virus of mice encode proteins which have little homology with the 1C and 1B proteins of human respiratory syncytial virus. J Gen. Virol **72 (Pt 10)**:2545-2549.

28. **Chang, H. W., J. C. Watson, and B. L. Jacobs**. 1992. The E3L gene of vaccinia virus encodes an inhibitor of the interferon-induced, double-stranded RNA-dependent protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **89**:4825-4829.

29. **Collins P, R. M. Chanock, and B. R. Murphy**. 2001. Respiratory Syncytial Virus, p. 1443-1485. In Knipe D.M. and Howley M.D. (eds.), Fields Virology. Lippincott; Wilkins.

30. **Collins, P. L., M. G. Hill, E. Camargo, H. Grosfeld, R. M. Chanock, and B. R. Murphy**. 1995. Production of infectious human respiratory syncytial virus from cloned cDNA confirms an essential role for the transcription elongation factor from the 5' proximal open reading frame of the M2 mRNA in gene expression and provides a capability for vaccine development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **92**:11563-11567.

31. **Collins, P. L., M. G. Hill, and P. R. Johnson**. 1990. The two open reading frames of the 22K mRNA of human respiratory syncytial virus: sequence comparison of antigenic subgroups A and B and expression in vitro. J Gen. Virol **71 (Pt 12)**:3015-3020.

32. **Collins, P. L. and G. Mottet**. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. J Gen. Virol **72 (Pt 12)**:3095-3101.

33. **Collins, P. L. and G. Mottet**. 1993. Membrane orientation and oligomerization of the small hydrophobic protein of human respiratory syncytial virus. J Gen. Virol **74 (Pt 7)**:1445-1450.

34. **Collins, P. L. and G. W. Wertz** . 1983. cDNA cloning and transcriptional mapping of nine polyadenylylated RNAs encoded by the genome of human respiratory syncytial virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **80**:3208-3212.

35. **Connors, M., P. L. Collins, C. Y. Firestone, and B. R. Murphy**. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. J Virol **65**:1634-1637.

36. **Conzelmann, K. K., J. H. Cox, L. G. Schneider, and H. J. Thiel**. 1990. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. Virology **175**:485-499.

37. **Conzelmann, K. K. and M. Schnell**. 1994. Rescue of synthetic genomic RNA analogs of rabies virus by plasmid-encoded proteins. J Virol **68**:713-719.

38. **Craig, H. M., M. W. Pandori, and J. C. Guatelli**. 1998. Interaction of HIV-1 Nef with the cellular dileucine-based sorting pathway is required for CD4 down-regulation and optimal viral infectivity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **95**:11229-11234.

39. **Crowe, J. E., Jr.** 1999. Host responses to respiratory virus infection and immunization. Curr. Top. Microbiol. Immunol. **236**:191-214.

40. **Dang, C. V.** 1999. c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. Mol. Cell Biol. **19**:1-11.

41. **de la, C. J., D. Kressler, and P. Linder**. 1999. Unwinding RNA in Saccharomyces cerevisiae: DEAD-box proteins and related families. Trends Biochem. Sci. **24**:192-198.

42. **Donaldson, J. G., D. Cassel, R. A. Kahn, and R. D. Klausner**. 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatomer protein beta-COP to Golgi membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **89**:6408-6412.

43. **Doorbar, J., R. C. Elston, S. Napthine, K. Raj, E. Medcalf, D. Jackson, N. Coleman, H. M. Griffin, P. Masterson, S. Stacey, Y. Mengistu, and J. Dunlop**. 2000. The E1E4 protein of human papillomavirus type 16 associates with a putative RNA helicase through sequences in its C terminus. J Virol **74**:10081-10095.

44. **Du, M. X., R. B. Johnson, X. L. Sun, K. A. Staschke, J. Colacino, and Q. M. Wang**. 2002. Comparative characterization of two DEAD-box RNA helicases in superfamily II: human translation-initiation factor 4A and hepatitis C virus non-structural protein 3 (NS3) helicase. Biochem. J **363**:147-155.

45. **Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl**. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature **411**:494-498.

46. **Elfgang, C., O. Rosorius, L. Hofer, H. Jaksche, J. Hauber, and D. Bevec**. 1999. Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signals. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **96**:6229-6234.

47. **Endoh, H., K. Maruyama, Y. Masuhiro, Y. Kobayashi, M. Goto, H. Tai, J. Yanagisawa, D. Metzger, S. Hashimoto, and S. Kato**. 1999. Purification and identification of p68 RNA helicase

acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. Mol. Cell Biol. **19**:5363-5372.

48. **Evans, J. E., P. A. Cane, and C. R. Pringle**. 1996. Expression and characterisation of the NS1 and NS2 proteins of respiratory syncytial virus. Virus Res. **43**:155-161.

49. **Fearns, R. and P. L. Collins**. 1999. Role of the M2-1 transcription antitermination protein of respiratory syncytial virus in sequential transcription. J Virol **73**:5852-5864.

50. **Fearns, R., M. E. Peeples, and P. L. Collins**. 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.

51. **Fields, S. and O. Song**. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature **340**:245-246.

52. **Fuerst, T. R., E. G. Niles, F. W. Studier, and B. Moss**. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **83**:8122-8126.

53. **Garcia, J. V. and A. D. Miller** . 1991. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. Nature **350**:508-511.

54. **Gazina, E. V., J. M. Mackenzie, R. J. Gorrell, and D. A. Anderson**. 2002. Differential requirements for COPI coats in formation of replication complexes among three genera of Picornaviridae. J Virol **76**:11113-11122.

55. **Germino, F. J. and N. K. Moskowitz**. 1999. Screening for protein-protein interactions. Methods Enzymol. **303**:422-450.

56. **Gonzalez-Reyes, L., M. B. Ruiz-Arguello, B. Garcia-Barreno, L. Calder, J. A. Lopez, J. P. Albar, J. J. Skehel, D. C. Wiley, and J. A. Melero**. 2001. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **98**:9859-9864.

57. **Goodbourn, S., L. Didcock, and R. E. Randall**. 2000. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. J Gen. Virol **81**:2341-2364.

58. **Gorlich, D. and U. Kutay**. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **15**:607-660.

59. **Gorlich, D., N. Pante, U. Kutay, U. Aebi, and F. R. Bischoff**. 1996. Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. EMBO J **15**:5584-5594.

60. **Graham, B. S., L. A. Bunton, P. F. Wright, and D. T. Karzon**. 1991. Reinfection of mice with respiratory syncytial virus. J Med. Virol **34**:7-13.

61. **Graham, B. S., L. A. Bunton, P. F. Wright, and D. T. Karzon**. 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. J Clin. Invest **88**:1026-1033.

62. **Greenberg, M., L. DeTulleo, I. Rapoport, J. Skowronski, and T. Kirchhausen**. 1998. A dileucine motif in HIV-1 Nef is essential for sorting into clathrin-coated pits and for downregulation of CD4. Curr. Biol. **8**:1239-1242.

63. **Gross, C. H. and S. Shuman**. 1996. The QRxGRxGRxxxG motif of the vaccinia virus DExH box RNA helicase NPH-II is required for ATP hydrolysis and RNA unwinding but not for RNA binding. J Virol **70**:1706-1713.

64. **Grundhoff, A. T., E. Kremmer, O. Tureci, A. Glieden, C. Gindorf, J. Atz, N. Mueller-Lantzsch, W. H. Schubach, and F. A. Grasser**. 1999. Characterization of DP103, a novel

DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. J Biol. Chem. **274**:19136-19144.

65. **Grzesiek, S., S. J. Stahl, P. T. Wingfield, and A. Bax**. 1996. The CD4 determinant for downregulation by HIV-1 Nef directly binds to Nef. Mapping of the Nef binding surface by NMR. Biochemistry **35**:10256-10261.

66. **Guil, S., R. Gattoni, M. Carrascal, J. Abian, J. Stevenin, and M. Bach-Elias**. 2003. Roles of hnRNP A1, SR proteins, and p68 helicase in c-H-ras alternative splicing regulation. Mol. Cell Biol. **23**:2927-2941.

67. **Guo, Q., E. Vasile, and M. Krieger**. 1994. Disruptions in Golgi structure and membrane traffic in a conditional lethal mammalian cell mutant are corrected by epsilon-COP. J Cell Biol. **125**:1213-1224.

68. **Guy, B., M. P. Kieny, Y. Riviere, C. Le Peuch, K. Dott, M. Girard, L. Montagnier, and J. P. Lecocq**. 1987. HIV F/3' orf encodes a phosphorylated GTP-binding protein resembling an oncogene product. Nature **330**:266-269.

69. **Hall, C. B.** 1994. Prospects for a respiratory syncytial virus vaccine. Science **265**:1393-1394.

70. **Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge**. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell **75**:805-816.

71. **Heilek, G. M. and M. G. Peterson**. 1997. A point mutation abolishes the helicase but not the nucleoside triphosphatase activity of hepatitis C virus NS3 protein. J Virol **71**:6264-6266.

72. **Heinzel, T., R. M. Lavinsky, T. M. Mullen, M. Soderstrom, C. D. Laherty, J. Torchia, W. M. Yang, G. Brard, S. D. Ngo, J. R. Davie, E. Seto, R. N. Eisenman, D. W. Rose, C. K. Glass, and M. G. Rosenfeld**. 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. Nature **387**:43-48.

73. **Henderson, B. R. and A. Eleftheriou**. 2000. A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. Exp. Cell Res. **256**:213-224.

74. **Hengst, U. and P. Kiefer**. 2000. Domains of human respiratory syncytial virus P protein essential for homodimerization and for binding to N and NS1 protein. Virus Genes **20**:221-225.

75. **Hill, J., K. A. Donald, D. E. Griffiths, and G. Donald**. 1991. DMSO-enhanced whole cell yeast transformation. Nucleic Acids Res. **19**:5791.

76. **Hirling, H., M. Scheffner, T. Restle, and H. Stahl**. 1989. RNA helicase activity associated with the human p68 protein. Nature **339**:562-564.

77. **Hobbie, L., A. S. Fisher, S. Lee, A. Flint, and M. Krieger**. 1994. Isolation of three classes of conditional lethal Chinese hamster ovary cell mutants with temperature-dependent defects in low density lipoprotein receptor stability and intracellular membrane transport. J Biol. Chem. **269**:20958-20970.

78. **Hoffman, C. S. and F. Winston**. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. Gene **57**:267-272.

79. **Hsu, S. I., C. M. Yang, K. G. Sim, D. M. Hentschel, E. O'Leary, and J. V. Bonventre**. 2001. TRIP-Br: a novel family of PHD zinc finger- and bromodomain-interacting proteins that regulate the transcriptional activity of E2F-1/DP-1. EMBO J **20**:2273-2285.

80. **Huang, Y. and Z. R. Liu**. 2002. The ATPase, RNA unwinding, and RNA binding activities of recombinant p68 RNA helicase. J Biol. Chem. **277**:12810-12815.

81. **Huang, Y. T., P. L. Collins, and G. W. Wertz**. 1985. Characterization of the 10 proteins of human respiratory syncytial virus: identification of a fourth envelope-associated protein. Virus Res. **2**:157-173.

82. **Hurlin, P. J., K. P. Foley, D. E. Ayer, R. N. Eisenman, D. Hanahan, and J. M. Arbeit**. 1995. Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. Oncogene **11**:2487-2501.

83. **Iggo, R. D., D. J. Jamieson, S. A. MacNeill, J. Southgate, J. McPheat, and D. P. Lane**. 1991. p68 RNA helicase: identification of a nucleolar form and cloning of related genes containing a conserved intron in yeasts. Mol. Cell Biol. **11**:1326-1333.

84. **James, P., J. Halladay, and E. A. Craig**. 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics **144**:1425-1436.

85. **Janvier, K., H. Craig, S. Le Gall, R. Benarous, J. Guatelli, O. Schwartz, and S. Benichou**. 2001. Nef-induced CD4 downregulation: a diacidic sequence in human immunodeficiency virus type 1 Nef does not function as a protein sorting motif through direct binding to beta-COP. J Virol **75**:3971-3976.

86. **Jin, H., H. Zhou, X. Cheng, R. Tang, M. Munoz, and N. Nguyen**. 2000. Recombinant respiratory syncytial viruses with deletions in the NS1, NS2, SH, and M2-2 genes are attenuated in vitro and in vivo. Virology **273**:210-218.

87. **Johnson, P. R. and P. L. Collins**. 1988. The A and B subgroups of human respiratory syncytial virus: comparison of intergenic and gene-overlap sequences. J Gen. Virol **69 (Pt 11)**:2901-2906.

88. **Kahn, J. S., M. J. Schnell, L. Buonocore, and J. K. Rose**. 1999. Recombinant vesicular stomatitis virus expressing respiratory syncytial virus (RSV) glycoproteins: RSV fusion protein can mediate infection and cell fusion. Virology **254**:81-91.

89. **Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G. W. Bornkamm, and B. Kempkes**. 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol **73**:4481-4484.

90. **Kapikian, A. Z., Bell J.A., and Mastrota F.M.** 1961. An outbreak of febrile illness and pneumonia associated with respiratory syncytial virus infection. Am J Hyg **74**:234-248.

91. **Karron, R. A., D. A. Buonagurio, A. F. Georgiu, S. S. Whitehead, J. E. Adamus, M. L. Clements-Mann, D. O. Harris, V. B. Randolph, S. A. Udem, B. R. Murphy, and M. S. Sidhu**. 1997. Respiratory syncytial virus (RSV) SH and G proteins are not essential for viral replication in vitro: clinical evaluation and molecular characterization of a cold-passaged, attenuated RSV subgroup B mutant. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **94**:13961-13966.

92. **Kitajima, Y., H. Yatsuki, R. Zhang, S. Matsuhashi, and K. Hori**. 1994. A novel human homologue of a dead-box RNA helicase family. Biochem. Biophys. Res. Commun. **199**:748-754.

93. **Koh, J., G. H. Enders, B. D. Dynlacht, and E. Harlow**. 1995. Tumour-derived p16 alleles encoding proteins defective in cell-cycle inhibition. Nature **375**:506-510.

94. **Kreis, T. E., M. Lowe, and R. Pepperkok**. 1995. COPs regulating membrane traffic. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **11**:677-706.

95. **Krilov, L. R.** 2001. Respiratory Syncytial Virus: Update on Infection, Treatment, and Prevention. Curr. Infect. Dis. Rep. **3**:242-246.

96. **Kutay, U., E. Hartmann, N. Treichel, A. Calado, M. Carmo-Fonseca, S. Prehn, R. Kraft, D. Gorlich, and F. R. Bischoff**. 2000. Identification of two novel RanGTP-binding proteins belonging to the importin beta superfamily. J Biol. Chem. **275**:40163-40168.

97. **Lamb, R. A. and D. Kolakofsky**. 2001. "Paramyxoviridae: The Viruses an Their Replication", p. 1305-1340. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (eds.), Fields Virology.

98. **Lane, D. P. and W. K. Hoeffler** . 1980. SV40 large T shares an antigenic determinant with a cellular protein of molecular weight 68,000. Nature **288**:167-170.

99. **Langland, J. O., S. Pettiford, B. Jiang, and B. L. Jacobs**. 1994. Products of the porcine group C rotavirus NSP3 gene bind specifically to double-stranded RNA and inhibit activation of the interferon-induced protein kinase PKR. J Virol **68**:3821-3829.

100. **Letourneur, F., E. C. Gaynor, S. Hennecke, C. Demolliere, R. Duden, S. D. Emr, H. Riezman, and P. Cosson**. 1994. Coatomer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. Cell **79**:1199-1207.

101. **Levine, S., R. Klaiber-Franco, and P. R. Paradiso**. 1987. Demonstration that glycoprotein G is the attachment protein of respiratory syncytial virus. J Gen. Virol **68 (Pt 9)**:2521-2524.

102. **Linder, P. and M. C. Daugeron** . 2000. Are DEAD-box proteins becoming respectable helicases? Nat. Struct. Biol. **7**:97-99.

103. **Liu, Z. R.** 2002. p68 RNA helicase is an essential human splicing factor that acts at the U1 snRNA-5' splice site duplex. Mol. Cell Biol. **22**:5443-5450.

104. **Lu, Y., M. Wambach, M. G. Katze, and R. M. Krug**. 1995. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. Virology **214**:222-228.

105. **Lukas, J., D. Parry, L. Aagaard, D. J. Mann, J. Bartkova, M. Strauss, G. Peters, and J. Bartek**. 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. Nature **375**:503-506.

106. **Macara, I. G.** 2001. Transport into and out of the nucleus. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **65**:570-94, table.

107. **Mallabiabarrena, A. and V. Malhotra**. 1995. Vesicle biogenesis: the coat connection. Cell **83**:667-669.

108. **Mamiya, N. and H. J. Worman**. 1999. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. J Biol. Chem. **274**:15751-15756.

109. **Mattaj, I. W. and L. Englmeier**. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. Annu. Rev. Biochem. **67**:265-306.

110. **Matthews, J. M., T. F. Young, S. P. Tucker, and J. P. Mackay**. 2000. The core of the respiratory syncytial virus fusion protein is a trimeric coiled coil. J Virol **74**:5911-5920.

111. **McIntosh, K., H. B. Masters, I. Orr, R. K. Chao, and R. M. Barkin**. 1978. The immunologic response to infection with respiratory syncytial virus in infants. J Infect. Dis. **138**:24-32.

112. **Melino, G., L. De, V, and K. H. Vousden**. 2002. p73: Friend or foe in tumorigenesis. Nat. Rev. Cancer **2**:605-615.

113. **Miller J.H.** 2003. A Short Course in Bacterial Genetics, p. 74. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

114. **Modrow S. and Falke D**. 1997. Molekulare Virologie. Spektrum Akad. Verl.

115. **Mori, K., Y. Maeda, H. Kitaura, T. Taira, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga**. 1998. MM-1, a novel c-Myc-associating protein that represses transcriptional activity of c-Myc. J Biol. Chem. **273**:29794-29800.

116. **Neilson, K. A. and E. J. Yunis**. 1990. Demonstration of respiratory syncytial virus in an autopsy series. Pediatr. Pathol. **10**:491-502.

117. **Neubauer, G., A. King, J. Rappsilber, C. Calvio, M. Watson, P. Ajuh, J. Sleeman, A. Lamond, and M. Mann**. 1998. Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. Nat. Genet. **20**:46-50.

118. **Openshaw, P. J., R. M. Pemberton, L. A. Ball, G. W. Wertz, and B. A. Askonas**. 1988. Helper T cell recognition of respiratory syncytial virus in mice. J Gen. Virol **69 (Pt 2)**:305-312.

119. **Orci, L., B. S. Glick, and J. E. Rothman**. 1986. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. Cell **46**:171-184.

120. **Owsianka, A. M. and A. H. Patel**. 1999. Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. Virology **257**:330-340.

121. **Palmer, D. J., J. B. Helms, C. J. Beckers, L. Orci, and J. E. Rothman**. 1993. Binding of coatomer to Golgi membranes requires ADP-ribosylation factor. J Biol. Chem. **268**:12083-12089.

122. **Pastey, M. K. and S. K. Samal** . 1993. Structure and sequence comparison of bovine respiratory syncytial virus fusion protein. Virus Res. **29**:195-202.

123. **Pastey, M. K. and S. K. Samal** . 1995. Nucleotide sequence analysis of the non-structural NS1 (1C) and NS2 (1B) protein genes of bovine respiratory syncytial virus. J Gen. Virol **76 (Pt 1)**:193-197.

124. **Piguet, V., F. Gu, M. Foti, N. Demaurex, J. Gruenberg, J. L. Carpentier, and D. Trono**. 1999. Nef-induced CD4 degradation: a diacidic-based motif in Nef functions as a lysosomal targeting signal through the binding of beta-COP in endosomes. Cell **97**:63-73.

125. **Printen, J. A. and G. F. Sprague, Jr.** 1994. Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. Genetics **138**:609-619.

126. **Prof.Stewart McNulty.** „The Big Picture Book of Viruses". http://www.virology.net/Big_Virology/BVRNApara.html. 2003. Veterinary division. Ref Type: Internet Communication

127. **Rexach, M. and G. Blobel**. 1995. Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. Cell **83**:683-692.

128. **Richman, A. V., F. A. Pedreira, and N. M. Tauraso**. 1971. Attempts to demonstrate hemagglutination and hemadsorption by respiratory syncytial virus. Appl. Microbiol. **21**:1099-1100.

129. **Robinson, M. S.** 1994. The role of clathrin, adaptors and dynamin in endocytosis. Curr. Opin. Cell Biol. **6**:538-544.

130. **Rossow, K. L. and R. Janknecht**. 2003. Synergism between p68 RNA helicase and the transcriptional coactivators CBP and p300. Oncogene **22**:151-156.

131. **Satou, A., T. Taira, S. M. Iguchi-Ariga, and H. Ariga**. 2001. A novel transrepression pathway of c-Myc. Recruitment of a transcriptional corepressor complex to c-Myc by MM-1, a c-Myc-binding protein. J Biol. Chem. **276**:46562-46567.

132. **Scheffner, M., R. Knippers, and H. Stahl**. 1989. RNA unwinding activity of SV40 large T antigen. Cell **57**:955-963.

133. **Schiestl, R. H. and R. D. Gietz**. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr. Genet. **16**:339-346.

134. **Schlender, J., B. Bossert, U. Buchholz, and K. K. Conzelmann**. 2000. Bovine respiratory syncytial virus nonstructural proteins NS1 and NS2 cooperatively antagonize alpha/beta interferon-induced antiviral response. J Virol **74**:8234-8242.

135. **Schlender, J., G. Zimmer, G. Herrler, and K. K. Conzelmann**. 2003. Respiratory syncytial virus (RSV) fusion protein subunit F2, not attachment protein G, determines the specificity of RSV infection. J Virol **77**:4609-4616.

136. **Schmid, S. R. and P. Linder**. 1992. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. Mol. Microbiol. **6**:283-291.

137. **Schnell, M. J., T. Mebatsion, and K. K. Conzelmann**. 1994. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. EMBO J **13**:4195-4203.

138. **Serafini, T., L. Orci, M. Amherdt, M. Brunner, R. A. Kahn, and J. E. Rothman**. 1991. ADP-ribosylation factor is a subunit of the coat of Golgi-derived COP-coated vesicles: a novel role for a GTP-binding protein. Cell **67**:239-253.

139. **Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach**. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. Nature **366**:704-707.

140. **Shay, D. K., R. C. Holman, R. D. Newman, L. L. Liu, J. W. Stout, and L. J. Anderson**. 1999. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. JAMA **282**:1440-1446.

141. **Sherr, C. J.** 1993. Mammalian G1 cyclins. Cell **73**:1059-1065.

142. **Stec, D. S., M. G. Hill, III, and P. L. Collins**. 1991. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. Virology **183**:273-287.

143. **Stevenson, R. J., S. J. Hamilton, D. E. MacCallum, P. A. Hall, and F. V. Fuller-Pace**. 1998. Expression of the 'dead box' RNA helicase p68 is developmentally and growth regulated and correlates with organ differentiation/maturation in the fetus. J Pathol. **184**:351-359.

144. **Sugimoto, M., T. Nakamura, N. Ohtani, L. Hampson, I. N. Hampson, A. Shimamoto, Y. Furuichi, K. Okumura, S. Niwa, Y. Taya, and E. Hara**. 1999. Regulation of CDK4 activity by a novel CDK4-binding protein, p34(SEI-1). Genes Dev. **13**:3027-3033.

145. **Sutter, G., M. Ohlmann, and V. Erfle**. 1995. Non-replicating vaccinia vector efficiently expresses bacteriophage T7 RNA polymerase. FEBS Lett. **371**:9-12.

146. **Teng, M. N. and P. L. Collins** . 1999. Altered growth characteristics of recombinant respiratory syncytial viruses which do not produce NS2 protein. J Virol **73**:466-473.

147. **Teng, M. N., S. S. Whitehead, A. Bermingham, M. St Claire, W. R. Elkins, B. R. Murphy, and P. L. Collins**. 2000. Recombinant respiratory syncytial virus that does not express the NS1 or M2-2 protein is highly attenuated and immunogenic in chimpanzees. J Virol **74**:9317-9321.

148. **Trouche, D. and T. Kouzarides** . 1996. E2F1 and E1A(12S) have a homologous activation domain regulated by RB and CBP. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A **93**:1439-1442.

149. **Valarcher, J. F., J. Furze, S. Wyld, R. Cook, K. K. Conzelmann, and G. Taylor**. 2003. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. J Virol **77**:8426-8439.

150. **Van Den Hoogen, B. G., J. C. De Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus**. 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat. Med. **7**:719-724.

151. **Walsh, E. E. and J. Hruska**. 1983. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus proteins: identification of the fusion protein. J Virol **47**:171-177.

152. **Wang, E. E., B. J. Law, F. D. Boucher, D. Stephens, J. L. Robinson, S. Dobson, J. M. Langley, J. McDonald, N. E. MacDonald, and I. Mitchell**. 1996. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. J Pediatr. **129**:390-395.

153. **Wardell, A. D., W. Errington, G. Ciaramella, J. Merson, and M. J. McGarvey**. 1999. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. J Gen. Virol **80 (Pt 3)**:701-709.

154. **Wassarman, D. A. and J. A. Steitz**. 1991. RNA splicing. Alive with DEAD proteins. Nature **349**:463-464.

155. **Watanabe, K., T. Ozaki, T. Nakagawa, K. Miyazaki, M. Takahashi, M. Hosoda, S. Hayashi, S. Todo, and A. Nakagawara**. 2002. Physical interaction of p73 with c-Myc and MM1, a c-Myc-binding protein, and modulation of the p73 function. J Biol. Chem. **277**:15113-15123.

156. **Watanabe, M., J. Yanagisawa, H. Kitagawa, K. Takeyama, S. Ogawa, Y. Arao, M. Suzawa, Y. Kobayashi, T. Yano, H. Yoshikawa, Y. Masuhiro, and S. Kato**. 2001. A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA. EMBO J **20**:1341-1352.

157. **Waters, M. G., T. Serafini, and J. E. Rothman**. 1991. 'Coatomer': a cytosolic protein complex containing subunits of non-clathrin-coated Golgi transport vesicles. Nature **349**:248-251.

158. **Wertz, G. W., M. Krieger, and L. A. Ball**. 1989. Structure and cell surface maturation of the attachment glycoprotein of human respiratory syncytial virus in a cell line deficient in O glycosylation. J Virol **63**:4767-4776.

159. **Whitehead, S. S., A. Bukreyev, M. N. Teng, C. Y. Firestone, M. St Claire, W. R. Elkins, P. L. Collins, and B. R. Murphy**. 1999. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. J Virol **73**:3438-3442.

160. **Whitney, J. A., M. Gomez, D. Sheff, T. E. Kreis, and I. Mellman**. 1995. Cytoplasmic coat proteins involved in endosome function. Cell **83**:703-713.

161. **You, L. R., C. M. Chen, T. S. Yeh, T. Y. Tsai, R. T. Mai, C. H. Lin, and Y. H. Lee**. 1999. Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. J Virol **73**:2841-2853.

162. **Young, D. F., L. Didcock, S. Goodbourn, and R. E. Randall**. 2000. Paramyxoviridae use distinct virus-specific mechanisms to circumvent the interferon response. Virology **269**:383-390.

163. **Yu, Q., R. W. Hardy, and G. W. Wertz**. 1995. Functional cDNA clones of the human respiratory syncytial (RS) virus N, P, and L proteins support replication of RS virus genomic RNA analogs and define minimal trans-acting requirements for RNA replication. J Virol **69**:2412-2419.

164. **Zimmer, G., L. Budz, and G. Herrler**. 2001. Proteolytic activation of respiratory syncytial virus fusion protein. Cleavage at two furin consensus sequences. J Biol. Chem. **276**:31642-31650.

Veröffentlichungen

Poster

1) Interaction of two Nonstructural Proteins (NS1/NS2) of Respiratory Syncytial Virus (RSV) with a Nuclear Host Cell Protein
M. Wolff, B. Bossert & K.-K. Conzelmann
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie
Dresden 14.-18.03.2001

2) Interaction of two Nonstructural Proteins (NS1/NS2) of Respiratory Syncytial Virus (RSV) with a Nuclear DEAD Box Helicase
M. Wolff, B. Bossert & K.-K. Conzelmann
Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie
Erlangen 08.-11.04.2002

Vorträge

1) Nonstructural Proteins NS1 and NS2 of Bovine Respiratory Syntytial Virus (BRSV) Interact with a Cellular RNA Helicase
M. Wolff, B. Bossert & K.-K. Conzelmann
Respiratory Syncytial Virus after 45 Years -From Bedside to Bench-

Segovia (Spanien) 01.-03.10.2001

2) Interaction of Respiratory Syntytial Virus (RSV) Nonstructural Proteins NS1 and NS2 with a Nuclear Host Cell Protein
M. Wolff, B. Bossert & K.-K. Conzelmann
The World of Microbes-XIIth International Congress of Virology

Paris (Frankreich) 27.07.-01.08.2002

Publikationen

The DEAD Box Helicase p68 Interacts with two Nonstructural Proteins of Respiratory Syncytial Virus and Supports Viral Replication *in vitro*
M. Wolff, B. Bossert & K.-K. Conzelmann
-Manuscript in preparation-

Lebenslauf

Michael Wolff
Diplom Biologe
*30.10.1973 in Mönchengladbach

Schulbildung

1980-1984	Städt. kath. Grundschule Viersen-Dülken (Paul Weyers-Schule)
1984-1993	Städt. Gymnasium Viersen-Dülken
06/1993	Abitur

Zivildienst

08/1993-10/1994	kath. Altenheim Viersen-Dülken (Theresienheim)

Hochschulbildung

11/1994	Beginn des Biologiestudiums an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
09/1996	Vordiplom in Biologie (Fächer: Zoologie, Botanik, Chemie, Mathematik)
10/1996-07/1997	Nebenfachstudium Betriebswirtschaftslehre in Mainz
08/1998	Diplomprüfungen in Biologie (Fächer: Genetik, Mikrobiologie, Zoologie, Biochemie)
10/1998-08/1999	Diplomarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) Heidelberg bei Prof. Dr. Ingrid Grummt Thema: *Etablierung eines genetischen Selektionssystems zu Identifizierung neuer rDNA Promotor-bindender Proteine der Maus*

Tätigkeiten

08/1997	Industriepraktikum bei der Hoechst AG Frankfurt a. M.
09/1997	Virologisches Praktikum im Graduiertenkolleg der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Prof. Dr. Rolf Streek)
03/1998	Biochemisches Praktikum am Deutschen Krebsforschungs-zentrum (DKFZ) Heidelberg in der Abteilung Molekularbiologie der Zelle II (Prof. Dr. Ingrid Grummt)

04-07/1998 Assistenztätigkeit im physiologischen Praktikum des Zoologischen Instituts der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Prof. Dr. Jürgen Markl)

Promotion

11/1999 Beginn der Promotion am Max von Pettenkofer-Institut der LMU München bei Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann

Thema: *Identifizierung und Charakterisierung von Interaktionen der Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 des Respiratorischen Synzytialvirus mit Proteinen der Wirtszelle*

19/01/2004 Einreichen der Dissertation zum Dr. rer. nat.

München, den 19.01.2004

(Michael Wolff)

Danksagung

Mein besonders herzlicher Dank geht an Prof. Dr. Karl-Klaus Conzelmann für die interessante Themenstellung und die sehr gute Betreuung dieser Arbeit am Max von Pettenkofer-Institut am Genzentrum. Neben der Einführung in ein breitgefächertes Spektrum moderner Arbeitsmethoden, verdanke ich ihm meine ersten Kongress-erfahrungen mit Vortragstätigkeiten, was ich nie als Selbstverständlichkeit betrachtet habe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Prof. Dr. Jörg Overmann, der diese Arbeit an der Fakultät für Biologie der LMU München betreut hat und stets reges Interesse an der Entwicklung meiner Arbeit hatte. PD Dr. Brian Salmons danke ich für die schnelle und unkomplizierte Bereitschaft, das zweite Gutachten für diese Arbeit zu erstellen.

Prof. Dr. Ulrike Kutay danke ich für die zur Verfügung gestellten RanBP16 Antikörper.

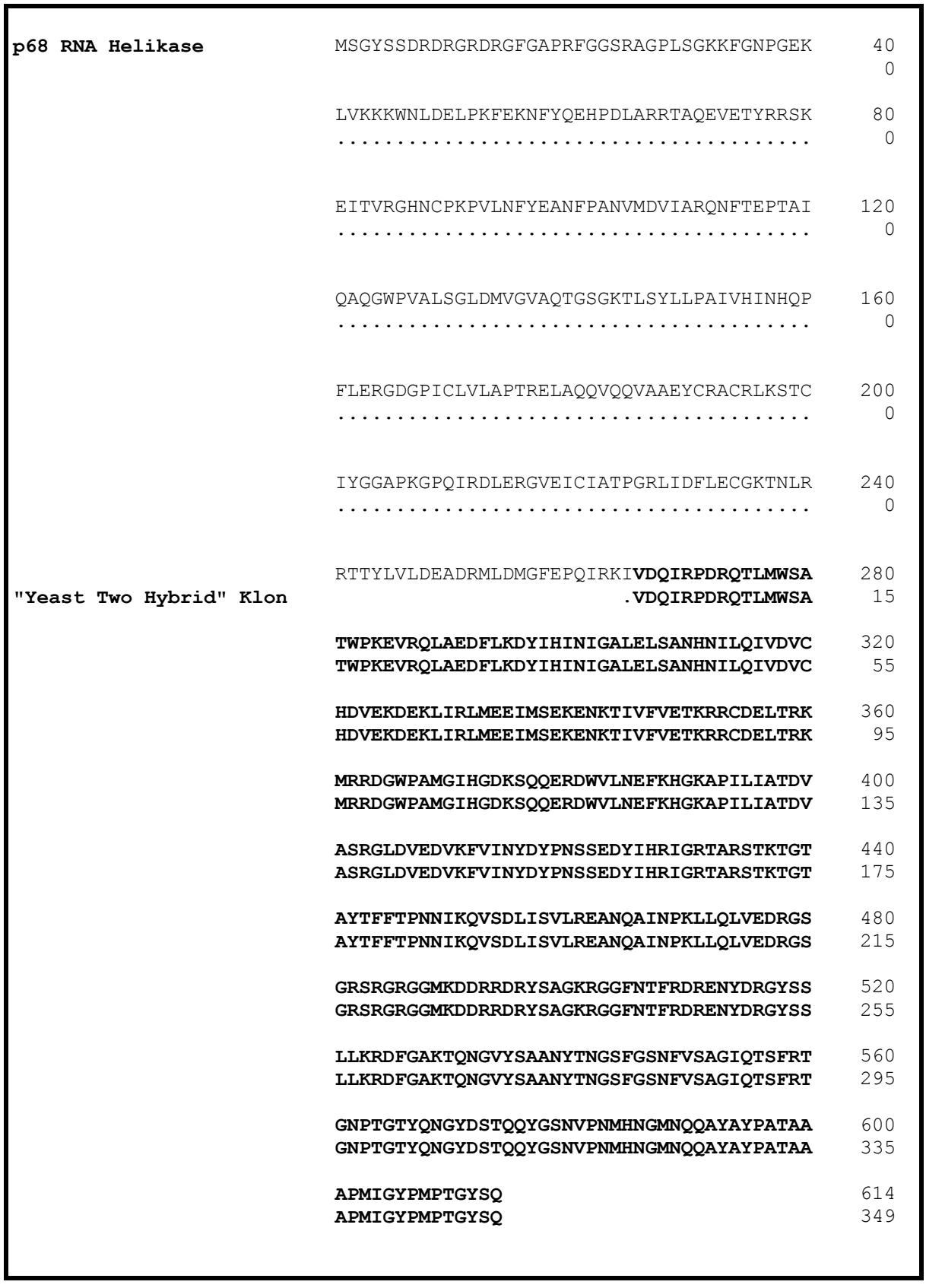
Dem Tollwut/RSV Team sei an dieser Stelle herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre im „Hochsicherheitstrakt“ zwischen Tiefkühlschränken, Sterilwerkbänken und ewigem Bayern 3 Gedudel gedankt. Vor allem möchte ich mich bei Birgit Bossert für die endlosen Diskussionen über die NS-Proteine und die zur Verfügung gestellten mutagenisierten NS1 cDNAs bedanken. Nadin Hagendorf möchte ich herzlich für ihren enthusiastischen Einsatz bei Klonierungen, Maxi- und Minipräps und für alle anderen Labortätigkeiten danken. Gunni Walliser danke ich vor allem für die Interpretation meiner nicht immer eindeutigen Western Blots und seine fundierten Computerkenntnisse. Stefan Finke danke ich für die Einführung in die Geheimnisse der Northern Blot Technik und hilfreiche Tipps sowie Jörg Schlender für die geübte Begutachtung meiner Titrationen und Wachstumskurven. Der Dr. med. vet. Fraktion Tina Ziegler sowie den Interferon/Tollwutspezialisten Sabrina Marozin, Kris Brzozka und Caroline Homma sei herzlich für ihre belebende Art im Laboralltag und die lustigen Nachbesprechungen im EWB Grosshadern gedankt.

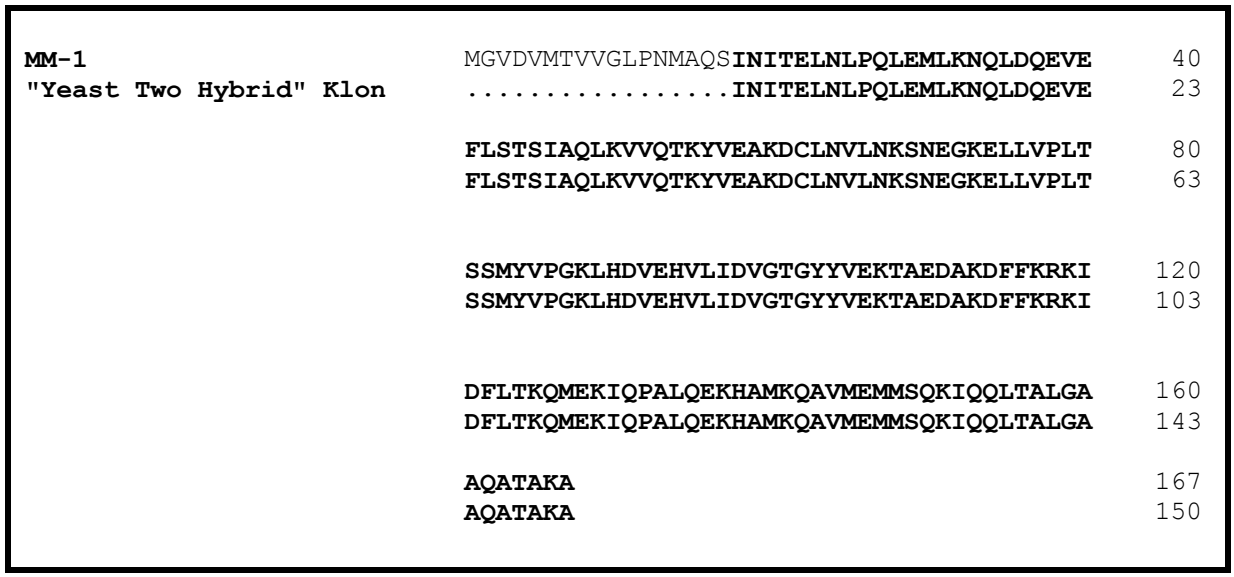
Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern unseres Stockwerks am MvP für die gute Arbeitsatmosphäre. Allen voran Alex Ege für eine ausgewogene Mischung der wissenschaftlichen- und nicht wissenschaftlichen Diskussionen. Christian

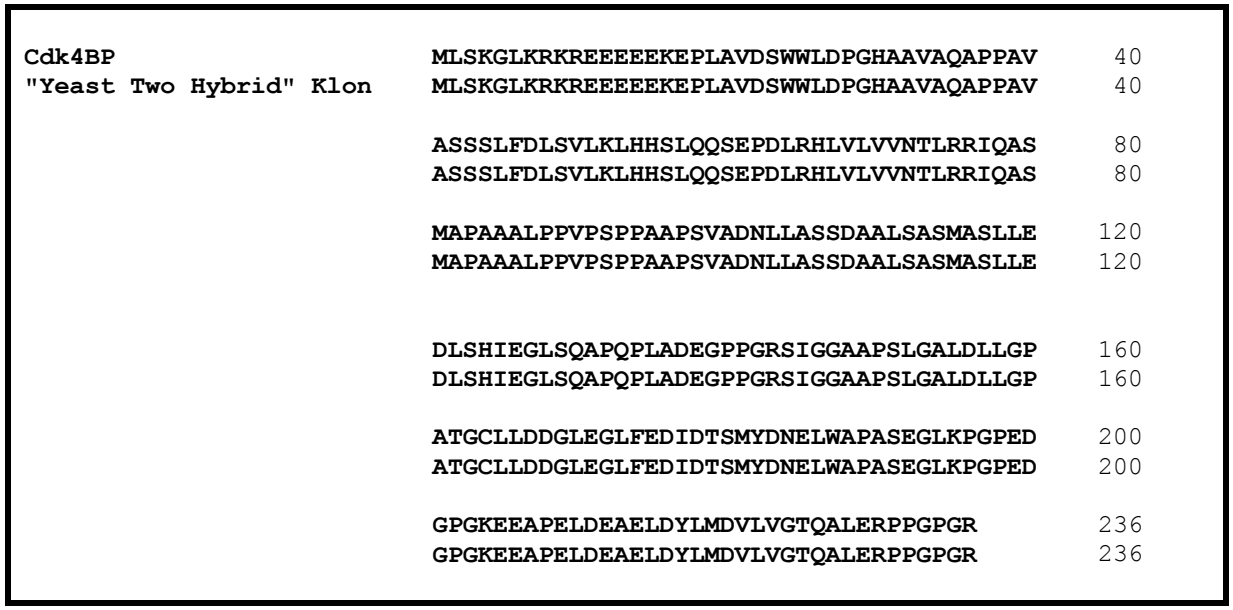
Spielhaupter (Dr. Yeast) danke ich herzlich für die Diskussionen über das Y2H System.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Birgit Bossert, Tina Ziegler, Franziska Wopfner und Sabine Funck, die das Projekt „*knapp aber machbar*“ deutlich beschleunigt haben.

Anhang

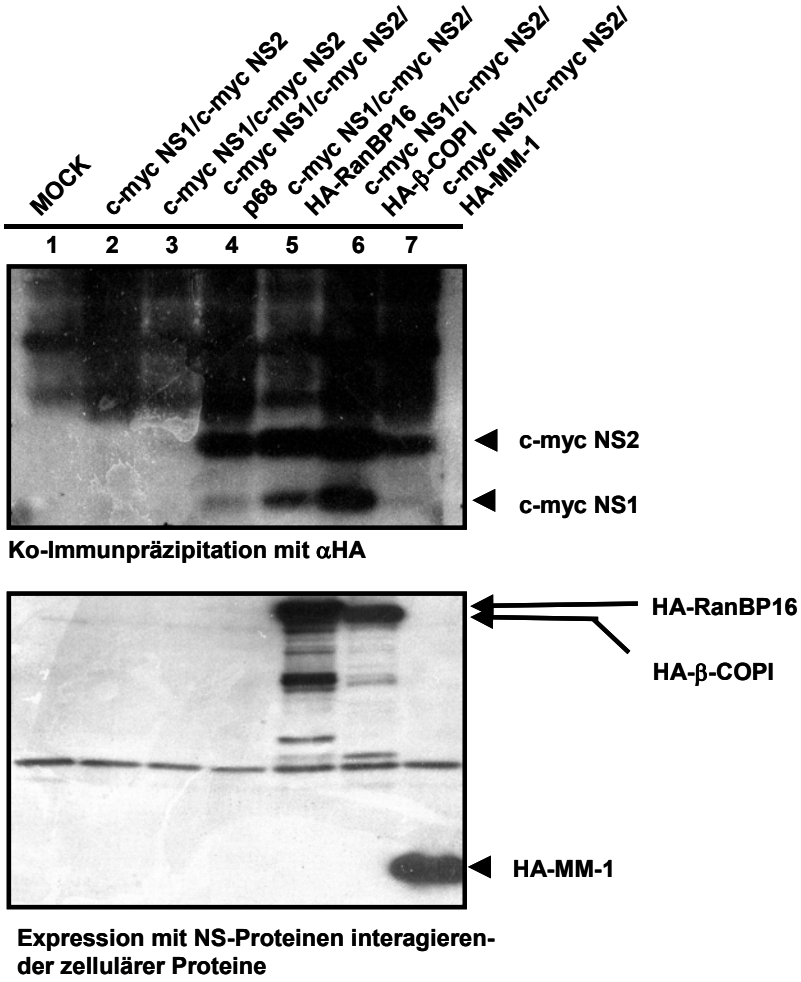

p68 RNA Helikase
MSGYSSDRDRGRDRGFGAPRFGGSRAGPLSGKKFGNPGEK 40
0
LVKKKWNLDELPKFEKNFYQEHPDLARRTAQEVETYRRSK 80
0
EITVRGHNCPKPVLNFYEANFPANVMDVIARQNFTEPTAI 120
0
QAQGWPVALSGLDMVGVAQTGSGKTLSYLLPAIVHINHQP 160
0
FLERGDGPICLVLAPTRELAQQVQQVAAEYCRACRLKSTC 200
0
IYGGAPKGPQIRDLERGVEICIATPGRLIDFLECGKTNLR 240
0
RTTYLVLDEADRMLDMGFEPQIRKIVDQIRPDRQTLMWSA 280
"Yeast Two Hybrid" Klon .VDQIRPDRQTLMWSA 15
TWPKEVRQLAEDFLKDYIHINIGALELSANHNILQIVDVC 320
TWPKEVRQLAEDFLKDYIHINIGALELSANHNILQIVDVC 55
HDVEKDEKLIRLMEEIMSEKENKTIVFVETKRRCDELTRK 360
HDVEKDEKLIRLMEEIMSEKENKTIVFVETKRRCDELTRK 95
MRRDGWPAMGIHGDKSQQERDWVLNEFKHGKAPILIATDV 400
MRRDGWPAMGIHGDKSQQERDWVLNEFKHGKAPILIATDV 135
ASRGLDVEDVKFVINYDYPNSSEDYIHRIGRTARSTKTGT 440
ASRGLDVEDVKFVINYDYPNSSEDYIHRIGRTARSTKTGT 175
AYTFFTPNNIKQVSDLISVLREANQAINPKLLQLVEDRGS 480
AYTFFTPNNIKQVSDLISVLREANQAINPKLLQLVEDRGS 215
GRSRGRGGMKDDRRDRYSAGKRGGFNTFRDRENYDRGYSS 520
GRSRGRGGMKDDRRDRYSAGKRGGFNTFRDRENYDRGYSS 255
LLKRDFGAKTQNGVYSAANYTNGSFGSNFVSAGIQTSFRT 560
LLKRDFGAKTQNGVYSAANYTNGSFGSNFVSAGIQTSFRT 295
GNPTGTYQNGYDSTQQYGSNVPNMHNGMNQQAYAYPATAA 600
GNPTGTYQNGYDSTQQYGSNVPNMHNGMNQQAYAYPATAA 335
APMIGYPMPTGYSQ 614
APMIGYPMPTGYSQ 349


MM-1
"Yeast Two Hybrid" Klon
MGVDVMTVVGLPNMAQSINITELNLPQLEMLKNQLDQEVE 40
.....INITELNLPQLEMLKNQLDQEVE 23
FLSTSIAQLKVVQTKYVEAKDCLNVLNKSNEGKELLVPLT 80
FLSTSIAQLKVVQTKYVEAKDCLNVLNKSNEGKELLVPLT 63
SSMYVPGKLHDVEHVLIDVGTGYYVEKTAEDAKDFFKRKI 120
SSMYVPGKLHDVEHVLIDVGTGYYVEKTAEDAKDFFKRKI 103
DFLTKQMEKIQPALQEKHAMKQAVMEMMSQKIQQLTALGA 160
DFLTKQMEKIQPALQEKHAMKQAVMEMMSQKIQQLTALGA 143
AQATAKA 167
AQATAKA 150


Cdk4BP
"Yeast Two Hybrid" Klon
MLSKGLKRKREEEEEKEPLAVDSWWLDPGHAAVAQAPPAV 40
MLSKGLKRKREEEEEKEPLAVDSWWLDPGHAAVAQAPPAV 40
ASSSLFDLSVLKLHHSLQQSEPDLRHLVLVVNTLRRIQAS 80
ASSSLFDLSVLKLHHSLQQSEPDLRHLVLVVNTLRRIQAS 80
MAPAAALPPVPSPPAAPSVADNLLASSDAALSASMASLLE 120
MAPAAALPPVPSPPAAPSVADNLLASSDAALSASMASLLE 120
DLSHIEGLSQAPQPLADEGPPGRSIGGAAPSLGALDLLGP 160
DLSHIEGLSQAPQPLADEGPPGRSIGGAAPSLGALDLLGP 160
ATGCLLDDGLEGLFEDIDTSMYDNELWAPASEGLKPGPED 200
ATGCLLDDGLEGLFEDIDTSMYDNELWAPASEGLKPGPED 200
GPGKEEAPELDEAELDYLMDVLVGTQALERPPGPGR 236
GPGKEEAPELDEAELDYLMDVLVGTQALERPPGPGR 236

```
RanBP16                  MADHVQSLAQLENLCKQLYETTDTTTRLQAEKALVEFTNS     40
                         ........................................      0
                         PDCLSKCQLLLERGSSSYSQLLAATCLTKLVSRTNNPLPL     80
                         ........................................      0
                         EQRIDIRNYVLNYLATRPKLATFVTQALIQLYARITKLGW    120
                         ........................................      0
                         FDCQKDDYVFRNAITDVTRFLQDSVEYCIIGVTILSQLTN    160
                         ........................................      0
                         EINQADTTHPLTKHRKIASSFRDSSLFDIFTLSCNLLKQA    200
                         ........................................      0
                         SGKNLNLNDESQHGLLMQLLKLTHNCLNFDFIGTSTDESS    240
                         ........................................      0
                         DDLCTVQIPTSWRSAFLDSSTLQLFFDLYHSIPPSFSPLV    280
                         ........................................      0
                         LSCLVQIASVRRSLFNNAERAKFLSHLVDGVKRILENPQS    320
                         ........................................      0
                         LSDPNNYHEFCRLLARLKSNYQLGELVKVENYPEVIRLIA    360
                         ........................................      0
                         NFTVTSLQHWEFAPNSVHYLLSLWQRLAASVPYVKATEPH    400
                         ........................................      0
                         MLETYTPEVTKAYITSRLESVHIILRDGLEDPLEDTGLVQ    440
                         ........................................      0
                         QQLDQLSTIGRCEYEKTCALLVQLFDQSAQSYQELLQSAS    480
                         ........................................      0
                         ASPMDIAVQEGRLTWLVYIIGAVIGGRVSFASTDEQDAMD    520
                         ........................................      0
                         GELVCRVLQLMNLTDSRLAQAGNEKLELAMLSFFEQFRKI    560
                         ........................................
                         YIGDQVQKSSKLYRRLSEVLGLNDETMVLSVFIGKIITNL    600
                         ........................................      0
                         KYWGRCEPITSKTLQLLNDLSIGYSSVRKLVKLSAVQFML    640
                         ........................................      0
                         NNHTSEHFSFLGINNQSNLTDMRCRTTFYTALGRLLMVDL    680
                         ........................................      0
                         GEDEDQYEQFMLPLTAAFEAVAQMFSTNSFNEQEAKRTLV    720
                         ........................................      0
                         GLVRDLRGIAFAFNAKTSFMMLFEWIYPSYMPILQRAIEL    760
                         ........................................      0
                         WYHDPACTTPVLKLMAELVHNRSQRLQFDVSSPNGILLFR    800
                         ........................................
                         ETSKMITMYGNRILTLGEVPKDQVYALKLKGISICFSMLK    840
"Yeast Two Hybrid" Klon  .....................DQVYALKLKGISICFSMLK     19

                         AALSGSYVNFGVFRLYGDDALDNALQTFIKLLLSIPHSDL    880
                         AALSGSYVNFGVFRLYGDDALDNALQTFIKLLLSIPHSDL     59

                         LDYPKLSQSYYSLLEVLTQDHMNFIASLEPHVIMYILSSI    920
                         LDYPKLSQSYYSLLEVLTQDHMNFIASLEPHVIMYILSSI     99

                         SEGLTALDTMVCTGCCSCLDHIVTYLFKQLSRSTKKRTTP    960
                         SEGLTALDTMVCTGCCSCLDHIVTYLFKQLSRSTKKRTTP    139

                         LNQESDRFLHIMQQHPEMIQQMLSTVLNIIIFEDCRNQWS   1000
                         LNQESDRFLHIMQQHPEMIQQMLSTVLNIIIFEDCRNQWS    179

                         MSRPLLGLILLNEKYFSDLRNSIVNSQPPEKQQAMHLCFE   1040
                         MSRPLLGLILLNEKYFSDLRNSIVNSQPPEKQQAMHLCFE    219

                         NLMEGIERNLLTKNRDRFTQNLSAFRREVNDSMKNSTYGV   1080
                         NLMEGIERNLLTKNRDRFTQNLSAFRREVNDSMKNSTYGV    259

                         NSNDMMS                                    1087
                         NSNDMMS                                     266
```

beta COPI	MTAAENVCYTLINVPMDSEPPSEISLKNDLEKGDVKSKTE	40
	.....	0
	ALKKVIIMILNGEKLPGLLMTIIRFVLPLQDHTIKKLLLV	80
	.....	0
	FWEIVPKTTPDGRLLHEMILVCDAYRKDLQHPNEFIRGST	120
	.....	0
	LRFLCKLKEAELLEPLMPAIRACLEHRHSYVRRNAVLAIY	160
	.....	0
	TIYRNFEHLIPDAPELIHDFLVNEKDASCKRNAFMMLIHA	200
	.....	0
	DQDRALDYLSTCIDQVQTFGDILQLVIVELIYKVCHANPS	240
	.....	0
	ERARFIRCIYNLLQSSSPAVKYEAAGTLVTLSSAPTAIKA	280
	.....	0
	AAQCYIDLIIKESDNNVKLIVLDRLIELKEHPAHERVLQD	320
	.....	0
	LVMDILRVLSTPDLEVRKKTLQLALDLVSSRNVEELVIVL	360
	.....	0
	KKEVIKTNNVSEHEDTDKYRQLLVRTLHSCSVRFPDMAAN	400
	.....	0
	VIPVLMEFLSDNNEAAAADVLEFVREAIQRFDNLRMLIVE	440
	.....	0
	KMLEVFHAIKSVKIYRGALWILGEYCSTKEDIQSVMTEIR	480
	.....	0
	RSLGEIPIVESEIKKEAGELKPEEEITVGPVQKLVTEMGT	520
	.....	0
	YATQSALSSSRPTKKEEDRPPLRGFLLDGDFFVAASLATT	560
	.....	0
	LTKIALRYVALVQEKKKQNSFVAEAMLLMATILHLGKSSL	600
	.....	0
	PKKPITDDDVDRISLCLKVLSECSPLMNDIFNKECRQSLS	640
	.....	0
	HMLSAKLEEEKLSQKKESEKRNVTVQPDDPISFMQLTAKN	680
	.....	0
	EMNCKEDQFQLSLLAAMGNTQRKEAADPLASKLNKVTQLT	720
	.....	0
	GFSDPVYAEAYVHVNQYDIVLDVLVVNQTSDTLQNCTLEL	760
	A**TLGDLKLVEKPSPLTLAPHDFANIKANVKVASTENGIIF**	800
"Yeast Two Hybrid" Klon	**.TLGDLKLVEKPSPLTLAPHDFANIKANVKVASTENGIIF**	39
	GNIVYDVSGAASDRNCVVLSDIHIDIMDYIQPATCTDAEF	840
	GNIVYDVSGAASDRNCVVLSDIHIDIMDYIQPATCTDAEF	79
	RQMWAEFEWENKVTVNTNMVDLNDYLQHILKSTNMKCLTP	880
	RQMWAEFEWENKVTVNTNMVDLNDYLQHILKSTNMKCLTP	119
	EKALSGYCGFMAANLYARSIFGEDALANVSIEKPIHQGPD	920
	EKALSGYCGFMAANLYARSIFGEDALANVSIEKPIHQGPD	159
	AAVTGHIRIRAKSQGMALSLGDKINLSQKKTSI	953
	AAVTGHIRIRAKSQGMALSLGDKINLSQKKTSI	192



Ko-Immunpräzipitation von NS1 und NS2 durch zelluläre Proteine

Neben der Mock Kontrolle ist die Präzipitation mit c-myc spezifischen Antikörpern gezeigt (Spur 2), bei der NS-Proteine nicht präzipitiert werden. Spur 3 zeigt die Immunpräzipitation mit αp68 Antikörpern ohne rekombinante p68 Expression, bei der NS2 schwach ko-immunpräzipitiert. Nach rekombinanter p68 Expression und Immunpräzipitation werden NS-Proteine deutlich ko-immunpräzipitiert (Spur 4). Nach rekombinanter Expression der Proteine RanBP16, βCOPI und MM-1 (Spur 5-7) und Immunpräzipitation mit αHA Antikörpern, werden die NS-Proteine ebenfalls deutlich ko-immunpräzipitiert.

Die Expressionskontrolle zeigt rekombinante zelluläre Proteine mit HA-Epitop. p68 wurde nicht HA fusioniert und deshalb auf einem gesonderten Western blot nachgewiesen (Abb. 40).

Hiermit bestätige ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die hier angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

München, 19.01.2004

Ort /Datum

Unterschrift