

# **Untersuchungen zu Funktion und Topologie des Gelbfieber-Virus- Nichtstrukturproteins NS2A**

## **Dissertation**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
im Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik  
und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg**

**vorgelegt von  
Stephanie Bovensmann**

**Hamburg, April 2006**

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. SCHMITZ  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. G. ADAM  
Tag der Disputation: 16. Juni 2006

Hamburg, den 30. Mai 2006



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	1
1.1 <i>Flaviviridae</i> .....	1
1.1.1 Genus <i>Flavivirus</i> .....	1
1.1.2 Genus <i>Pestivirus</i> .....	3
1.1.3 Genus <i>Hepacivirus</i> .....	3
1.2 Morphologie der Flaviviren.....	4
1.3 Genomaufbau der Flaviviren.....	4
1.4 Lebenszyklus der Flaviviren.....	5
1.5 Flavivirale Strukturproteine.....	8
1.6 Flavivirale Nichtstrukturproteine.....	9
1.7 Zielsetzung.....	11
<b>2. Material und Methoden</b> .....	13
2.1 Material.....	13
2.1.1 Bakterien.....	13
2.1.2 Plasmide.....	13
2.1.3 Synthetische Oligonukleotide.....	14
2.1.4 Zellen.....	17
2.1.5 Virusstämme.....	17
2.1.6 Antiseren und monoklonale Antikörper.....	18
2.1.7 Enzyme und Kits.....	19
2.1.8 Medien und Zusätze für die Zellkultur.....	19
2.1.9 Chemikalien.....	20
2.1.10 Verbrauchsmaterial.....	20
2.1.11 Geräte.....	20

2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Mikrobiologische Methoden.....	21
2.2.1.1 Anzucht von Bakterien.....	21
2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien.....	21
2.2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in CaCl <sub>2</sub> -kompetente Bakterien.....	21
2.2.2 Standard-DNA-Techniken.....	22
2.2.2.1 Kleine Plasmid-Isolierung („Minipreps“).....	22
2.2.2.2 Große Plasmid-Isolierung („Midipreps“).....	23
2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung.....	23
2.2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA.....	24
2.2.2.5 Restriktionsverdau.....	24
2.2.2.6 Dephosphorylierung.....	24
2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese.....	25
2.2.2.8 Gelextraktion von DNA-Fragmenten.....	25
2.2.2.9 Ligation.....	26
2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion.....	26
2.2.2.11 Gerichtete Mutagenese.....	27
2.2.2.12 „Adaptor Annealing“.....	27
2.2.2.13 "Screening"-PCR.....	28
2.2.2.14 Sequenzierung.....	29
2.2.3 Standard-RNA-Techniken.....	29
2.2.3.1 <i>In vitro</i> Transkription.....	29
2.2.3.2 DNase-Verdau und Lithiumchlorid-Fällung.....	30
2.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA.....	31
2.2.3.4 RNA-Isolierung aus Zellen.....	31
2.2.3.5 Reverse Transkription (RT).....	31

2.2.4 Gewebekultur.....	33
2.2.4.1 Anzucht und Passagieren von Zellen.....	33
2.2.4.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen.....	33
2.2.4.3 Elektroporation von RNA.....	34
2.2.4.4 „Infectious center assay“.....	34
2.2.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz.....	35
2.2.4.6 Lokalisation des Endoplasmatischen Retikulums.....	36
2.2.4.7 Infektion von Zellen mit GFV.....	37
2.2.4.8 Titration.....	37
2.2.4.9 Lipofektion von Plasmid-DNA in Zellen.....	37
2.2.5 Proteinanalytische Methoden.....	38
2.2.5.1 Radioimmunpräzipitation.....	38
2.2.5.2 Deglykosylierung von Proteinen.....	40
2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.5.4 Western Blot.....	41
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>43</b>
3.1 Herstellung und Charakterisierung von GFV-NS2A "charged-to-alanine-scanning" Mutanten.....	43
3.1.1 Herstellung der GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten.....	43
3.1.2 Ermittlung der Phänotypen der GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten.....	46
3.1.3 Charakterisierung der replizierenden, nicht infektiösen NS2A-Mutanten.....	50
3.1.4 Untersuchung zur Temperatursensitivität der GFV-NS2A-Mutanten.....	53
3.1.5 Isolierung von Revertanten und Suche nach Varianten mit "second site" Mutationen.....	54
3.1.6 Untersuchung der "second site" Mutationen auf kompensierende Eigenschaften.....	55
3.1.7 Untersuchung der <i>trans</i> -Komplementation von nicht infektiösen aber replikationskompetenten GFV-NS2A-Mutanten.....	59
3.1.8 Analyse einer vermuteten zweiten Spaltstelle im NS2A.....	62

3.2 Untersuchung der Interaktion von NS2A und NS3 im T7-Vaccinia-Virus-System.....	65
3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide pGST-NS2A und pNS3.....	66
3.2.2 Analyse der Interaktion zwischen NS2A und NS3 mittels Koimmunpräzipitation.....	67
3.2.3 Einfluss von Mutationen im NS2A und NS3 auf die Interaktion der beiden Proteine.....	69
3.2.4 Ermittlung der für die Interaktion mit NS3 entscheidenden NS2A-Domäne.....	71
3.2.5 Herstellung von Konstrukten mit verkürzter NS2A-Sequenz.....	71
3.2.6 Koimmunpräzipitationsanalysen von NS3 und C-terminal verkürzten GST-NS2A Fusionsproteinen.....	74
3.2.7 Koimmunpräzipitationsanalysen von NS3 und N-terminal verkürzten NS2A-GST-Fusionsproteinen.....	76
3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Membrantopologie von NS2A.....	78
3.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von NS2A mittels IF.....	78
3.3.2 Herstellung der Expressionsplasmide pNS1-2A-Flag und pFlag-NS2A.....	78
3.3.3 Kolokalisationsstudien.....	80
3.3.4 Vergleich verschiedener Vorhersagen der NS2A-Topologie.....	81
3.3.5 Untersuchung der NS2A-Topologie durch Insertion von Glykosylierungsstellen.....	83
3.3.5.1 Einfügen von Glykosylierungsstellen in den GFV-Gesamtklon und dessen Expression.....	83
3.3.5.2 Herstellung der Expressionsplasmide mit Glykosylierungsloop.....	84
3.3.5.3 Expression der Glykosylierungsloop tragenden NS2A-Varianten im T7-Vaccinia-Virus-System.....	86

3.3.5.4 Nachweis der Glykosylierung durch Deglykosylierung mittels PNGaseF.....	88
3.3.5.5 Nachweis der Glykosylierung durch Vergleich von NS2A-Loop-Varianten mit und ohne Glykosylierungsstellen.....	89
3.3.6 Untersuchung der NS2A-Topologie mittels Insertion von HA-Tags und anschließender Immunfluoreszenzanalyse.....	91
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>94</b>
4.1 Charakterisierung von GFV-NS2A "charged-to-alanine-scanning" Mutanten und kompensierenden "second site" Mutanten.....	94
4.1.1 Charakterisierung der replizierenden, nicht infektiösen NS2A-Mutanten.....	98
4.1.2 <i>Trans</i> -Komplementation der NS2A-Defekte.....	99
4.1.3 Untersuchung von Spaltstellenmutanten.....	100
4.2 Untersuchung der Proteininteraktion zwischen NS2A und NS3 .....	102
4.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Membrantopologie von NS2A.....	105
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>114</b>
<b>6. Literatur.....</b>	<b>116</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>125</b>

**ABKÜRZUNGEN**

Abb.	Abbildung
ADE	"antibody dependent enhancement" (antikörperabhängige Infektionsverstärkung)
AK	Antikörper
APS	Amoniumperoxodisulfat
aqua dest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BHK	"baby hamster kidney"
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
BVDV	Bovines virales Diarrhöe-Virus
C	"Capsid" (Kapsid)
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CIP	"calf intestinal alkaline phosphatase"
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DEN	Dengue-Virus
DHBV	Duck Hepatitis B-Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E	Envelope
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	"enhanced green fluorescence protein"
ELISA	"enzyme linked immunosorbent assay"
EP	Elektroporation



---

ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
Fa.	Firma
FCS	"fetal calf serum" (Fötales Kälberserum)
FD	Farad
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
g	Gramm; bei x g: Vielfaches der Erdbeschleunigung
GF	Gelbfieber
GFV	Gelbfieber-Virus
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HA	Hemagglutinin
HCV	Hepatitis C-Virus
HIAF	"hyperimmune ascitic fluid"
HRP	"horseradish peroxidase"
ICA	"infectious center assay"
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IRES	"internal ribosome entry site"
k	Kilo
KSFV	Klassisches Schweine-Fieber-Virus
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
m	Milli
M	Mol
mAK	monoklonaler Antikörper
max.	maximal
MEM	"minimal essential medium"
min	Minute/n
moi	"multiplicity of infection" (Infektionsdosis)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

---

M-Protein	Membranprotein
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
NS	Nichtstrukturprotein
N-Terminus	Aminoterminus
NTP	Nukleotidtriphosphat
NTR	Nicht translatierte Region
OD	Optische Dichte
ORF	"open reading frame" (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	"phosphate buffered saline"
PCR	"Polymerase Chain Reaction" (Polymerasekettenreaktion)
PFU	"plaque forming units" (Plaque bildende Einheiten)
pH	potentia hydrogenii (Konzentration des Wasserstoffs)
PNK	Polynukleotidkinase
PO	Peroxidase
PPO	2,5-Diphenyloxazol
RdRp	"RNA dependent RNA polymerase"
RNA	Ribonukleinsäure
prM	Vorläuferprotein von M
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN	Sindbis-Virus
spez. Infekt.	spezifische Infektiosität
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
Temp.	Temperatur
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur von Primern
TMD	Transmembrandomäne
TEMED	N, N, N', N',-Trismethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
ZPE	zytopathischer Effekt

Aminosäuren (Einbuchstabencode)

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Flaviviridae

Das Gelbfieber-Virus (GFV) gehört innerhalb des Genus *Flavivirus* zur Familie der *Flaviviridae*. Zur selben Familie zählen auch die Pestiviren und das Hepatitis-C-Virus (HCV). Diese drei Genera ähneln sich jeweils in Morphologie, Genomorganisation und Replikationsstrategie. Einige charakteristische Beispiele werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Vertreter der Familie *Flaviviridae*, deren Vektoren und Hauptwirte (Burke & Monath, 2001).

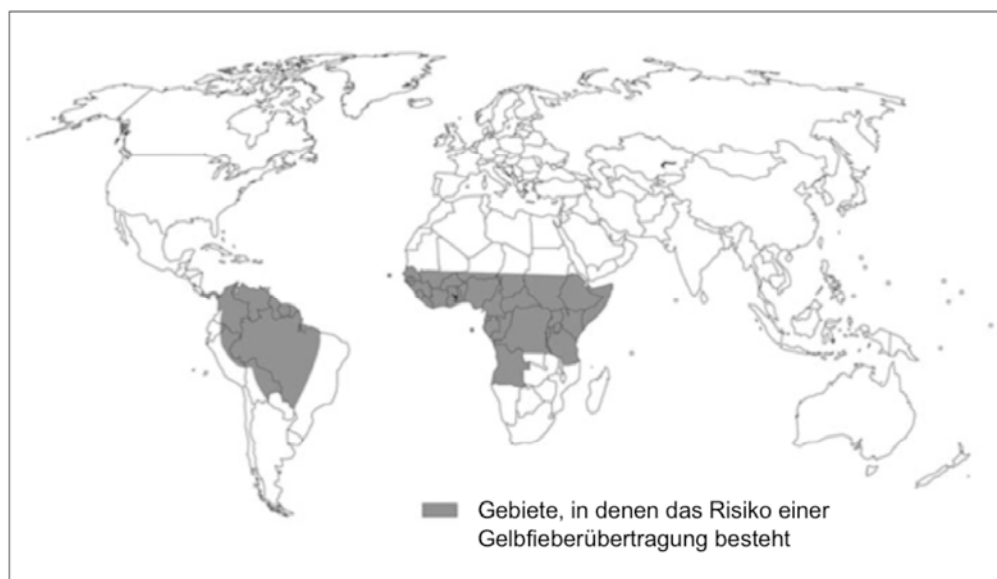
Genus	Virus	Vektor	Hauptwirt
Flavi-virus	Dengue-Virus Typ 1-2	Moskito	DEN1+2: Mensch und Affe
	Dengue-Virus Typ 3-4	Moskito	DEN3+4: Mensch
	Frühsommer-Meningo-Enzephalitis-Virus	Zecke	Nager und Vogel
	Gelbfieber-Virus	Moskito	Affe
	Japanisches Enzephalitis-Virus	Moskito	Vogel und Schwein
	Kunjin-Virus	Moskito	Vogel
	St. Louis Enzephalitis-Virus	Moskito	Vogel
	West-Nil-Virus	Moskito	Vogel
Pesti-virus	"Border Disease-Virus"	-	Schaf
	Bovines virales Diarrhöe-Virus	-	Rind
	Klassisches Schweine-Fieber-Virus	-	Schwein
HCV	Hepatitis-C-Virus	-	Mensch

### 1.1.1 Genus *Flavivirus*

Bis heute sind fast 80 dem Genus *Flavivirus* (von lateinisch *flavus* = gelb) angehörende Viren bekannt. Bei den meisten handelt es sich um *Arboviren* ("*arthropod-borne viruses*"), da sie typischerweise durch Moskitos oder Zecken auf Vertebraten übertragen werden. Beim Menschen rufen sie häufig schwere Krankheiten mit hohen Sterblichkeitsraten hervor (Lindenbach & Rice, 2001). Gegen das GFV, den Prototypen der Flaviviren, ist zwar ein effektiver Impfstoff vorhanden, dennoch traten auch während der letzten beiden Jahrzehnte immer wieder Epidemien auf. Die Krankheit Gelbfieber (GF) stellt also ein bleibendes und ernst zu nehmendes, globales Gesundheitsproblem dar (WHO, unbekannter Autor, 2001).

Ende des 17. Jahrhunderts erkannten Finlay (1881) und Reed (1901), dass die Krankheit GF durch ein filtrierbares Agens hervorgerufen und durch Moskitos auf Menschen übertragen wird. Im Jahre 1927 konnten französische und amerikanische Wissenschaftler in Afrika die beiden Wildtypstämme "French viscerotropic" (Mathis et al., 1928) und "Asibi" (Stokes et al., 1928) isolieren, woraus während der 30er Jahre die attenuierten Lebend-Impfstämme

"French neurotropic" (Nicolle & Laigret, 1935) und "17D" (Theiler & Smith, 1937) entwickelt wurden. Bis heute ist die Krankheit GF nur im tropischen Südamerika und in Afrika südlich der Sahara verbreitet (Abb. 1). Schätzungsweise treten 200.000 Fälle mit 30.000 Toten pro Jahr auf, über 90% davon in Westafrika (WHO, unbekannter Autor, 2001). Aus bisher ungeklärten Gründen kommt GF in Asien nicht vor, obwohl die asiatischen Stämme von *Aedes aegypti* das GFV übertragen könnten (Barrett & Monath, 2003).



**Abbildung 1: Verbreitung des GFV (Steffen & Connor, 2005)**

Durch den Stich einer infizierten Mücke wird das Virus zusammen mit Speichel durch den Saugrüssel in die Blutbahn des Wirtes injiziert. Über infizierte Makrophagen und Monozyten gelangt das Virus zum Lymphknoten, wo es sich vermehrt. Nach einer Inkubationszeit von drei bis sechs Tagen beginnt das klinische Bild eines biphasischen, schweren Verlaufs abrupt mit hohem Fieber (bis 40°C), Kopf-, Gliederschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Einer Besserung am dritten bis vierten Tag folgt bei der Mehrzahl der Erkrankten (80-90%) die Heilungsphase. Bei ungünstigem Verlauf leitet ein erneuter Fieberanstieg die zweite Phase (Intoxikation) ein, die mit Leber- und Nierenschädigung, Gelbsucht, Erbrechen und Hämorrhagien einhergeht und in etwa 80% der Fälle in der zweiten Woche zum Tod führt. Während dieser Phase werden die Makrophagen in der Leber (Kupffer'sche Sternzellen) befallen und durch die Virusvermehrung zerstört. Die Lebernekrose führt zum Funktionsverlust des Organs, wodurch sich die Haut des Patienten gelb färbt (Barrett & Monath, 2003). Außerdem hat die Zerstörung der Leberzellen eine verringerte Bildung an Blutgerinnungsfaktoren zur Folge, was zu Hämorrhagien führen kann. In seltenen Fällen kann

das Virus durch die Kupfferschen Sternzellen in das Gehirn gelangen, wo es eine Enzephalitis hervorrufen kann (Barrett & Monath, 2003). GF ist melde- und quarantänepflichtig (Holzmann & Heinz, 2002).

Da die initialen klinischen Symptome von GF denen von mehreren anderen tropischen Krankheiten ähneln, ist es besonders im frühen Stadium schwierig, GF als solches zu diagnostizieren. Hierfür stehen in der ersten Erkrankungsphase der Virusnukleinsäurenachweis aus dem Blut mittels PCR (sensitivste Methode), die Direkthybridisierung oder die Virusisolierung zur Verfügung. Erst fünf bis sieben Tage nach Beginn der Symptome können IgM- und IgG-Antikörper gegen die Envelope- (E-) und Membran- (M-) Proteine in ELISA-, Immunfluoreszenz-, Hämagglutinationshemm- und Virusneutralisationstests nachgewiesen werden (Holzmann & Heinz, 2002). Eine effektive Therapie gegen die bereits ausgebrochene Krankheit GF gibt es nicht, allerdings steht mit dem Impfstamm 17D eine weitgehend sichere, effektive, attenuierte Lebendvakzine zur Verfügung. Schwere Nebenwirkungen sind sehr selten (Holzmann & Heinz, 2002).

### **1.1.2 Genus *Pestivirus***

Das Genus *Pestivirus* umfasst drei serologisch verwandte Tierpathogene: Das "Border-Disease-Virus" der Schafe, das Bovine virale Diarrhoe-Virus (BVDV) und das Klassische Schweine-Fieber-Virus (KSFV). Pestiviren sind weitverbreitet und ein ernstzunehmendes ökonomisches Problem für die Viehzucht. Die Übertragung erfolgt durch direkten oder indirekten Kontakt, häufig auch durch diaplazentare und kongenitale Übertragung. Klinische Erscheinungsbilder variieren und reichen von inapparenten oder milden Symptomen über Diarrhoe und Fieber bis hin zu Hämorrhagien und dem Tod. Impfstoffe sind nur gegen BVDV und KSFV vorhanden (Lindenbach & Rice, 2001).

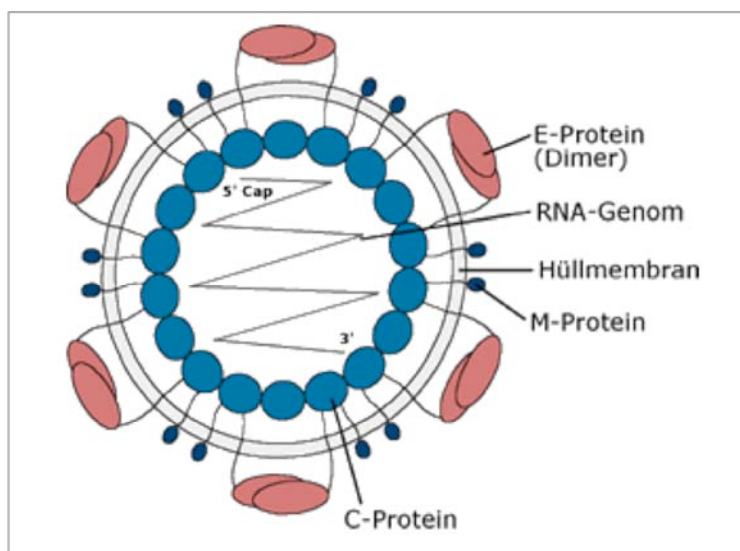
### **1.1.3 Genus *Hepacivirus***

HCV ist der einzige Vertreter des Genus *Hepacivirus*, wird über Blut übertragen und führt bei Infektion zu akuter, meistens aber zu chronischer Hepatitis. Leberzirrhose und Leberzellkarzinome können als Folgeerkrankungen auftreten. Weltweit sind ca. 170 Mio. Menschen mit HCV infiziert, wobei die Durchseuchungsraten stark variieren (Ägypten 24%, USA und Europa < 1%). Weder besteht ein immunologischer Schutz bei bereits bestehender oder überwundener HCV-Infektion, noch existiert ein Impfstoff oder eine effektive

Behandlungsmethode. Durch die kombinierte Gabe von Interferon- $\alpha$  und Ribavirin werden oft nur geringe Effekte erzielt (Roggendorf, 2002).

## 1.2 Morphologie der Flaviviren

Flaviviruspartikel haben eine sphärische Form mit einem Durchmesser von ca. 50 nm. Wie in Abbildung 2 zu sehen, wird der einzelne RNA-Strang mit positiver Polarität vom Kapsid ("Capsid" = C) umgeben. Letzteres wird von der Hüllmembran, einer Lipiddoppelschicht, die aus der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) der Wirtszelle stammt, umschlossen. In diese sind die M-Proteine und die als Dimere vorliegenden E-Proteine eingelagert (Modrow & Falke, 1997).

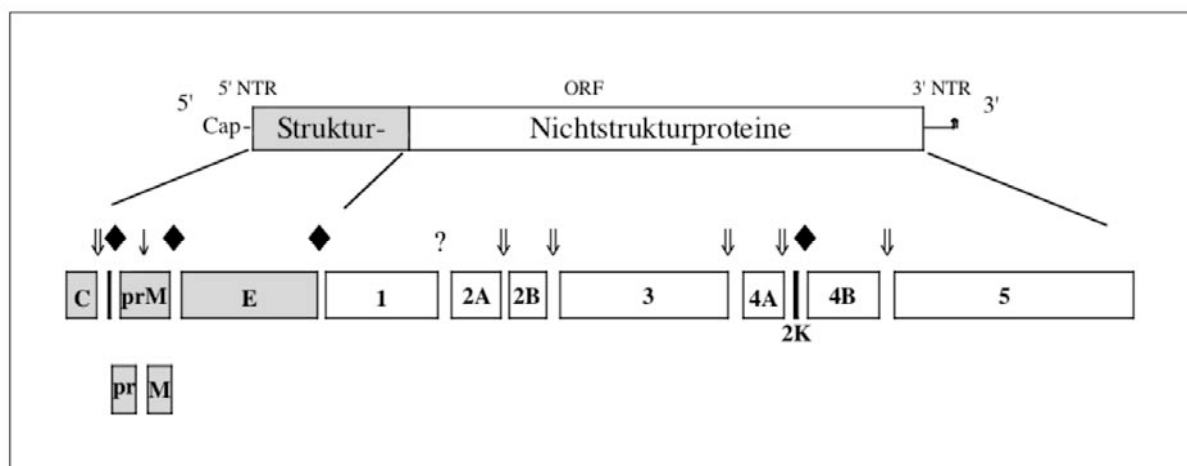


**Abbildung 2: Aufbau eines Flaviviruspartikels (Modrow & Falke, 1997).** C = Capsid, E = Envelope, M = Membran.

## 1.3 Genomaufbau der Flaviviren

Das Genom der Flaviviren besteht aus einzelsträngiger, positiv orientierter RNA mit einer Länge von ca. 11 Kilobasen. Die RNA besitzt einen einzelnen, langen Leserahmen ("open reading frame" = ORF), von dem aus ein Polyprotein synthetisiert wird, welches ko- und posttranslational prozessiert wird (siehe Abb. 3). Am 5'-Ende weist die RNA der Flaviviren eine Capstruktur ( $m^7G5'ppp5'A$ ) zur Initiation der Proteinsynthese auf. Sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende wird der Leserahmen von nichttranslatierten Nukleotidfolgen ("non-translated regions" = NTR) flankiert. Diese Regionen enthalten konservierte Sequenzen, aus denen vermutlich RNA-Strukturen gebildet werden. Letztere könnten an der Regulation wichtiger Prozesse wie der Genomamplifikation, Translation oder der Virusverpackung

beteiligt sein (Hahn et al., 1987; Proutski et al., 1997). Vergleicht man die Sequenz der 5'-NTR verschiedener Flaviviren, so erkennt man nur wenig Übereinstimmung. Allerdings scheinen bei allen Flaviviren ähnliche sekundäre Strukturelemente in diesem Bereich vorhanden zu sein, die die Translation des Genoms beeinflussen (Hahn et al., 1987; Brinton & Dispoto, 1988; Cahour et al., 1995). Bei von Moskitos übertragenen Flaviviren enthält der konservierte Abschnitt des 3'-NTR zwei Konsensussequenzen. Eine davon ist komplementär zu einer konservierten Region im 5'-NTR, woraus die Möglichkeit einer Zyklisierung des Flavivirusgenoms entsteht (Hahn et al., 1987; Alvarez et al., 2005). Außerdem erwartet man auf Grund von Computervorhersagen über die RNA-Faltung eine 90-120 nukleotidgroße Haarnadelstruktur am 3'-Terminus aller Flavivirengenome. Diese Struktur spielt wahrscheinlich eine funktionelle Rolle bei der viralen RNA-Replikation (Brinton et al., 1986; Wengler & Castle, 1986; Hahn et al., 1987). Zwischen den beiden NTRs liegen die für die Struktur- und Nichtstrukturproteine kodierenden Bereiche (Abb. 3).



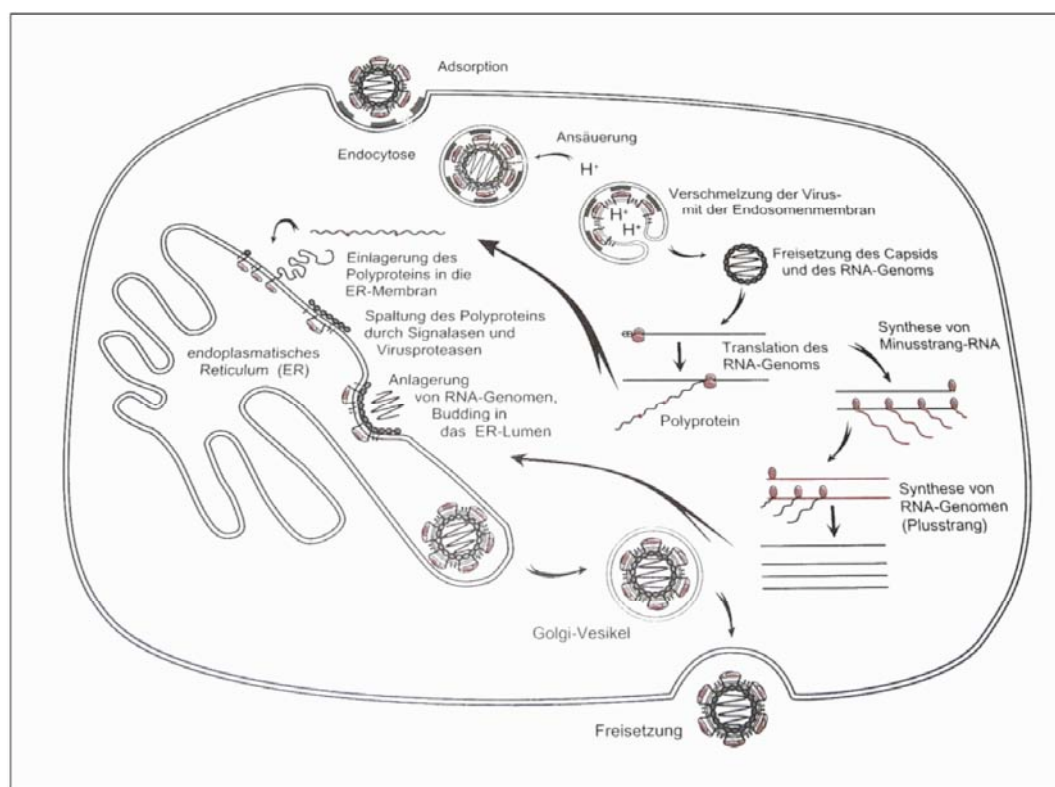
**Abbildung 3: Genomorganisation der Flaviviren.** Im oberen Bildabschnitt ist die für das Polyprotein kodierende RNA als Balken dargestellt. Darunter sind die nach Translation und Prozessierung entstandenen GFV-Proteine gezeigt, wobei jeweils die Angriffsstellen der viralen Serinproteinasen (⇓), Wirtszell-Signalasen (◆), Furin (↓) und unbekannter Proteinase (?) gekennzeichnet sind (Kümmerer & Rice, 2001).

### 1.4 Lebenszyklus der Flaviviren

Für die meisten Flaviviren sind die zellulären Rezeptoren nicht bekannt. Wie in Abbildung 4 dargestellt, docken die Viren wahrscheinlich durch eine Interaktion zwischen dem viralen E-Protein und einem oder mehreren Rezeptoren an die Wirtszellwand an (Hung et al., 1999), wonach das Virus durch Endozytose in die Zelle aufgenommen werden kann. Anschließend verschmelzen bei saurem pH-Wert virale und endosomale Membran, sodass das Kapsid ins Zytoplasma gelangt (Heinz & Allison, 2001). Über die Mechanismen der

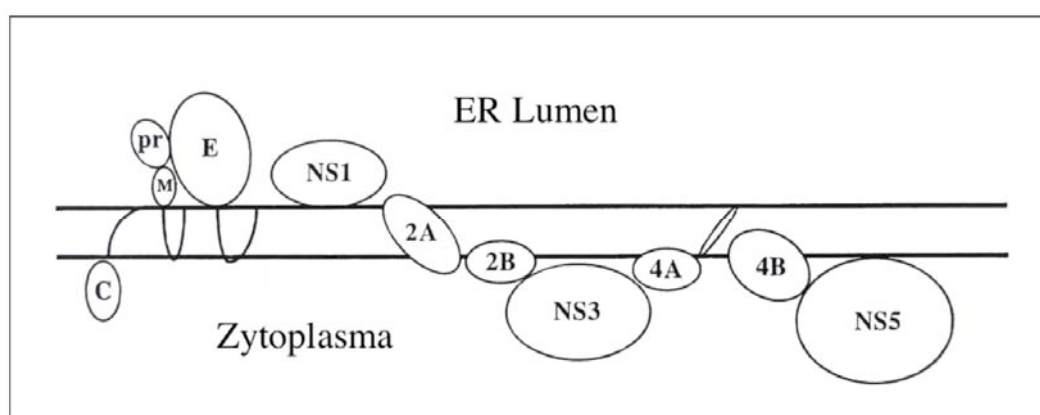


Nukleinsäurefreisetzung ist wenig bekannt. Ein Rezeptor des West-Nil-Virus konnte 2004 durch Chu & Ng identifiziert werden. Hier vermittelt  $\alpha_v\beta_3$ -Integrin den Viruseintritt in die Zelle. Für das Dengue-Virus wurde ein zusätzlicher Bindungsmechanismus *in vitro* beschrieben. Die sogenannte antikörperabhängige Infektionsverstärkung (= "antibody dependent enhancement", ADE) (Halstead & O'Rourke, 1977; Peiris & Porterfield, 1979; Schlesinger & Brandriss, 1983; Phillpotts et al., 1985) ist von der Anwesenheit subneutralisierender Konzentrationen virustypspezifischer Antikörper abhängig. Letztere binden an die Partikeloberfläche, sodass über den F<sub>c</sub>-Teil der Immunglobuline die Interaktion mit F<sub>c</sub>-Rezeptoren auf Makrophagen und Monozyten vermittelt und die Virusaufnahme verstärkt eingeleitet werden kann (Peiris & Porterfield, 1979; Schlesinger & Brandriss, 1983). Es wird angenommen, dass dieser Mechanismus auch *in vivo* vorkommt und für die verstärkte Pathogenese bei Zweitinfektionen durch andere DEN-Serotypen verantwortlich sein könnte (Rothman & Ennis, 1999).



**Abbildung 4: Infektionsablauf.** Nach Adsorption wird das Virus von der Zelle durch Endozytose aufgenommen. Ein erniedrigter pH-Wert im Endosomeninneren führt zur Verschmelzung von Virus- und Endosomenmembran, sodass das Capsid in das Zytoplasma entlassen wird. Durch Signalasen und Proteasen erfolgt die Prozessierung des Polyproteins, bei der unter anderem die RNA-abhängige RNA-Polymerase entsteht. Diese ist der wichtigste Bestandteil eines Replikasekomplexes, der das virale Plusstranggenom in einen RNA-Negativstrang umschreibt. Dieser dient wiederum als Matrize für die Synthese neuer Virusgenome. Letztere lagern sich in der ER-Membran an und werden, von Capsid-Proteinen umgeben, in das ER-Lumen ausgestülpt. Die so entstandenen Viruspartikel werden über die Golgi-Vesikel zur Zelloberfläche transportiert und freigesetzt (Modrow & Falke, 1997).

Um die Translation zu initiieren, binden die zellulären Ribosomenuntereinheiten an die Capstruktur am 5'-Ende des Genoms. Das Genom der Flaviviren wird dann als ein großes, zusammenhängendes Polyprotein translatiert. Die wachsende Aminosäure- (AS-) Kette wird durch die Membran des ER geschleust, wobei die Transmembrandomänen in den prM- und E-Proteinen das Polyprotein kotranslational in der Lipidschicht verankern. Abbildung 5 zeigt die Membrantopologie der flaviviralen Proteine, deren Vorhersage auf der Hydrophobität der viralen Proteine basiert. Dieses Modell wird durch experimentelle Daten gestützt (Wengler et al., 1990; Cauchi et al., 1991), auch wenn die transmembranen Regionen noch nicht endgültig definiert werden konnten.



**Abbildung 5: Membrantopologie der flaviviralen Proteine.** Die Abbildung zeigt die von Lindenbach & Rice (2001) vorgeschlagene Orientierung der Proteine nach der Prozessierung des flaviviralen Polyproteins.

Das Vorläuferprotein wird durch zelluläre Proteasen und eine viral kodierte Serinprotease ko- und posttranslational gespalten, um die einzelnen viralen Proteine freizusetzen. Die Reihenfolge der Prozessierungsprodukte ist wie folgt (siehe auch Abb. 3):  $\text{NH}_2\text{-C-(pr)M-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5-COOH}$  (Rice et al., 1985). Fast sämtliche Spaltungen im Strukturproteinabschnitt erfolgen durch die Signalpeptidase der Wirtszelle. Es gibt zwei Ausnahmen: Erstens die kurz vor der Freigabe des Virus stattfindende Spaltung von prM in pr und M durch das zelluläre Enzym Furin und zweitens die Spaltung, die den C-Terminus des Kapsid-Proteins durch die viral kodierte Serinprotease erzeugt. Letztere ist außerdem für die Entstehung der N-Termini der Nichtstrukturproteine NS2B, NS3, NS4A, 2K und NS5 verantwortlich. Der N-Terminus des NS4B-Proteins entsteht durch die Signalpeptidase der Wirtszelle. Das für die Spaltung von NS1/2A verantwortliche Enzym ist bisher noch unbekannt. Offensichtlich agiert es aber im ER-Lumen (Lindenbach & Rice, 2001). Auch die anschließenden Replikationsschritte laufen an der ER-Membran ab.

Die RNA-abhängige RNA-Polymerase des NS5-Proteins katalysiert im Zytoplasma das Umschreiben vom Positiv- in den Negativstrang. Letzterer dient als Matrize für die Bildung von neuen Plussträngen. Diese werden als genomische RNA aber auch als mRNA für die Synthese weiterer Virusproteine eingesetzt (Trent & Naeve, 1980; Brinton, 1986). Das 5'-Ende der Positivstränge muss mit einer Capstruktur versehen werden. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist unbekannt, man vermutet aber eine Beteiligung der Methyltransferaseaktivität des NS5-Proteins (Koonin, 1993).

Die Morphogenese zu Virionen erfolgt schließlich an der Membran des ER (siehe Abb. 4). Im Verlauf der Translation werden die prM, E- und "anchored" C-Komponenten in die ER-Membran eingelagert, wodurch sich Regionen mit hohen Konzentrationen an viralen Proteinen bilden. Hier interagiert das stark basische C-Protein mit der viralen genomischen RNA und dem E-Protein. Schließlich stülpt sich die Membran in das ER-Lumen aus und schnürt den sogenannten "initialen Budding-Komplex" ab. Dieser wird durch den Golgi-Apparat befördert (Modrow & Falke, 1997), wo prM und bei einigen Viren die E-Proteine glykosyliert werden (Mason, 1989; Nowak et al., 1989; Chambers et al., 1990b). Außerdem erfolgt kurz vor der Entlassung durch zelluläres Furin die Spaltung von prM zu pr und M. Es wird vermutet, dass das prM-Protein im prM-E-Heterodimer das E-Protein der unreifen Virionen vor einer säurekatalysierten Konformationsänderung bewahrt, während das säurehaltige, intrazelluläre Kompartiment durchlaufen wird (Guirakhoo et al., 1992; Heinz et al., 1994). Sobald der pr-Teil vom M-Abschnitt abgespalten ist, wird die E-prM-Interaktion destabilisiert (Wengler & Wengler, 1989) und das reife Virus freigelassen. Dabei fusionieren die Golgi-Vesikel mit der Zytoplasmamembran und setzen ihren Inhalt an der Zelloberfläche frei.

### **1.5 Flavivirale Strukturproteine**

Das C-Protein ist ein kleines (ca. 11 kDa), stark basisches Protein (Boege et al., 1983; Rice et al., 1985), das die strukturelle Komponente des Nukleokapsids bildet. An den beiden Termini des C-Proteins häufen sich basische Reste, die wahrscheinlich eine spezifische Bindung von genomischer RNA und damit eine Bildung eines Ribonukleoproteinkomplexes ermöglichen (Khromykh & Westaway, 1997). In der Mitte des C-Proteins befindet sich eine hydrophobe Domäne, die mit zellulären Membranen interagiert und eventuell eine Rolle bei der Zusammensetzung der Viruspartikel spielt (Markoff et al., 1997). Das noch unreife C-Protein

(anchC) enthält eine C-terminale hydrophobe Domäne (Nowak et al., 1989), die als Signalsequenz für die Translokation von prM in das Lumen des ER agiert.

Das prM-Protein ist der ca. 26 kDa große, glykosylierte Vorläufer des sehr kleinen, in die Virusmembran verankerten M-Proteins (8 kDa). Erst spät in der Virusreifung spaltet das Enzym Furin (Stadler et al., 1997) während der Passage durch den Golgi-Apparat das Vorläuferprotein in das Strukturprotein M und das N-terminale pr-Segment. Letzteres wird in das extrazelluläre Medium sekretiert (Murray et al., 1993) und ist überwiegend hydrophil. In reifen Virionen ist das Strukturprotein M enthalten. Es ist durch eine kurze Ektodomäne und zwei darauf folgende, potentiell membrandurchspannende Domänen charakterisiert. Antikörper gegen prM können wahrscheinlich durch Neutralisation der freigelassenen Virionen, die auch noch ungespaltenes prM enthalten, Immunität erzeugen (Kaufmann et al., 1989).

Neben dem M-Protein ist auch das E-Protein in der Virushüllmembran verankert. Im Vergleich zu anderen viralen Oberflächenproteinen besitzt das E-Protein einen ungewöhnlichen Aufbau. Es liegt als Dimer vor, ist über eine transmembrane Domäne im C-terminalen Bereich mit der Membran verankert und liegt ihr flach auf. Die Ektodomäne enthält mutmaßliche Rezeptorbindungsstellen (Rey et al., 1995; Chen et al., 1997), eine potentielle fusogene Domäne (Rey et al., 1995) und Kontaktstellen für die Homodimerbildung (Rey et al., 1995). Im Verlauf der Infektion werden gegen das E-Protein virusneutralisierende Antikörper induziert, die vor einer Neuinfektion mit dem gleichen Virustyp schützen.

### **1.6 Flavivirale Nichtstrukturproteine (NS)**

Das NS1-Protein (46 kDa) der Flaviviren liegt intrazellulär, an die Zelloberfläche gebunden oder extrazellulär vor. Es ist glykosyliert und enthält 12 hochkonservierte Cysteinreste, die intrazellulär Disulfidbrücken bilden (Smith & Wright, 1985; Lee et al., 1989; Mason, 1989). Während das membranassoziierte NS1 als Homodimer vorliegt, bildet die sezernierte Form ein Hexamer (Smith & Wright, 1985; Mason, 1989; Post et al., 1991). Säugerzellen sekretieren das NS1-Protein, Moskitozellen dagegen nicht (Winkler et al., 1988; Mason, 1989; Post et al., 1991). NS1-spezifische Antikörper scheinen bei einigen Flaviviren die antikörpervermittelte Lyse der infizierten Zellen einzuleiten (Schlesinger et al., 1986;

Falgout et al., 1990; Jacobs et al., 1992). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NS1 eine Rolle bei der RNA-Replikation spielt (Lindenbach & Rice, 1997).

Wie bereits erwähnt, spaltet die flavivirale Serinprotease zwischen den beiden Nichtstrukturproteine NS2A (22 kDa) und NS2B (14 kDa). Ist die NS2A/2B-Spaltstelle des GFV durch Mutation blockiert, kann keine Replikation mehr stattfinden (Nestorowicz et al., 1994). Die Funktionen des hydrophoben, wahrscheinlich membrandurchspannenden NS2A-Proteins sind weitestgehend unbekannt. Offensichtlich unterdrückt es die Interferon- $\beta$  abhängige Transkription, wie für Kunjin- (KUN-) NS2A gezeigt werden konnte (Liu et al., 2004). Studien an West Nil-Virus (WNV) unterstützen den Befund, dass flavivirales NS2A eine Rolle bei der Hemmung der zellulären Interferonantwort spielt. Es konnte eine Mutation im WN-NS2A gefunden werden, die die Fähigkeit von NS2A, die IFN $\alpha/\beta$  Induktion zu hemmen, unterbindet (Liu et al., 2006). Da das NS2A-Protein des KUN-Virus sowohl an die Nichtstrukturproteine NS3 und NS5 als auch an RNA-Transkripte des 3'-NTR bindet (Mackenzie et al., 1998), wird hieraus eine RNA-Rekrutierungsfunktion des NS2A-Proteins abgeleitet. Neben der Beteiligung am Replikationsprozess scheint GFV-NS2A auch eine Rolle bei Bildung bzw. Freisetzung infektiöser Partikel zu spielen (Kümmerer & Rice, 2002). Innerhalb des GFV-NS2A-Proteins wurde eine zusätzliche Spaltstelle der viralen Protease gefunden. Durch Prozessierung an dieser Position entsteht eine am C-Terminus um 2 kDa verkürzte Form des NS2A-Proteins (Chambers et al., 1989; Nestorowicz et al., 1994). Das membranassoziierte NS2B-Protein besitzt eine konservierte hydrophile Region, die von zwei hydrophoben Domänen umgeben wird (Rice et al., 1985). NS2B ist ein essentieller Kofaktor der NS3-Serinprotease (Chambers et al., 1991; Arias et al., 1993; Chambers et al., 1993).

NS3 ist ein ca. 70 kDa großes Protein, das verschiedene enzymatische Aktivitäten besitzt. Es ist sowohl an der Prozessierung des Polyproteins als auch an der RNA-Replikation beteiligt. Über eine Interaktion mit NS2B kann NS3 an Membranen assoziieren (Arias et al., 1993; Chambers et al., 1993). Das N-terminale Drittel des NS3-Proteins entspricht einer trypsinähnlichen Serinprotease (Bazan & Fletterick, 1989; Gorbalenya et al., 1989a), die zusammen mit NS2B das Polyprotein an verschiedenen Stellen spaltet (siehe Abb. 3). Der carboxyterminale Teil des NS3 kodiert für eine RNA-Helikase (Gorbalenya et al., 1989b), die durch Hydrolyse von NTP Energie zur Entwindung von RNA freisetzt (Kadare & Haenni, 1997). Neben der NTPase-Aktivität verfügt dieser NS3-Teil außerdem über eine

RNA-Triphosphataseaktivität (Wengler & Wengler, 1993), die wahrscheinlich für die Modifizierung des 5'-Ende des Genoms verantwortlich ist, um letzteres auf das Anfügen der Capstruktur durch eine Guanyltransferase vorzubereiten.

NS4A und NS4B sind relativ kleine (ca. 16 bzw. 27 kDa), hydrophobe, membranassoziierte Proteine (Lin et al, 1993; Westaway et al., 1997; Mackenzie et al., 1998) mit unbekannter Funktion. Da NS4A subzellulär im Zytoplasma verteilt ist (Mackenzie et al., 1998) und mit NS1 interagiert (Lindenbach & Rice, 1999), könnte es bei der RNA-Replikation eine Rolle spielen. Eventuell verankert NS4A die Komponenten der Replikase in den zellulären Membranen. Das carboxyterminale Ende des NS4A enthält eine transmembrane Domäne, die das NS4B in das ER überführt. NS4B findet sich ebenfalls an den potentiellen RNA-Replikationsstellen. Es durchspannt aber auch die ER-Membran (Miller et al., 2006) und dringt möglicherweise bis zum Nukleus vor (Westaway et al., 1997). Aus unbekanntem Gründen wird NS4B posttranslational zu einer um 2 kDa kleineren Form modifiziert (Chambers et al., 1990b; Preugschat & Strauss, 1991).

Mit ca. 103 kDa ist NS5 das größte Protein der Flaviviren; gleichzeitig ist es auch das am stärksten konservierte. Es verfügt über RNA-abhängige RNA-Polymeraseaktivität und besitzt AS-Bereiche, die den entsprechenden AS-Sequenzen anderer Plusstrang-RNA-Viren homolog sind (Rice et al., 1985). Außerdem liegt im aminoterminalen Bereich des NS5 eine für Methyltransferase kodierende Sequenz, die bei dem Cappingprozess benötigt wird. Wahrscheinlich methyliert dieses Enzym die 5'-RNA-Capstruktur (Koonin, 1993). NS5 kann durch eine unbekannte, zelluläre Serin/Threonin-Kinase phosphoryliert werden (Kapoor et al., 1995; Morozova et al., 1997; Reed et al., 1998), wobei unklar ist, wozu dieser Prozess dient. Die Phosphorylierung könnte die Interaktion von NS5 und NS3 regulieren (Kapoor et al., 1995) oder für eine Neuverteilung von NS5 im Zellkern verantwortlich sein (Kapoor et al., 1995; Forwood et al., 1999).

### **1.7 Zielsetzung**

Im Gegensatz zu anderen flaviviralen Proteinen ist bezüglich der Funktionen und Eigenschaften des Nichtstrukturproteins NS2A bisher relativ wenig bekannt. In einer vorangegangenen Arbeit konnte gezeigt werden, dass GFV-NS2A offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Partikelbildung bzw. -Freisetzung spielt (Kümmerer & Rice, 2002). Nach gezielter Mutation einer bestimmten AS im C-terminalen Bereich des NS2A konnten

keine infektiösen Partikel mehr gebildet werden, während die Replikation und die Freisetzung subviraler Partikel weiterhin erfolgte. Der Defekt einer weiteren NS2A-Mutante konnte durch Ausbildung einer "second site" Mutation im NS3 kompensiert werden, was eine Interaktion der beiden Proteine NS2A und NS3 vermuten lässt.

In dieser Arbeit sollten Funktionen und Eigenschaften des Nichtstrukturproteins NS2A näher charakterisiert werden. Zunächst war von Interesse, ob auch andere, noch nicht untersuchte NS2A-Bereiche eine Rolle bei der Bildung bzw. Freisetzung infektiöser Partikel spielen. Dies sollte mit Hilfe eines sogenannten "charged-to-alanine-scannings" untersucht werden. Ein weiteres Ziel war, mögliche virale Interaktionspartner des NS2A zu identifizieren. Gegenstand weiterer Untersuchungen sollte zudem die subzelluläre Lokalisation und Membrantopologie des NS2A-Proteins sein.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Bakterien**

Zur Anzucht der gewünschten Plasmide dienten *Escherichia coli* MC1061 (ATCC #53338) als Wirtsbakterien.

#### **2.1.2 Plasmide**

Jegliche unter 3.1 aufgeführten Gelbfieber-Virus (GFV) Mutanten basieren auf dem cDNA-Gesamtklon **pACNR/FLYF17Dx** (Bredenbeek et al. 2003). Die cDNA des GFV-Impfstammes 17D (Theiler & Smith, 1937) steht unter der Kontrolle eines SP6-Promotors; das "low-copy" Plasmid enthält ein Ampicillin-Resistenzgen.

Das Plasmid **pNS2-3** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Kümmerer), das die NS2-3-Region des cDNA-Gesamtklons pACNR/FLYF17Dx enthält (Kümmerer & Rice, 2002), wurde als DNA-Matrize zur gerichteten Mutagenese (siehe 2.2.2.11) eingesetzt. Die dabei entstandenen, erwünschten Mutationen wurden anschließend in die DNA des GFV-Gesamtklons eingefügt.

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten wurde der Vektor **pCITE<sup>®</sup>-2a(+)** (Fa. Novagen) verwendet. Dieser wurde auch zur Expression im T7-Vaccinia-Virus-System eingesetzt. Hierbei werden einklonierte Sequenzen in Säugerzellen *in vitro* translatiert. Bei pCITE<sup>®</sup>-2a(+) handelt es sich um ein "high-copy" Plasmid, das neben dem Ampicillin-Resistenzgen eine T7-Promotorsequenz trägt. Auf letztere folgt eine IRES ("internal ribosome entry site"), die die Effizienz der *in vitro* Translation enorm steigert (Elroy-Stein, 1989).

Um Transfektionseffizienzen abschätzen zu können, wurde das Plasmid **pTM-EGFP** (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Meike Haß) eingesetzt. Dieses enthält das in den Vektor pTM1 (Fuerst et al., 1986) einklonierte Gen des verstärkten grün fluoreszierenden Proteins ("enhanced green fluorescence protein" = EGFP) des Plasmids pEGFP-C1 (Fa. Clontech) unter Kontrolle eines T7-Promotors.

Das Plasmid **pSINrep19/NS1-2A** (Lindenbach & Rice, 1997) basiert auf dem nicht-zytopathogenen Sindbis-Virus (SIN) Expressionssystem (Agapov et al., 1998). Hierbei handelt es sich um rekombinante, selbst replizierende SIN RNA, die zwei subgenomische mRNAs herstellt. Eingefügte Genabschnitte stehen unter einem subgenomischen Promotor,



ein zweiter Promotor reguliert die Expression des *pac*-Gens, das für die Puromycin *N*-acetyltransferase kodiert.

Das Konstrukt **pFlag-VP30** wurde freundlicherweise von Dr. B. Kümmerer zur Verfügung gestellt. In den Vektor pCITE<sup>®</sup>-2a(+) wurde die Sequenz des Flag-Tags, gefolgt von dem VP30-Gen des Ebola-Virus inkloniert.

Das Plasmid pGST (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Kümmerer) enthält die für GST (Glutathion-S-Transferase) kodierende Sequenz im Vektor pCITE<sup>®</sup>-2a(+).

### 2.1.3 Synthetische Oligonukleotide

Die in den folgenden Tabellen aufgeführten Primer wurden bei der Fa. Sigma-Genosys, Steinheim synthetisiert.

**Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Primer (Fortsetzung siehe Seiten 15-17).** <sup>1</sup> Unterstrichene Nukleotide entsprechen nicht der eingesetzten Matrizensequenz. <sup>2</sup> Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Sequenzen der Matrizen-DNA. <sup>3</sup> Polarität der Primer: + kodierender Strang; - nicht kodierender Strang.

Primer #	Mutation / Klon	Primersequenz <sup>1</sup>	Position <sup>2</sup>	Pol. <sup>3</sup>
<b>BNI 1</b>	D50A-K53A	5'-GTAACCTCCTTGC <sup>1</sup> TTTGCTGG <sup>2</sup> CACTCACAGTGGCTG-3'	GFV: 3644-3680	+
<b>BNI 2</b>	D50A-K53A	5'-CAGCCACTGTGAGTGC <sup>1</sup> CAGCAAAGCAAGGAGAGTTAC-3'	GFV: 3680-3644	-
<b>BNI 3</b>	D70A	5'-GAACAATGGAGGAGCCGCCATGTATATGG-3'	GFV: 3703-3731	+
<b>BNI 4</b>	D70A	5'-CCATATACATGGCGGCTCCTCCATTGTTC-3'	GFV: 3731-3703	-
<b>BNI 5</b>	R22A-R24A	5'-GGAAGTGGTCTAGCGAAAGCACAGGGACCAAAGC-3'	GFV: 3559-3593	+
<b>BNI 6</b>	R22A-R24A / pNS1-2A-Flag	5'-GCTTTGGTCCCTGTGCT <sup>1</sup> TTTCGCTAGGACCACTTCC-3'	GFV: 3593-3559	-
<b>BNI 7</b>	E162A-R164A	5'-CTGTCACATATGGCTGCGGTGG <sup>2</sup> CACTTGCCGCAATGTTC-3'	GFV: 3978-4015	+
<b>BNI 8</b>	E162A-R164A	5'-GAACATTGCGGCAAGTGC <sup>1</sup> ACCAGCCATAGTGACAG-3'	GFV: 4015-3978	-
<b>BNI 9</b>	R83A	5'-GCCTTTTCAATCGC <sup>1</sup> ACCAGGGCTGCTC-3'	GFV: 3743-3769	+
<b>BNI 10</b>	R83A	5'-GAGCAGCCCTGGTGC <sup>1</sup> GATTGAAAAGGC-3'	GFV: 3769-3743	-
<b>BNI 11</b>	R99A-E100A-R101A	5'-CCTATGGAGCCCTGCGG <sup>2</sup> CAGCCCTGTGCTGACC-3'	GFV: 3790-3823	+
<b>BNI 12</b>	R99A-E100A-R101A	5'-GGTCAGCACAAGGGCTGCCG <sup>2</sup> CAGGGCTCCATAGG-3'	GFV: 3823-3790	-
<b>BNI 13</b>	K124A	5'-GGCGCCTGTGGGCGTATCTAAATGCAG-3'	GFV: 3866-3893	+
<b>BNI 14</b>	K124A	5'-CTGCATTTAGATACGCCACAGGCCGCC-3'	GFV: 3893-3866	-
<b>BNI 15</b>	R142A-K143A	5'-GCTGTTGCTTCTGCGGCAGCATCAAATACC-3'	GFV: 3920-3949	+
<b>BNI 16</b>	R142A-K143A	5'-GGTATTTGATGCTGCCG <sup>2</sup> CAGAAGCAACAGC-3'	GFV: 3949-3920	-
<b>BNI 17</b>	K184A-D185A	5'-CACCAGAATTTGCGG <sup>2</sup> CACCTCCATGCAG-3'	GFV: 4046-4075	+
<b>BNI 18</b>	K184A-D185A	5'-CTGCATGGAGGTGGCCG <sup>2</sup> GAAATTCTGGTG-3'	GFV: 4075-4046	-
<b>BNI 55</b>	pGST-NS2A	5'-CATGCCATGGTCATGTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3'	GST: 1-24	+
<b>BNI 56</b>	pGST-NS2A	5'-TCCCCGCGGAATGCAGGGGCCCTGGAACAGAAC-3'	GST: 690-667	-

**Fortsetzung von Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.** <sup>1</sup> Unterstrichene Nukleotide entsprechen nicht der eingesetzten Matrizensequenz. <sup>2</sup> Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Sequenzen der Matrizen-DNA. <sup>3</sup> Polarität der Primer: + kodierender Strang; - nicht kodierender Strang.

Primer#	Mutation / Klon	Primersequenz <sup>1</sup>	Position <sup>2</sup>	Pol. <sup>3</sup>
<b>BNI 57</b>	pGST-NS2A/ pGST-NS2A-K190/ pGST-NS2A-P98/ pGST-NS2A-Q25/ pGST-NS2A-M13/ pNS2A-Flag	5'- <u>GTTCCGCGGG</u> GAGAAATACATGCTGTCCC-3'	GFV: 3509-3528	+
<b>BNI 59</b>	pNS2A-Flag	5'-CATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGCCGC-3'	Flag: 1-24	+
<b>BNI 60</b>	pNS2A-Flag	5'-GGCCTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGTC-3'	Flag: 24-1	-
<b>BNI 61</b>	pNS3	5'- <u>CCGCTCGAGCT</u> ACCTCCTACCTTCAGCAAACCTAATA-3'	GFV: 6439-6415	-
<b>BNI 67</b>	R22A-K23A-R24A	5'-GGAAGTGGTCTAGCGGCAGCACAGGGACCAAAGC-3'	GFV: 3559-3593	+
<b>BNI 68</b>	R22A-K23A-R24A	5'-GCTTTGGTCCCTGTGCTGCCGCTAGGACCACTTCC-3'	GFV: 3593-3559	-
<b>BNI 69</b>	K28A	5'-AGACAGGGACCAGCGCAAATGTTGGTTG-3'	GFV: 3578-3605	+
<b>BNI 70</b>	K28A	5'-CAACCAACATTTGCGCTGGTCCCTGTCT-3'	GFV: 3605-3578	-
<b>BNI 71</b>	R93A	5'-GGCTTTGGGCTCGCGACCCATATGGAGC-3'	GFV: 3763-3799	+
<b>BNI 72</b>	R93A	5'-GCTCCATAGGGTCTCGAGCCCAAAGCC-3'	GFV: 3799-3763	-
<b>BNI 81</b>	Gly I	5'-GAGATGAACAATAGTGGAGACGCCATG-3'	GFV: 3698-3724	+
<b>BNI 82</b>	Gly I	5'-CATGGCGTCTCC <u>ACT</u> ATTGTTCATCTC-3'	GFV: 3724-3698	-
<b>BNI 83</b>	Gly II	5'-GTATCTAAATGCA <u>ACT</u> TCTCTGCATC-3'	GFV: 3880-3907	+
<b>BNI 84</b>	Gly II	5'-GATGCAGAGAGAAGTTGCATTTAGATAC-3'	GFV: 3907-3880	-
<b>BNI 99</b>	pNS3	5'-CATGCCATGGCAAGTGGGGATGTCTTGTGGGATATTC-3'	GFV: 4570-4595	+
<b>BNI 188</b>	pNS1-2A-Flag	5'-GGAATCCATATGACAATGTCCATGAGCATGATC-3'	GFV: 2384-2407	+
<b>BNI 214</b>	pNS1-2A-Flag	5'-GCTCTAGACTCCTTCGCCCAAATATGC-3'	GFV: 4183-4164	-
<b>BNI 215</b>	pNS1-2A-Flag	5'-CTAGACTACAAGGACGACGACGACAAGTAGCATG-3'	Flag: 1-24	+
<b>BNI 216</b>	pNS1-2A-Flag	5'-CTACTTGTCTGTCGTCGTCCTTGTAGT-3'	Flag: 24-2	-
<b>BNI 232</b>	pGST-NS2A	5'-GCTCTAGACTACCTTCGCCCAAATATGCGGGTTC-3'	GFV: 4180-4157	-
<b>BNI 237</b>	pNS1(F323XhoI)-2A-Flag	5'-CTGTGAGCTTCCICGAGAGTGATGGGTGTTG-3'	GFV: 3411-3441	+
<b>BNI 238</b>	pNS1(F323XhoI)-2A-Flag	5'-CAACACCCATCACTCTCGAGGAAGCTCACAG-3'	GFV: 3441-3411	-
<b>BNI 239</b>	pNS1-2A(Q25XhoI)-Flag	5'-CTAAGGAAAAGACTCGAGCCAAAGCAAATG-3'	GFV: 3569-3598	+
<b>BNI 240</b>	pNS1-2A(Q25XhoI)-Flag	5'-CATTGCTTTGGCTCGAGTCTTTTCCTTAG-3'	GFV: 3598-3569	-
<b>BNI 241</b>	pNS1-2A(F62XhoI)-Flag	5'-GTGGGATTGCATCTCGAGGAGATGAACAATG-3'	GFV: 3680-3710	+
<b>BNI 242</b>	pNS1-2A(F62XhoI)-Flag	5'-CATTGTTTCATCTCCTCGAGATGCAATCCCAC-3'	GFV: 3710-3680	-
<b>BNI 243</b>	pNS1-2A(P98XhoI)-Flag	5'-CCCTATGGAGCCTCGAGGAACGCCTTGTG-3'	GFV: 3789-3817	+
<b>BNI 244</b>	pNS1-2A(P98XhoI)-Flag	5'-CACAAGGCGTTCCTCGAGGCTCCATAGGG-3'	GFV: 3817-3789	-
<b>BNI 245</b>	pNS1-2A(I148XhoI)-Flag	5'-GCATCAAATACCCTCGAGCCCTCATGGC-3'	GFV: 3938-3966	+
<b>BNI 246</b>	pNS1-2A(I148XhoI)-Flag	5'-GCCATGAGGGGCTCGAGGGTATTTGATGC-3'	GFV: 3966-3938	-
<b>BNI 247</b>	pNS1-2A(F183XhoI)-Flag	5'-CTTACCAGAATCTCGAGGACACCTCCATG-3'	GFV: 4043-4072	+
<b>BNI 248</b>	pNS1-2A(F183XhoI)-Flag	5'-CATGGAGGTGCTCTCGAGATTCTGGTGAAG-3'	GFV: 4072-4043	-
<b>BNI 249</b>	pNS1-2A(R223XhoI)-Flag	5'-GCATATTTGGGCTCGAGAGTCTAGACTAC-3'	GFV: 4164-4175 und Flag: 1-6	+

**Fortsetzung von Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.** <sup>1</sup> Unterstrichene Nukleotide entsprechen nicht der eingesetzten Matrizensequenz. <sup>2</sup> Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Sequenzen der Matrizen-DNA. <sup>3</sup> Polarität der Primer: + kodierender Strang; - nicht kodierender Strang.

Primer#	Mutation / Klon	Primersequenz <sup>1</sup>	Position <sup>2</sup>	Pol. <sup>3</sup>
BNI 250	pNS1-2A(R223 <i>Xho</i> I)-Flag	5'-GTAGTCTAGACTCTCGAGCCCAAATATGC-3'	GFV: 4175-4164 und Flag: 6-1	-
BNI 255	Gly+	5'-TCGAGTACACCCAGAAGCTGTCCGTGCCCGAC GGCTTCAAGGTGTCCAACCTCTCCGCCCGGGGC TGGGTGATCCACCCCTGGGCCTGCGGTCC-3'	Loop: 1-91	+
BNI 256	Gly+	5'-TCGAGGGACCGCAGGCCAGGGGGTGGATCA CCCAGCCCCGGGCGGAGGATTGGACACCTTGA AGCCGTCGGGCACGGACAGCTTCTGGGTGTAC-3'	Loop: 91-1	-
BNI 263	pGST-NS2A-K190	5'- <u>CTAGTCTAGACTACT</u> TCTGCATGGAGGTGTCCTTGA-3'	GFV: 4078-4056	-
BNI 264	pGST-NS2A-P98	5'- <u>CTAGTCTAGACTA</u> AGGGCTCCATAGGGTCTGAGC-3'	GFV: 3802-3781	-
BNI 265	pGST-NS2A-Q25	5'- <u>CTAGTCTAGACTACT</u> GTCITTTTCCTTAGGACCACTTCC-3'	GFV: 3583-3559	-
BNI 271	K23A	5'-GTGGTCCTAAGGGCAAGACAGGGACCA-3'	GFV: 3563-3589	+
BNI 272	K23A	5'-TGGTCCCTGTCTTGCCTTAGGACCAC-3'	GFV: 3589-3563	-
BNI 275	Q25R	5'-CCTAAGGAAAAGACGCGGACCAAAGCAA-3'	GFV: 3568-3595	+
BNI 276	Q25R	5'-TTGCTTTGGTCCGCTCTTTTCCTTAGG-3'	GFV: 3595-3568	-
BNI 277	pGST-NS2A-M13	5'- <u>CTAGTCTAGACTACAT</u> GTCTACCAAACCAAAAGG-3'	GFV: 3547-3527	-
BNI 284	pNS2A-GST	5'- <u>CGGGATCCAT</u> GTCCCCTATACTAGGTTATTGG-3'	GST: 1-24	+
BNI 285	pNS2A-GST/ pNS2A-A214-GST	5'- <u>ACATGCATGCCTAAT</u> GCAGGGGCCCTGGAACAGAAC-3'	GST: 690-666	-
BNI 305	pNS2A-M17-GST/ pNS2A-M30-GST/ pNS2A-S97-GST/ pNS2A-M188-GST/ pNS2A-A196-GST/ pNS2A-G1-GST	5'- <u>CGGGATCCCCTTC</u> GCCCAAATATGCGGGTTG-3'	GFV: 4180-4158	-
BNI 306	pNS2A-G1-GST	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGGGAGAAATACATGCTGTCCCTTTTG-3'	GFV: 3509-3533	+
BNI 307	pNS2A-M17-GST	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGGAAGTGGTCTTAAGGAA-3'	GFV: 3557-3576	+
BNI 308	pNS2A-M30-GST	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGTTGGTTGGAGGAGTAGT-3'	GFV: 3596-3615	+
BNI 309	pNS2A-S97-GST	5'- <u>GGAATTC</u> CATATGAGCCCTCGGGAACGCCTTGTG-3'	GFV: 3796-3817	+
BNI 310	pNS2A-M188-GST	5'- <u>CATGCCAT</u> GGCCATGCAGAAGACTATACCTC-3'	GFV: 4068-4088	+
BNI 311	pNS2A-A196-GST	5'- <u>CATGCCAT</u> GGCCCTCACACTCACATCTTA-3'	GFV: 4092-4113	+
BNI 321	Gly-	5'-GTGTCCAACCTCCGCCCGGGGCTG-3'	Loop: 42-85	+
BNI 322	Gly-	5'-CAGCCCCGGGCGGGAGATTGGACAC-3'	Loop: 85-42	-
BNI 363	R22A-K23A	5'-GGAAGTGGTCTAGCGGCAAGACAGGGACC-3'	GFV: 3559-3588	+
BNI 364	R22A-K23A	5'-GGTCCCTGTCTTGCCTTAGGACCACTTCC-3'	GFV: 3588-3559	-
BNI 365	K23A-R24A	5'-GTGGTCCTAAGGGCAGCACAGGGACCAAAG-3'	GFV: 3563-3592	+
BNI 366	K23A-R24A	5'-CTTTGGTCCCTGTGCTGCCCTTAGGACCAC-3'	GFV: 3592-3563	-
BNI 379	pNS2A-A214-GST	5'- <u>CATGCCAT</u> GGCATTCTGGCAACCCGCATATTTGG-3'	GFV: 4148-4174	+
BNI 382	HA-Tag	5'- <u>TCGAGTACCCG</u> TACGACGTCCCGGACTACGCGC-3'	HA: 1-27	+

**Fortsetzung von Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Primer.** <sup>1</sup> Unterstrichene Nukleotide entsprechen nicht der eingesetzten Matrizensequenz. <sup>2</sup> Positionsangaben beziehen sich auf die jeweiligen Sequenzen der Matrizen-DNA. <sup>3</sup> Polarität der Primer: + kodierender Strang; - nicht kodierender Strang.

Primer #	Mutation / Klon	Primersequenz <sup>1</sup>	Position <sup>2</sup>	Pol. <sup>3</sup>
<b>BNI 383</b>	HA-Tag	5'- <u>TCGAGCGCGTAGTCCGGGACGTCGTACGGGTAC</u> -3'	HA: 27-1	-
<b>BNI 396</b>	pNS1-2A(P157 <i>Xho</i> I)-Flag	5'-CTGTTGACACCT <u>CTCGAGG</u> TCACTATGGCTG-3'	GFV: 3968-3992	+
<b>BNI 397</b>	pNS1-2A(P157 <i>Xho</i> I)-Flag	5'-CAGCCATAGTGAC <u>CTCGAGAG</u> GTGTC AACAG-3'	GFV: 3992-3968	-
<b>#6222</b>	pNS1-2A-Flag	5'-AACATGACAATGTCCATGAG-3'	GFV: 2371-2400	+
<b>#2501</b>	pNS2A-Flag	5'- <u>GGAATTCTACCTTCGCCCAA</u> AATATGCGGGT-3'	GFV: 4180-4159	-

#### **2.1.4 Zellen**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Baby Hamster Kidney-J Zellen (BHK-J) (Lindenbach & Rice, 1997) handelt es sich um mehrfach passagierte BHK-21-Zellen, die nach Infektion mit GFV einen zytopathischen Effekt (ZPE) zeigen. In Bezug auf Morphologie, Transfektionseffizienz und Virusinfektion sind diese Zellen mit den parentalen Zellen zu vergleichen.

#### **2.1.5 Virusstämme**

GFV Impfstamm 17D (Theiler & Smith, 1937).

Modifiziertes Vaccinia-Virus Ankara, das T7-RNA-Polymerase exprimiert (Sutter et al., 1995).

Jegliche Arbeiten mit infektiösem GFV-Material fanden unter S3-Bedingungen statt.

### **2.1.6 Antiseren und monoklonale Antikörper**

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren und monoklonalen Antikörper (mAK) sind in folgender Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 3: Zur Immunfluoreszenz, Radioimmunpräzipitation und zum Western Blot eingesetzte Antikörper/-seren.** Monoklonale Antikörper: mAK, Antiserum: AS. <sup>1</sup> Verdünnung in PBS, <sup>2</sup> Menge ( $\mu$ l) des in der Radioimmunpräzipitation eingesetzten AKs pro 100  $\mu$ l Zelllysat, <sup>3</sup> Verdünnung in PBS/0,05% Tween.

<b>Antikörper/-seren</b>	<b>Antigen</b>	<b>Herkunft</b>	<b>IF<sup>1</sup></b>	<b>RIP<sup>2</sup></b>	<b>WB<sup>3</sup></b>
$\alpha$ -E-AS (Kaninchen)	GFV-Envelope	C. Rice, Rockefeller University, New York	-	-	1:10000
$\alpha$ -E6330-mAK (Maus)	GFV-Envelope	M. Niedrig, Robert-Koch-Institut, Berlin	1:1000	-	-
$\alpha$ -Flag M2-Peroxidase mAK (Maus)	Flag-Tag	Sigma-Aldrich, Steinheim	1:1000	2,50	-
$\alpha$ -GST-HRP AS (Ziege)	GST-Tag	Amersham, Freiburg	-	0,20	-
$\alpha$ -HA-mAK (Maus)	HA-Tag	Roche, Mannheim	1:100	-	-
HIAF = "hyperimmune ascitic fluid" (Maus)	verschiedene GFV-Proteine	C. Rice, Rockefeller University, New York	-	0,75	-
$\alpha$ -Kaninchen IgG-PO AS (Ziege)	Kaninchen IgG	Pierce, Rockford	-	-	1:10000
$\alpha$ -Maus IgG-FITC AS (Ziege)	Maus IgG	Sifin, Berlin	1:250	-	-
$\alpha$ -NS3-AS (Kaninchen)	GFV-NS3	C. Rice, Rockefeller University, New York	-	2,00	-

### 2.1.7 Enzyme und Kits

In Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme und Kits aufgelistet.

**Tabelle 4: Enzyme und Kits.**

Enzyme und Kits	Firma
ATP	Fermentas, St. Leon-Rot
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Capanalagon m7G(5')ppp(5')G	NEB, Frankfurt/Main
"calf intestinal alkaline phosphatase" (CIP)	NEB, Frankfurt/Main
DNA-Polymerase und 10 x PCR-Puffer	Gene Craft, Lüdinghausen
DNase	Ambion, Huntingdon, U.K.
dNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
"Lipofectamine 2000"	Invitrogen, Karlsruhe
NTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> -Polymerase und 10 x <i>Pfu</i> -Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot
PNGaseF-Kit	NEB, Frankfurt/Main
Polynukleotidkinase und 10 x Puffer A	Fermentas, St. Leon-Rot
Qiaex DNA Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kits	Stratagene, Heidelberg
Restriktionsenzyme und -puffer	NEB, Frankfurt/Main
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe
SP6-RNA-Polymerase und 10 x Puffer	Ambion, Huntingdon, U.K.
SuperScriptIII RT und 5 x First Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA Ligase und 10 x Ligationspuffer	NEB, Frankfurt/Main
<i>Taq</i> -Polymerase und 10 x <i>Taq</i> -Puffer	Molzym, Bremen

### 2.1.8 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Folgende Tabelle zeigt die für die Zellkultur benötigten Medien und Zusätze:

**Tabelle 5: Medien und Zusätze für die Zellkultur.**

Zellkulturmedien und -zusätze	Firma
Earle's MEM	PAA, Cölbe
fötales Kälberserum	PAA, Cölbe
Puromycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
L-Glutamin	PAA, Cölbe
nicht essentielle Aminosäuren	PAA, Cölbe
1 x MEM ohne L-Glutamin, Methionin, Cystein	MP Biomedicals, Eschwege
Trypsin	PAA, Cölbe

### **2.1.9 Chemikalien**

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Chemikalien von den Firmen Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Merck (Darmstadt) in Analysenqualität bezogen. Die Radiochemikalie TRAN<sup>35</sup>S-LABEL™ wurde bei ICN Biochemicals, Eschwege bestellt, <sup>14</sup>C-Proteinmarker wurde von der Fa. Amersham, Freiburg bezogen.

### **2.1.10 Verbrauchsmaterial**

Sämtliche Plastikwaren und andere Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Sarstedt (Nümbrecht), PAA (Cölbe), Milipore (Eschborn), Biozym (Hess. Oldendorf), Greiner (Solingen), Roth (Karlsruhe) und Nunc (Wiesbaden) bezogen. Elektroporationsküvetten wurden bei der Firma VWR (Darmstadt) bestellt.

### **2.1.11 Geräte**

Die in dieser Arbeit eingesetzten Geräte sind in folgender Tabelle aufgelistet.

**Tabelle 6: Eingesetzte Geräte und deren Hersteller.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Bakterienschüttler Certomat BS-T	B. Braun International (Mainz)
Elektrophoreseapparatur 40-0911	Peqlab (Erlangen)
Elektrophorese-System Mini-Trans-Blot	Biorad (München)
Elektroporationsgerät Gene Pulser und Pulse Controller	Biorad (München)
Kamera 3CCD MIT	Leica (Solms)
Kamera DFC 350FX	Leica (Solms)
Mastercycler eppgradient S	Eppendorf (Hamburg)
Mikroskop DMLS	Leica (Solms)
Mikroskop TCS NT	Leica (Solms)
Photometer UV-160A	Shimadzu (Duisburg)
Sterilbank BSB 4A	ICN Biomedicals (Meckenheim)
Thermomixer Comfort	Eppendorf (Hamburg)
UV-Geldokumentationsanlage	Kodak Deutschland (Stuttgart)
Videodokumentation UP-895 CE	Sony Deutschland (Köln)
Zellbrutschrank BBD 6220	Heraeus (Hanau)
Zentrifuge 5415R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5804R	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge Suprafuge 22	Heraeus (Hanau)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Anzucht von Bakterien**

Der Bakterienstamm *Escherichia coli* MC1061 wurde bei 37°C unter Schütteln in autoklaviertem Luria-Bertani-Medium (LB) angezogen. Um plasmidhaltige Bakterien zu selektieren, wurden dem Medium 100 mg Ampicillin pro Liter zugegeben. Zur Herstellung von LB-Petrischalen wurde dem flüssigen Nährmedium 15 g Agar-Agar pro Liter zugefügt.

<u>LB-Medium</u>	Bakto-Trypton	10 g
	Bakto-Yeast-Extrakt	5 g
	NaCl	10 g
	ad 1000 ml aqua dest.	

#### **2.2.1.2 Herstellung transformationskompetenter Bakterien**

Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterien muss die Bakterienzellwand für Nukleinsäuremoleküle durchlässig gemacht werden, was in diesem Fall durch Behandlung mit Calciumchlorid erfolgte. LB-Medium (250 ml) wurde mit 0,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* MC1061 angeimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 - 0,7 angezogen. Nach einer 10 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 4°C und 8000 x g 10 min abzentrifugiert (Suprafuge22). Das Pellet wurde in 25 ml kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und anschließend weitere 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min wurden die Bakterienzellen in 2,5 ml kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Glycerinlösung (85:15) aufgenommen, in vorgekühlten Reaktionsgefäßen aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die nun transformationskompetenten Zellen wurden bei -70°C gelagert.

#### **2.2.1.3 Transformation von Plasmid-DNA in CaCl<sub>2</sub>-kompetente Bakterien**

Zur Transformation wurde ein 50 µl Aliquot transformationskompetenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 450 µl kalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung verdünnt. 100 µl dieses Ansatzes wurden mit einem Ligationsansatz (siehe 2.2.2.9) bzw. 10-50 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 43,5°C für 45 s. Anschließend



wurde die Probe kurz auf Eis abgekühlt, mit 200 µl LB-Medium versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde der gesamte Transformationsansatz (bei einer Retransformation von Plasmid-DNA nur 1/4 der Probe) auf einer LB-Ampicillin-Platte ausgestrichen und für ca. 15 h bei 37°C inkubiert. Zur Anzucht wurden je 5 ml LB-Ampicillinmedium mit einer gewachsenen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert.

## **2.2.2 Standard-DNA-Techniken**

### **2.2.2.1 Kleine Plasmid-Isolierung („Minipreps“)**

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Alle Zentrifugationen fanden, wenn nicht anders erwähnt, bei 16000 x g und RT statt. Zunächst wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 1 min abzentrifugiert (Zentrifuge 5415R). Das Bakterienpellet wurde in 100 µl Puffer 1 resuspendiert, mit 100 µl Puffer 2 versetzt und vorsichtig vermischt. Nach 5 minütiger Lyse bei RT wurde der alkalische Ansatz mit 100 µl Puffer 3 neutralisiert. Leichtes Schütteln erzeugte einen Niederschlag aus Proteinen und chromosomaler DNA, der durch 10 minütiges Zentrifugieren pelletiert wurde. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Isopropanol versetzt, um die Plasmid-DNA zu fällen. Nach 10 min Zentrifugation wurde das DNA-Pellet mit 100 µl Isopropanol gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. DNA von „high-copy“ Plasmiden wurde in 50 µl, DNA von „low-copy“ Plasmiden in 30 µl aqua dest. resuspendiert. Qualität und Quantität der Plasmid-DNA wurden durch Restriktionsverdau, Elektrophorese und Sequenzierung überprüft.

<u>Puffer 1</u>	Tris-HCl	50 mM
	EDTA	10 mM
	RNase A	100 µg/ml
	pH 8,0	
<u>Puffer 2</u>	NaOH	200 mM
	SDS	1%
<u>Puffer 3</u>	KAc	3000 mM
	pH 5,5	

### **2.2.2.2 Große Plasmid-Isolierung („Midipreps“)**

Größere Plasmidpräparationen wurden mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit durchgeführt. Die Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (50 ml bei „high copy“, 100 ml bei „low copy“ Plasmiden, Suprafuge 22) und das Pellet in 4 ml bzw. 7 ml Puffer 1 resuspendiert. Es wurden 4 ml bzw. 7 ml Puffer 2 zugegeben und vorsichtig vermischt. Nach 5 min wurde die Lyse durch Zugabe von 4 ml bzw. 7 ml kaltem Puffer 3 abgestoppt. Nach leichtem Schütteln wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Um die DNA-haltige Flüssigkeit von den gefällten Proteinen zu trennen, wurde die klare Suspension über einen Filter in die mit Puffer QBT equilibrierte Säule pipettiert. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit 10 ml Puffer QC wurde die DNA durch Zugabe von 5 ml Puffer QF eluiert. Durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und 30 minütiger Zentrifugation bei 10000 x g (Suprafuge 22) und 4°C wurde die Plasmid-DNA präzipitiert. Nach einem Waschschrift mit 2 ml 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl aqua dest. aufgenommen und nach der Messung im UV-Spektrophotometer auf die Konzentration von 1 µg/µl eingestellt.

<u>Puffer 1, 2, 3</u>	siehe 2.2.2.1	
<u>Puffer QBT</u>	NaCl	750 mM
	MOPS, pH 7	50 mM
	Isopropanol	15%
	Triton X 100	0,15%
<u>Puffer QC</u>	NaCl	1000 mM
	MOPS, pH 7	50 mM
	Isopropanol	15%
<u>Puffer QF</u>	NaCl	1250 mM
	Tris-Cl, pH 8,5	50 mM
	Isopropanol	15%

### **2.2.2.3 Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung**

Um DNA-Lösungen aufzukonzentrieren, von Proteinen zu befreien, oder umzupuffern, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanolfällung durchgeführt. Ein Minimum von 100 µl der wässrigen Nukleinsäurelösung wurde mit einem Volumen Phenol ausgeschüttelt. Für 2 min erfolgte bei 16100 x g (Zentrifuge 5415R) die Phasentrennung. Die

obere, nukleinsäurehaltige, wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Nukleinsäure der oberen Phase in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 1/10 Volumen 0,3 M Natriumacetatlösung (pH 7,0) und 2,5 fachem Volumen 100%igem Ethanol 30 min bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die DNA bei  $16100 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert. Zur Entfernung von Salzresten wurde mit  $100 \mu\text{l}$  70%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei RT getrocknet und in einem adäquaten Volumen aqua dest. aufgenommen.

#### **2.2.2.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA**

Die Quantifizierung einer Nukleinsäurelösung erfolgte durch Absorptionsmessung bei 260 nm gegen aqua dest. Bei doppelsträngiger DNA gilt folgende Formel:

$$\text{DNA-Konz (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05$$

Der Quotient aus  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  gibt Aufschluss über die Reinheit der DNA. Liegt er zwischen 1,8 und 2,0, so liegen keine Verunreinigungen durch Proteine oder Phenol vor, ansonsten ist der Quotient deutlich niedriger (Sambrook et al., 1989).

#### **2.2.2.5 Restriktionsverdau**

Plasmid-DNA wurde zu Analyse- oder Klonierungszwecken mit Restriktionsenzymen des Typs II verdaut. Letztere erkennen und spalten spezifische Sequenzen in doppelsträngiger DNA, wobei Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-Hydroxylende entstehen. Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme und -puffer wurden von der Fa. NEB bezogen und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

#### **2.2.2.6 Dephosphorylierung**

Sollte verhindert werden, dass durch Restriktion entstandene Plasmid-DNA-Fragmente wieder rückligieren, wurden die Phosphatgruppen am 5'-Ende durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase ("calf intestinal alkaline phosphatase" = CIP, Fa. NEB) nach Angaben des Herstellers abgespalten.

### **2.2.2.7 Agarosegelelektrophorese**

Die Standardmethode zur Auftrennung, Identifizierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten ist die Gelelektrophorese in Agarose, bei der verschieden große DNA-Moleküle unter elektrischer Spannung mit unterschiedlicher Geschwindigkeit in der Gelmatrix zur Anode wandern. Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 0,8-1,5%ige Agarosegele verwendet. Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer mit 100 ng/ml Ethidiumbromid aufgekocht, und das noch flüssige Gel wurde auf eine vorbereitete Glasplatte mit Geltaschenkamm gegossen. Nach dem Erhärten wurde das Agarosegel in der Elektrophoresekammer durch 1 x TAE-Puffer überschichtet und mit den Proben, die mit 5 x Probenpuffer versetzt waren, beladen. Um die Fragmentgröße der DNA-Proben einschätzen zu können, wurde außerdem ein DNA-Marker (1 kb DNA Ladder, Fa. Fermentas) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei max. 140 V, wonach die DNA-Fragmente im UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und fotografiert wurden.

<u>50 x TAE-Puffer</u>	Tris	2,00 M
	Natriumacetat x 3H <sub>2</sub> O	0,25 M
	EDTA	0,05 M
	pH 7,8 durch Essigsäure	
<u>5 x Probenpuffer</u>	Bromphenolblau	0,13%
	Xylencyanol FF	0,13%
	Ficoll 400	15%
	TAE	5 x

### **2.2.2.8 Gelextraktion von DNA-Fragmenten**

Nukleinsäurefragmente wurden mit Hilfe des „Qiaex DNA Gel Extraction Kit“ (Fa. Qiagen) aus Agarosegelen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Das Prinzip des Kits basiert auf der Bindung von Nukleinsäuren an Silikapartikel (Vogelstein & Gillespie, 1979). Gewünschte DNA-Fragmente wurden aus einem präparativen Agarosegel unter UV-Licht (366 nm) ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt, wo sie in einer adäquaten Menge Puffer QX1 (Fa. Qiagen) gelöst wurden. Die Nukleinsäure wurde unter Schütteln bei 50°C an Silikapartikel gebunden und nach einigen Waschschritten in aqua dest. gelöst. Nach

Zentrifugation bei 16000 x g wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### **2.2.2.9 Ligation**

Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylende von DNA-Fragmenten, die z.B. durch Restriktion entstanden sind. Für einen 10 µl Ligationsansatz wurden zwischen 100-500 ng DNA mit 10 x Ligationspuffer und 160 U T4-DNA-Ligase vermischt, wobei das molare Verhältnis von Vektor und Insert bei 1:2 lag. Die Ligation erfolgte bei 16°C für wenigstens 2 h.

### **2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion**

Bei der Polymerasekettenreaktion ("Polymerase Chain Reaction" = PCR) wird ein DNA-Bereich, der zwischen den Bindungsstellen zweier Primer liegt, spezifisch amplifiziert. Die Primer sind jeweils zu einem Einzelstrang der DNA-Doppelhelix komplementär. Die Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert. Ein zyklischer Wechsel zwischen Annealing-, Polymerisierungs- und Denaturierungstemperatur sorgt dafür, dass geringe Mengen einer Ziel-DNA durch ständiges Wiederholen der Polymerisierungsreaktion exponentiell vermehrt werden. Die folgenden beiden Tabellen zeigen sowohl einen PCR-Standardansatz als auch ein PCR-Temperaturprofil.

**Tabelle 7: Standard-PCR-Ansatz.**

H <sub>2</sub> O	40,3 µl
10 x <i>Pfu</i> -Puffer	5,0 µl
dNTPs (5 mM)	2,0 µl
Plusstrang-Primer (30 pM/µl)	1,0 µl
Minusstrang-Primer (30 pM/µl)	1,0 µl
cDNA (1 µg/µl)	0,2 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl

**Tabelle 8: Temperaturprofil einer PCR.** T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer

30 Zyklen	}	96°C	2 min	Denaturierung
		96°C	30 s	Denaturierung
		Annealing-Temp. (T <sub>m</sub> - 5°C)	30 s	Annealing
		72°C	Synthesezeit (1 min/1 kb)	Elongation
		4°C	∞	Termination

### **2.2.2.11 Gerichtete Mutagenese**

Um doppelsträngige Plasmid-DNA gerichtet zu mutagenisieren, wurde das Prinzip des „QuikChange™ Site Directed Mutagenesis Kits“ der Fa. Stratagene angewandt. Hier wird ein Vektor mit gewünschtem Insert in eine PCR eingesetzt, wobei ein Primerpaar, das die benötigte Mutation trägt, an den jeweiligen komplementären DNA-Strang bindet. Die *Pfu*-DNA-Polymerase katalysiert die Synthesereaktion, wodurch man „genickte“, zirkuläre Einzelstränge mit der gewünschten Mutation erhält. Durch Restriktion mit *DpnI* wird lediglich die aus Bakterien isolierte, methylierte Matrizen-DNA gespalten. Mittels PCR synthetisierte DNA ist dagegen nicht methyliert und wird daher nicht angegriffen. Nach einer Phenol-Chloroform-Reinigung (siehe 2.2.2.3) wurde die restringierte Plasmid-DNA in *E. coli* MC1061 transformiert (siehe 2.2.1.3) und auf LB-Ampicillin-Petrischalen ausgestrichen. Die über Nacht gewachsenen Kolonien wurden als „Mini-Prep“ angeimpft und die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.2.2.1). Schließlich wurde die erfolgreiche Einfügung der gewünschten Mutation durch Sequenzierung (siehe 2.2.2.14) bestätigt.

### **2.2.2.12 „Adaptor Annealing“**

Zur Synthese sehr kurzer DNA-Fragmente wurde unter Verwendung komplementärer Primer eine „Adaptor Annealing“ Reaktion durchgeführt. Für spätere Ligationen müssen Oligonukleotide am 5'-Ende phosphoryliert sein. Die T4-Polynukleotid Kinase (PNK) katalysiert den Transfer von  $\gamma$ -Phosphat des zugefügten ATPs zu den 5'-OH-Gruppen der Oligonukleotide. In Tabelle 9 ist ein Kinaseansatz gezeigt, der für 30 min bei 37°C inkubiert wurde.

**Tabelle 9: Standardansatz einer Kinasereaktion.**

H <sub>2</sub> O	14,0 µl
10 x Puffer A	2,0 µl
Plusstrang-Primer (30 pM/µl)	1,0 µl
Minusstrang-Primer (30 pM/µl)	1,0 µl
ATP (100 mM)	1,0 µl
PNK (10 U/µl)	1,0 µl

Phosphorylierte Oligonukleotide wurden nach einer Phenol-Chloroform-Reinigung (siehe 2.2.2.3) gefällt und in 10 µl aqua dest. gelöst. Nach 5 minütigem Aufschmelzen der Primer (70°C) erfolgte das Annealing durch Abkühlen auf RT. Die so erzeugte Adaptor-DNA konnte anschließend in einen mit den entsprechenden Enzymen restringierten Vektor eingefügt werden (siehe 2.2.2.9).

### **2.2.2.13 "Screening"-PCR**

Zur Überprüfung von Plasmid-DNA direkt aus gewachsenen Kolonien wurden letztere mit einer Pipettenspitze von der Agarpetrischale aufgenommen. Die mit Bakterien behaftete Pipettenspitze wurde zunächst in LB-Ampicillinmedium getunkt und dann in einem vorbereiteten PCR-Ansatz geschwenkt. Ein solcher "Screening"-PCR-Ansatz ist in Tabelle 10 gezeigt. Bei der Wahl der Primer wurde darauf geachtet, dass ein Oligonukleotid im eingefügten DNA-Bereich („Insert“) liegt und das andere im Vektor. Die PCR-Ansätze wurden durch Gelelektrophorese analysiert. Zeigten sich die erwarteten Banden, konnte davon ausgegangen werden, dass die zugehörigen Klone die erwünschte Plasmid-DNA enthielten. Zur zusätzlichen Kontrolle wurde die Plasmid-DNA isoliert und mittels Restriktion (siehe 2.2.2.5) und Sequenzierung (siehe 2.2.2.14) überprüft.

**Tabelle 10: Ansatz für "Screening"-PCRs**

H <sub>2</sub> O	8,1 µl
10 x <i>Taq</i> -Puffer	1,0 µl
dNTPs (5 mM)	0,4 µl
Plusstrang-Primer (30 pM/µl)	0,2 µl
Minusstrang-Primer (30 pM/µl)	0,2 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl

### **2.2.2.14 Sequenzierung**

Die Sequenzierungen wurden mit dem „Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ der Fa. Applied Biosystems durchgeführt. Der Reaktionsmechanismus dieses nichtradioaktiven Sequenzierungsverfahrens beruht auf der enzymatischen Didesoxy-Methode von Sanger et al. (1977). Zur Sequenzierung wurde der in Tabelle 11 aufgelistete Ansatz zusammenpipettiert. Die DNA wurde mittels PCR amplifiziert (Programm siehe Tab. 12) und anschließend durch Zugabe eines Gemisches aus 16 µl aqua dest. und 64 µl 95% EtOH gefällt. Nach 20 minütiger Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C wurde das Pellet mit 100 µl 70%igem EtOH gewaschen und nach wiederholter Zentrifugation bei RT getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte durch die Arbeitsgruppe Tannich am Bernhard-Nocht-Institut. Die Datenverarbeitung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte durch das Computerprogramm DNA Strider™ 1.3f7 (CEA, Frankreich).

**Tabelle 11: Sequenzierungsansatz**

5 x Reaktionspuffer	3 µl
Sequenzierungsprimer	5 pmol
DNA	1 µg
Big Dye® Terminator Premix	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

**Tabelle 12: PCR-Programm für Sequenzierungsansätze**

30 Zyklen	}	95°C	2 min	Denaturierung
		96°C	10 s	Denaturierung
		52°C	5 s	Annealing
		60°C	4 min	Elongation
		4°C	∞	Termination

## **2.2.3 Standard-RNA-Techniken**

### **2.2.3.1 In vitro Transkription**

Bei der *in vitro* Transkription wird ausgehend von linearisierter Plasmid-DNA RNA synthetisiert. Die zum GFV-Genom komplementäre DNA (cDNA) steht im Plasmid pACNR-FLYF17Dx (Bredenbeek et al., 2003) unter der Kontrolle eines SP6-Promotors (siehe 2.1.2). Daher kann mit Hilfe von SP6-RNA-Polymerase RNA synthetisiert werden, wofür



Nukleotidtriphosphate (NTPs) benötigt werden. Da flavivirale RNA eine Capstruktur am 5'-Ende besitzt, muss ein Capanalogon zur *in vitro* Transkriptionsreaktion gegeben werden. Durch die Capstruktur wird der RNA die Bindung ans Ribosom ermöglicht. Um das authentische 3'-Ende der GFV-RNA zu erhalten, musste die Plasmid-DNA zunächst mit dem Restriktionsenzym *XhoI* linearisiert werden, sodass die RNA-Synthese an dieser Stelle abbricht. Nach vollständiger Linearisierung von 2 µg Plasmid-DNA (siehe 2.2.2.5) wurde diese durch Phenol-Chloroform gereinigt und anschließend gefällt (siehe 2.2.2.3). Die getrocknete DNA wurde in 10 µl aqua dest. aufgenommen und im *in vitro* Transkriptionsansatz (Tabelle 13) eingesetzt. Nach 1 h Inkubation bei 40°C wurden nochmals 0,25 µl SP6-Polymerase zugegeben. Eine Stunde später wurde die RNA-Synthese per Agarosegelelektrophorese (siehe 2.2.2.7) überprüft.

**Tabelle 13: *In vitro* Transkriptionsansatz**

H <sub>2</sub> O	6,00 µl
10 x Puffer	2,50 µl
linearisierte DNA (2 µg)	10,00 µl
NTPs (2,5 mM)	5,00 µl
Cap m7G(5')ppp(5')G (10 mM)	1,25 µl
SP6-RNA-Polymerase	0,25 µl

### **2.2.3.2 DNase-Verdau und Lithiumchlorid-Fällung**

Falls die bei der *in vitro* Transkription entstandene RNA-Menge photometrisch bestimmt werden sollte, wurde zunächst die Matrizen-DNA durch Zugabe von 0,5 µl DNase restringiert. Nach 20 min Inkubation bei 37°C erfolgte die Fällung der RNA bei -20°C für 20 min mit Hilfe von 12,5 µl 7,5 M Lithiumchlorid-Lösung (Fa. Ambion). Durch Zentrifugation bei 4°C und 16000 x g wurde die RNA anschließend pelletiert und nach einem Waschschrift mit 100 µl 70%igem EtOH bei RT getrocknet. Danach wurde das Ribonukleinsäurepellet in 20 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und photometrisch vermessen.

### **2.2.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von RNA**

Zur Quantifizierung einer Ribonukleinsäurelösung wurde die Absorption bei 260 nm gegen aqua dest. gemessen. Für RNA gilt folgende Formel:

$$\text{RNA-Konz (}\mu\text{g}/\mu\text{l)} = \text{OD}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,04$$

### **2.2.3.4 RNA-Isolierung aus Zellen**

Um Gesamtzell-RNA aus adhärennten Zellen einer p40-Schale zu isolieren, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, in 1 ml Trizol (Fa. Invitrogen, Karlsruhe) lysiert und in ein Reaktionsgefäß überführt. Trizol ist eine Einphasenlösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Die Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Chloroform und anschließendes Zentrifugieren (15 min, 4°C, 16000 x g) trennt die Lösung in eine dichtere organische und eine wässrige Phase. Letztere enthält die RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um sie dann durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol zu fällen. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die Ribonukleinsäure durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 16000 x g) gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml kaltem, 75%igem EtOH gewaschen und nach nochmaliger Zentrifugation bei RT getrocknet. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 55°C in 20  $\mu\text{l}$  nukleasefreiem aqua dest. gelöst.

### **2.2.3.5 Reverse Transkription (RT)**

Ausgehend von Gesamtzell-RNA GFV infizierter Zellen wurde mit Hilfe eines reversen, spezifischen Primers und dem Enzym Reverse Transkriptase die genomische RNA in cDNA umgeschrieben. Zunächst wurde in folgender Tabelle gezeigter Ansatz für 5 min bei 65°C erhitzt, und dann auf Eis abgekühlt.

**Tabelle 14: RT-Vorinkubationsansatz**

RNase freies H <sub>2</sub> O	7 $\mu\text{l}$
reverser Primer (30 pM)	1 $\mu\text{l}$
dNTP Mix (5 mM)	2 $\mu\text{l}$
RNA-Template	3 $\mu\text{l}$

Die eigentliche Synthese erfolgte nach Zugabe des Enzymmixes (Tab. 15) für 1 h bei 50°C.

**Tabelle 15: RT-Enzymmix**

5 x First Strand Buffer	4 µl
DTT (0,1 M)	1 µl
RNase OUT	1 µl
SuperScriptIII RT	1 µl

Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase wurde der Ansatz für 15 min auf 70°C erhitzt. Danach kühlten die Proben auf RT ab. Um die entstandene cDNA zu amplifizieren, wurde dem RT-Schritt eine PCR angeschlossen. Das entsprechende Pipettierschema und PCR-Programm folgen in den nächsten beiden Tabellen.

**Tabelle 16: RT-PCR-Ansatz**

H <sub>2</sub> O	39,6 µl
10 x PCR-Puffer	5,0 µl
dNTP Mix (5 mM)	2,0 µl
Plusstrang-Primer (30 pM)	0,5 µl
Minusstrang-Primer (30 pM)	0,5 µl
cDNA	2,0 µl
DNA-Polymerase	0,4 µl

**Tabelle 17: RT-PCR-Programm. T<sub>m</sub> = Schmelztemperatur der Primer**

35 Zyklen	}	94°C	2 min	Denaturierung
		94°C	30 s	Denaturierung
		Annealing-Temp. (T <sub>m</sub> - 5°C)	30 s	Annealing
		70°C	Synthesezeit (1 min/1 kb)	Elongation
		4°C	∞	Termination

## **2.2.4 Gewebekultur**

### **2.2.4.1 Anzucht und Passagieren von Zellen**

BHK-J-Zellen wurden in "Earle's minimal essential medium" (MEM) mit 7,5% hitzeinaktiviertem, fötalen Kälberserum ("fetal calf serum" = FCS) und 1 x nicht essentiellen Aminosäuren bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und feuchter Atmosphäre im Zellbrutschrank kultiviert. Zu einem dichten Zellrasen herangewachsene Zellen wurden gesplittet. Zunächst wurden die Zellen mit sterilem PBS gewaschen, dann wurde Trypsin zugegeben, um die Zellen durch 5 min Inkubation bei 37°C von dem Schalenboden abzulösen. Anschließend wurden die Zellen in einer geeigneten Menge Medium aufgenommen, resuspendiert und in gewünschter Verdünnung in neue Gewebekulturschalen ausgesät. Zur Selektion von SIN-Replikon (siehe 2.1.2) exprimierenden Zellen wurde dem Zellmedium 12 h nach Elektroporation Puromycin in einer Endkonzentration von 5 µg/ml zugegeben. Nach Selektion (2-3 Tage) wurden die Zellen weiter passagiert und in Medium mit Puromycin (5 µg/ml) gehalten.

<u>PBS:</u>	NaCl	0,80 g
	KCl	0,20 g
	CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,10 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	1,15 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,20 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,10 g
	ad 1 l aqua dest., pH 7,2	

### **2.2.4.2 Bestimmung der Zahl lebender Zellen**

Nach der unter 2.2.4.1 beschriebenen Trypsinbehandlung wurden die in Medium resuspendierten Zellen 1:4 mit Trypanblau-Lösung (0,5 g/Liter in PBS) verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Da sich Trypanblau in die Zellmembran toter Zellen einlagert und diese blau färbt, wurden nur die ungefärbten Zellen aus vier Quadraten gezählt. Anschließend konnte die Anzahl lebender Zellen/ml nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{ausgezählte Quadrate}^{-1}$$

### **2.2.4.3 Elektroporation von RNA**

Eine Möglichkeit, Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen einzuschleusen, ist die Elektroporation (EP). Hierbei wird die Zellmembran durch Elektroschock kurzzeitig permeabel gemacht, sodass RNA (oder DNA) in die Zelle eindringen kann. Zur EP wurden in der Log-Phase befindliche BHK-J-Zellen, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, trypsiniert und zweimal mit AccuGENE®-PBS gewaschen. Dazu wurden die Zellen jeweils bei 8°C für 5 min abzentrifugiert (34 x g, Zentrifuge 5804R) und in 10 ml kaltem, RNase freien PBS resuspendiert. Anschließend wurde eine Zellsuspension mit  $2 \times 10^7$  Zellen/ml (ebenfalls in PBS) vorbereitet, wovon 400 µl (=  $8 \times 10^6$  Zellen) mit einer gewünschten RNA-Menge vermischt und in eine EP-Küvette mit einer Spaltbreite von 2 mm überführt wurden. Mit Hilfe des EP-Gerätes wurden zwei Strompulse mit einer Spannung von 1,5 kV, einer Kapazität von 25 µFD und einer Widerstandseinstellung von  $\infty$  gegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurden die elektroporierten Zellen in Medium aufgenommen und in gewünschter Konzentration in Gewebekulturschalen ausgesät. Um die Entstehung infektiöser Viren verfolgen zu können, wurde täglich überprüft, ob sich ein ZPE entwickelt. Außerdem wurden täglich je 500 µl Zellkulturüberstand entnommen und sich darin befindliche Zellen für 5 min bei 2300 x g abzentrifugiert. Der geklärte Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für spätere Untersuchungen bei -70°C aufbewahrt.

<u>AccuGENE®-PBS:</u>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,23 mg
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	890,00 mg
	NaCl	8770,00 mg
	ad 1000 ml aqua dest., pH 7,4	

### **2.2.4.4 „Infectious center assay“**

Mittels eines sogenannten "infectious center assays" (ICA) lässt sich die Effizienz einer EP, bzw. die spezifische Infektiosität der bei der EP eingesetzten RNA bestimmen. Pro EP-Ansatz wurden nichtelektroporierte Zellen in eine Platte mit 6 Kavitäten ( $5 \times 10^5$  Zellen pro Kavität) ausgesät. Diese bilden einen Zellrasen, der durch Infektion mit GFV plaqueartig zerstört werden kann. Die nichtelektroporierten Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen ( $1 \times 10^{-2}$ ,  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $2 \times 10^{-5}$  und  $2 \times 10^{-6}$ ) elektroporierter Zellen vermischt, was im Falle der Entstehung infektiöser Viren zur Ausbildung von Plaques führte. Etwa 5 h nach der EP, wenn sich die Zellen am Boden der Gewebekulturplatten festgesetzt hatten, wurde das

Medium entfernt, und durch 0,6% Agarose in MEM mit 2% FCS und 1 x Penicillin und Streptomycin ersetzt. Diese Übersichtung erlaubt den Zellen zu einem dichten Zellrasen heranzuwachsen, verhindert jedoch, dass sich Virus über das Medium verteilt und auf alle Zellen übergreift. Durch die Agaroseübersichtung kann sich Virus nur über direkten Zellkontakt ausbreiten, sodass später einzelne Plaques sichtbar werden. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C wurden je 2 ml 7%iges Formaldehyd für 30 min auf die Agaroseübersichtung gegeben. Hierdurch erfolgte sowohl die Zellfixierung als auch die Virusinaktivierung. Nach Entfernung von Fixativ und Übersichtung wurden die Zellen für 10 min mit Kristallviolett-Lösung (1% Kristallviolett in 20%igem EtOH) angefärbt. Anschließend wurden die 6-Kavitäten-Platten unter Wasser ausgewaschen. Nun konnten die Plaques gezählt und die spezifische Infektiosität der elektroporierten RNA errechnet werden. Dazu wurde folgende Formel eingesetzt:

$$\text{PFU}/\mu\text{g RNA} = \text{Plaqueszahl pro ml} \times 10^3 \times \mu\text{g eingesetzte RNA}^{-1}$$

#### **2.2.4.5 Indirekte Immunfluoreszenz**

Um die Replikation des GFV in elektroporierten bzw. infizierten Zellen nachzuweisen oder Proteine in transfizierten Zellen zu detektieren, wurde die indirekte Immunfluoreszenz (IF) durchgeführt. Hierbei bindet ein erster, proteinspezifischer AK an virale Antigen. Im zweiten Schritt bindet ein Fluorescein-5-isothiocyanat markierter (FITC) AK an den ersten AK, wodurch das zu detektierende Protein unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar wird. Zur Durchführung der IF wurde je nach Experiment eine unterschiedliche Zahl an BHK-J-Zellen ausgesät.

##### IF nach EP

Es wurden  $4 \times 10^4$  elektroporierte Zellen pro Kavität in eine Platte mit 96 Kavitäten ausgesät und 24 h nach der EP für die IF fixiert.

##### IF nach Infektion

Pro Kavität wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in eine 96-Kavitäten-Platte gesät, am nächsten Tag infiziert (siehe 2.2.4.7) und 24 h später für die IF fixiert.

##### IF nach Lipofektion

Es wurden  $5 \times 10^4$  Zellen pro Kavität in einer 96-Kavitäten-Platte ausgesät, am darauffolgenden Tag transfiziert (siehe 2.2.4.9) und 24 h später für die IF fixiert.

Vor der Fixierung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen je nach Versuchsziel durch Aceton/Methanol oder Paraformaldehyd fixiert.

#### Aceton/Methanol

Durch 20 minütige Inkubation bei -20°C mit einem 1:1 Aceton/Methanol-Gemisch wurden die Zellen fixiert und gleichzeitig permeabilisiert. Anschließend wurde die Platte bei RT getrocknet.

#### Paraformaldehyd

Die Zellen wurden mit 4%igem Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Nach anschließendem Waschen mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung sämtlicher Membranen durch Zugabe von 0,1% Triton X 100 (15 min, 4°C). Alternativ erfolgte eine Behandlung mit 2 µg/ml Digitonin (15 min, 4°C), wodurch lediglich die Zellmembran, nicht aber die ER-Membran permeabilisiert wird. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von BSA (0,5%) wurde 5 min bei RT blockiert.

Vor und nach der einstündigen Inkubation des ersten AK bei 37°C wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten, FITC konjugierten AK erfolgte ebenfalls für 1 h bei 37°C. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLS) beurteilt und mit Hilfe der Kamera (Leica 3CCD MTI) und des Computerprogrammes Scion Image 1,62 fotografiert. Die verwendeten AK und entsprechenden Verdünnungen finden sich in Tabelle 3 (siehe 2.1.6).

#### **2.2.4.6 Lokalisation des Endoplasmatischen Retikulums**

Um zu untersuchen, ob ein bestimmtes durch IF nachzuweisendes Protein im ER lokalisiert ist, wurde das ER der transfizierten Zellen mit ER-Tracker™ Blue-White DPX (Fa. Molecular Probes) (1:1000 in Zellmedium verdünnt) angefärbt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 37°C wurde das Medium entfernt, und die Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 4% Formaldehyd für 20 min bei RT. Nach anschließendem Waschen mit PBS wurden die Zellen durch Zugabe von 0,01% Triton X 100 10 min bei RT permeabilisiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Behandlung mit dem ersten spezifischen AK und anschließend mit dem FITC konjugierten, zweiten AK (siehe Tab. 3 unter 2.1.6). Unter dem IF-Mikroskop (Leica TCS NT) wurde der FITC-gekoppelte AK durch eine Wellenlänge von 520 nm angeregt, während der ER-Tracker-Farbstoff (DAPI) bei einer Wellenlänge von

461 nm fluoreszierte. Die separat fotografierten Bilder (Leica DFC 350FX) wurden später am Computer mit Hilfe des Programmes OpenLab 4.0.4 übereinandergelegt, wodurch die Lokalisation von Protein und ER-Membran verglichen werden konnte.

#### **2.2.4.7 Infektion von Zellen mit GFV**

Sollten Zellen mit GFV infiziert werden, wurden zunächst ca.  $3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in gewünschten Zellkulturschalen ausgesät. Nach dem Absetzen der Zellen erfolgte die Infektion in 20% des normalen Kulturvolumens mit gewünschter Infektionsdosis ("multiplicity of infection" = moi), wobei der Virusüberstand gegebenenfalls in PBS mit 1% FCS verdünnt wurde. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde der Überstand entfernt und durch Medium ersetzt. Je nach Experiment wurden die Zellen bzw. der Überstand zu bestimmten Zeiten nach der Infektion für spätere Versuche geerntet bzw. fixiert.

#### **2.2.4.8 Titration**

Um die Anzahl von plaquebildenden Einheiten (PFU = "plaque forming units") pro ml eines Virusstocks zu ermitteln, wurde dieser titriert. Nach der Infektion (siehe 2.2.4.7) mit je 200 µl verschiedener Verdünnungen (0 bis  $1 \times 10^{-8}$ ) wurden die Zellen mit 0,6% Agarose in MEM mit 2% FCS und 1 x Penicillin und Streptomycin überschichtet. Nach drei Tagen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen mit 7% Formaldehyd 20 min lang bei RT fixiert und anschließend mit Kristallviolett (1% Kristallviolett in 20%igem EtOH) angefärbt. Der Titer wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Infektiosität [PFU/ml]} = \text{Gezählte Plaques} \times 5 \times 10^{\text{Verdünnungsstufe}}$$

#### **2.2.4.9 Lipofektion von Plasmid-DNA in Zellen**

Eine andere Transfektionsmöglichkeit neben der EP (siehe 2.2.4.3) ist die Lipofektion. Hierbei binden negativ geladene DNA-Moleküle durch elektrostatische Wechselwirkung an kationische Lipide. Es bildet sich ein DNA-Liposomenkomplex, welcher mit der ähnlich aufgebauten Zellmembran fusioniert, wodurch die DNA ins Zellinnere gelangt. Für die Lipofektion wurden Zellen in gewünschte Kulturschalen so eingesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu 90% konfluent waren. Zunächst wurden die Zellen mit T7-Vaccinia-Virus (moi = 2) für 1 h infiziert, sodass eine Expression der Bakteriophagen-T7-Polymerase gewährleistet war. Dies ermöglichte die Expression eines unter der Kontrolle des T7-



Promotors stehenden Zielgens (Alexander et al., 1992). Während der einstündigen Infektion wurde Plasmid-DNA in Reaktionsgefäßen mit Earle's MEM ohne jegliche Zusätze vermischt (Mengenangaben siehe Tab. 18). In einem separaten Reaktionsgefäß wurde "Lipofectamine 2000" mit Medium für 5 min bei RT vorinkubiert. Dann wurde das "Lipofectamine 2000"-Mediumgemisch zu dem vorbereiteten DNA-Mediumgemisch gegeben. Während einer 20 minütigen Inkubationszeit bei RT bildete sich der DNA-Liposomenkomplex und konnte dann nach der Entfernung des T7-Vaccinia-Virus Überstandes auf die Zellen gegeben werden. Nach 4-5 h Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsgemisch entfernt und durch Zellmedium ersetzt. Um die Transfektionseffizienz überprüfen zu können, wurde stets pTM-EGFP-DNA in Kontrollzellen transfiziert, die 24 h nach der Transfektion unter dem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLS) betrachtet wurden. Durch UV-Licht der Wellenlänge 520 nm wurden nur die EGFP exprimierenden Zellen zur Fluoreszenz angeregt. Daher konnte das Verhältnis von transfizierten zu nicht transfizierten Zellen abgeschätzt werden.

**Tabelle 18: Bei Lipofektion eingesetzte Mengen von DNA und "Lipofectamine 2000"**

<b>Kavitäten</b>	<b>DNA in Medium</b>	<b>"Lipofectamine 2000" in Medium</b>
<b>96</b>	0,2 µg in 25 µl	0,5 µl in 25 µl
<b>24</b>	0,8 µg in 50 µl	2,0 µl in 50 µl
<b>6</b>	4,0 µg in 250 µl	10 µl in 250 µl

## **2.2.5 Proteinanalytische Methoden**

### **2.2.5.1 Radioimmunpräzipitation**

Unter einer Präzipitation versteht man die Ausfällung eines löslichen Antigens unter Verwendung von spezifischem Antikörper. Nach Transfektion oder Infektion (siehe 2.2.4.3, 2.2.4.7, 2.2.4.9) wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und eine halbe Stunde lang in Labelmedium (1 x MEM with Earle's salts ohne Methionin, ohne Cystein, mit L-Glutamin (2 mM) und 2% FCS) inkubiert. Aufgrund des fehlenden Cysteins und Methionins entstand während des sogenannten "Hungerns" ein Mangel an diesen beiden Aminosäuren. Danach wurde <sup>35</sup>S-markiertes Cystein/Methionin in Labelmedium für 2-5 h auf die Zellen gegeben (10 µCi pro 1 x 10<sup>5</sup> Zellen in 35% des normalen Volumens), sodass neu translatierte Proteine radioaktiv markiert wurden. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen bei nicht denaturierender Immunpräzipitation in 50 µl/cm<sup>2</sup> Tritonlysispuffer lysiert. Durch 2 minütige

Zentrifugation bei 16000 x g und 4°C wurden die Zellkerne pelletiert, und der Überstand konnte in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden. Zur Immunpräzipitation wurden jeweils 100 µl Zelllysate, 200 µl 2 x TNA, 100 µl aqua dest. und eine bestimmte Menge AK (siehe Tabelle 3 unter 2.1.6) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Zum "Fangen" des AK-Protein-Komplexes wurde diese Probe je nach Herkunft des eingesetzten AKs mit 50 µl Sepharose-A, -G (Fa. Amersham) oder 20 µl Pansorbin (Fa. Calbiochem) für 1 h bei 4°C inkubiert. Zuvor wurde das AK-bindende Protein 3 mal in 1 x TNA gewaschen (Zentrifugationen bei 2300 x g und 4°C). Anschließend wurde der Komplex aus Fänger, Protein und AK pelletiert (16000 x g, 1 min) und 3 mal mit 600 µl 1 x TNA gewaschen. Nach einem letzten Waschschrift mit 1 x TNE wurde das Pellet in 20 µl Laemmli Ladepuffer aufgenommen, mit 5% β-Mercaptoethanol versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Durch das Erhitzen und die reduzierende Wirkung des β-Mercaptoethanols wurden Disulfidbrückenbindungen bisher nativ gefalteter Proteine gespalten. Nach dem Abkühlen der Proben wurden diese 2 min bei 16000 x g zentrifugiert, um das unlösliche Protein A/G bzw. das Pansorbin von den löslichen, nachzuweisenden Proteinen zu trennen. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese analysiert (siehe 2.2.5.3).

<u>Tritonlysispuffer:</u>	Triton X 100	0,50%
	Tris-Cl (pH 7,5)	50 mM
	NaCl	200 mM
	EDTA	1 mM
<u>2 x TNA:</u>	Triton X 100	0,50%
	BSA	2 mg/ml
	Tris-Cl (pH 7,5)	100 mM
	NaCl	400 mM
	EDTA	2 mM
<u>1 x TNE:</u>	Tris-Cl (pH 7,5)	50 mM
	EDTA	1 mM
	NaCl	150 mM

<u>Laemmli Ladepuffer:</u>	Tris-Cl (pH 6,8)	50 mM
	Glycerol	10,00%
	SDS	2,00%
	Bromphenolblau	0,05%

### **2.2.5.2 Deglykosylierung von Proteinen**

Zur Abspaltung von N-glykosydisch gebundenen Seitenketten wurde das PNGaseF-Kit der Fa. NEB verwendet. Das nach der nicht denaturierenden Zelllyse und Aufarbeitung der Probe (siehe 2.2.5.1) erhaltene Sepharose-A-Pellet wurde statt in Laemmli Ladepuffer in dem Deglykosylierungsansatz (Tab. 19) aufgenommen.

**Tabelle 19: Deglykosylierungsansatz**

H <sub>2</sub> O	15,75 µl
Denaturierungspuffer	1,75 µl
10% NP-40	2,50 µl
10 x G7 Reaktionspuffer	2,50 µl
PNGaseF	2,50 µl

Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden 25 µl 2 x Laemmli Ladepuffer zugegeben. Durch 10 minütiges Erhitzen auf 95°C wurde denaturiert und anschließend für 2 min bei 16000 x g zentrifugiert. Der nun sepharosefreie Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und später in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt.

### **2.2.5.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS maskiert die Eigenladungen der Proteine und verändert deren native Konformation. Daher werden in Gelen aus vernetztem Polyacrylamid Proteine in einem elektrischen Feld ausschließlich proportional zu ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte mit Hilfe des Mini-Trans-Blot<sup>®</sup> Elektrophorese-Systems der Fa. Biorad. Zwei Glasplatten wurden mit 96% EtOH gereinigt und in einem Gelgießstand eingespannt. Das untere Trenngel (10-14%ig) wurde gegossen und bis zur vollständigen Polymerisation mit aqua dest. überschichtet. Nach 2 fachem Waschen mit aqua dest. wurde über das Trenngel ein Sammelgel (4%) gegossen, in das ein Kamm eingesetzt wurde. Die entstandenen Geltaschen wurden nach der Polymerisation des Sammelgels dreimal mit Laemmli Laufpuffer

gewaschen. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingesetzt. Letztere wurde mit Laemmli Laufpuffer gefüllt, und die Geltaschen mit den vorbereiteten Proben beladen. Eine Spannung von 80 V wurde angelegt, bis die Proben ins Trenngel gelaufen waren. Die Auftrennung der Proteine erfolgte dann bei 120 V. Durch das Auftragen eines gefärbten Proteinmarkers (Fa. Fermentas) konnte die Auftrennung verfolgt und, der erwarteten Proteingröße entsprechend, gestoppt werden. Um die Proteingröße von radioaktiv markierten Proben abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein radioaktiver  $^{14}\text{C}$ -Marker (Fa. Amersham) aufgetragen. Mit radioaktiv markierten Proben beladene SDS-Polyacrylamidgele wurden nach der Elektrophorese für 5 min in DMSO gewaschen, für 1 h in 2% 2,5-Diphenyloxazol (= PPO) (in DMSO) inkubiert, wodurch das spätere Signal verstärkt wurde. Nach der Rehydration in aqua dest. wurde das Gel schließlich unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Ein Röntgenfilm (Kodak, BioMax XAR Film) wurde aufgelegt, nach drei Tagen entwickelt und ausgewertet. Die Analyse der nicht radioaktiven Gele erfolgte per Western Blot (siehe 2.2.5.4).

<u>Trenngel:</u>	Rotiphorese®Gel 40 (37,5 : 1)	10-14%
	Tris (pH 8,8)	0,375 M
	SDS	0,10%
	APS	0,10%
	TEMED	0,04%
<u>Sammelgel:</u>	Rotiphorese®Gel 40 (37,5 : 1)	4,0%
	Tris (pH 6,8)	0,125 M
	SDS	0,10%
	APS	0,10%
	TEMED	0,10%
<u>Laemmli Laufpuffer:</u>	Tris	0,200 M
	Glycin	1,500 M
	SDS	0,40%

#### **2.2.5.4 Western Blot**

Beim Western Blot werden in einer SDS-PAGE (siehe 2.2.5.3) aufgetrennte Proteingemische aus der Polyacrylamidmatrix über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Bei diesem Vorgang bleibt das Muster der

elektrophoretischen Auftrennung erhalten, das an den Proteinen angelagerte SDS geht aber verloren. Daher können die Proteine renaturieren, teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, und von Antikörpern erkannt werden. Der sekundäre AK ist mit "horseradish peroxidase" (HRP) gekoppelt, welche verschiedene Substrate umsetzen kann. Als Produkt entsteht um den Antigen-AK-Komplex ein chemilumineszierendes Präzipitat, wodurch schließlich ein Film belichtet wird. Nach der Auftrennung der Proteine wurden die SDS-Polyacrylamidgele aus der Gelkammer entfernt und auf eine Nitrocellulosemembran gelegt. Von beiden Seiten mit Filterpapier umgeben, wurde das Gel zur Kathode, die Membran zur Anode gerichtet, in die Blottingapparatur eingespannt. Der Proteintransfer erfolgte eine Stunde lang unter einer Spannung von 100 V in Western Blot Transferpuffer und unter Kühlung durch Eis. Danach wurden die auf die Nitrocellulosemembran transferierten Proteine 2 min in Fast-Green-Lösung (2% Fast-Green in 10%iger Essigsäure) angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch 10%ige Essigsäure entfernt. Um die freien Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde letztere über Nacht in 1:10 verdünntem Roti®Block inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran je 10 min dreimal mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation bei RT mit dem primären AK, verdünnt in PBS/0,05% Tween (siehe Tabelle 3 unter 2.1.6). Dann wurde die Membran erneut gewaschen und mit dem sekundären, HRP-konjugierten AK inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween und einem Waschschrift mit 1 M NaCl in PBS wurde die Membran in 2 ml Chemilumineszenz-Substratlösung (Fa. Pierce, Rockford) für 5 min inkubiert. Die Nitrocellulosemembran wurde in eine Plastikfolie eingeschlagen. Je nach Stärke der Chemilumineszenz wurde ein Röntgenfilm (Kodak, BioMax XAR Film) für 1-600 s aufgelegt. Nach der Entwicklung des Films konnten mit Hilfe eines gefärbten Proteinmarkers die Proteingrößen abgeschätzt werden.

<u>Western Blot Transfer-Puffer:</u>	Tris	3,03 g
	Glycin	14,40 g
	Methanol	200 ml
	ad 1000 ml aqua dest.	

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Herstellung und Charakterisierung von GFV-NS2A "charged-to-alanine-scanning" Mutanten**

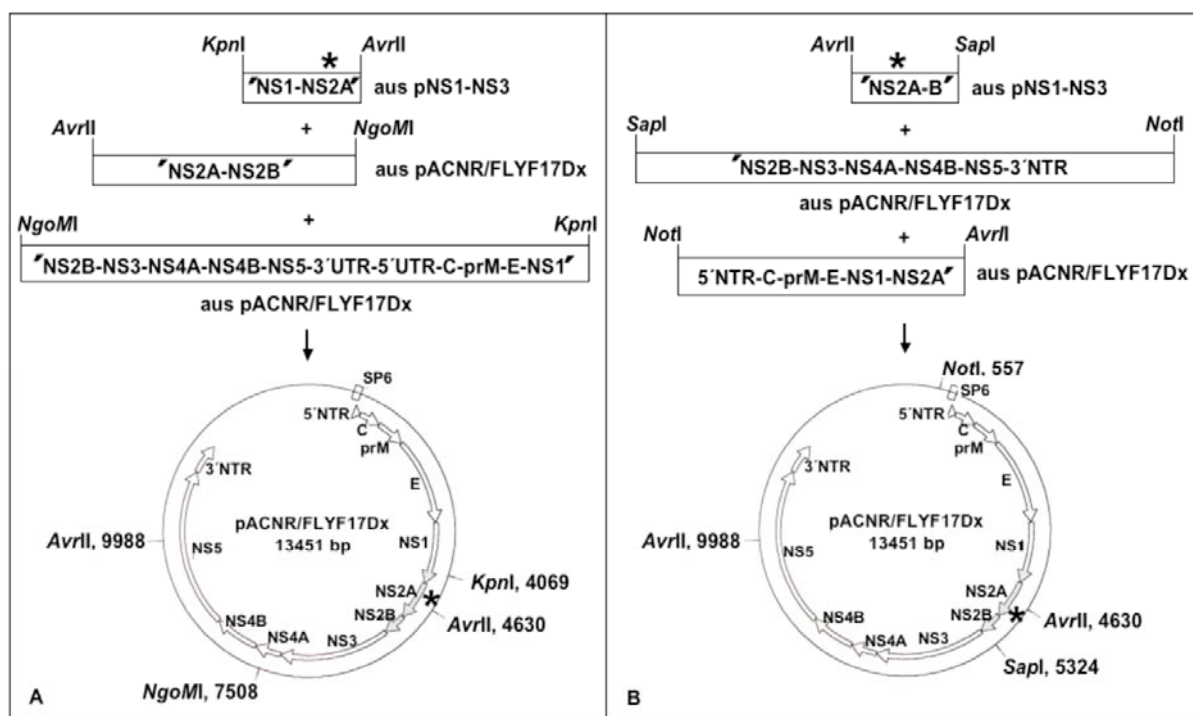
Über Funktion und Eigenschaften des GFV-Nichtstrukturproteins NS2A ist bisher wenig bekannt, allerdings scheint dieses Protein eine Rolle bei der Bildung infektiöser Partikel zu spielen. Letztere können nach gezielter Mutation der Aminosäure Lysin an Position 190 im NS2A zu Serin nicht mehr erzeugt werden, obwohl die Replikation unbeeinflusst bleibt. Außerdem werden weiterhin subvirale Partikel gebildet (Kümmerer & Rice, 2002). Der beschriebene Defekt wird in *trans* durch zur Verfügung gestelltes WT-NS1-2A komplementiert. Die selektive Hemmung der Bildung von infektiösen Partikeln wurde auch für weitere Mutanten im Bereich der NS2A $\alpha$ -Spaltstelle beschrieben (Kümmerer & Rice, 2002). Nach Mutation der Aminosäure Glutamin an Position 189 des NS2A zu Serin konnte die Infektiosität durch Ausbildung einer zweiten, neuen Mutation in der Helikasedomäne des NS3 zurückerlangt werden (Kümmerer & Rice, 2002). Dies lässt eine Interaktion der beiden Proteine NS2A und NS3 vermuten.

In dieser Arbeit war daher von Interesse zu untersuchen, ob noch andere Bereiche des GFV-NS2A bei der Partikelbildung eine Rolle spielen. Zudem sollte NS2A hinsichtlich weiterer Funktionen und Eigenschaften analysiert werden. Dazu wurde ein sogenanntes "charged-to-alanine-scanning" durchgeführt, bei dem geladene Aminosäuren (AS) durch ungeladenes Alanin ersetzt werden. Die ausgetauschten AS sollten möglichst innerhalb eines geladenen Clusters liegen, da dann der entsprechende Proteinabschnitt aufgrund seiner Hydrophilität mit hoher Wahrscheinlichkeit exponiert liegt. Durch den AS-Austausch zu Alanin werden zwar selten Konformation oder Stabilität des Proteins verändert, aber Protein-Protein-Interaktionen können beeinflusst werden (Wertman et al., 1992). Somit kann man Hinweise auf die Funktion und mögliche Interaktionspartner des zu untersuchenden Proteins erhalten.

##### **3.1.1 Herstellung der GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten**

Der cDNA-Gesamtklon pACNR/FLYF17Dx enthält auf einen SP6-Promotor folgend die zum GFV-Genom komplementäre DNA. Diese kann *in vitro* zu genomischer RNA transkribiert werden. Wird letztere in Zellen eingeschleust, so entwickeln sich infektiöse GFV-Partikel. Auf Basis dieses cDNA-Gesamtklones können gezielt Mutationen eingefügt werden, sodass

die Erzeugung von Virusmutanten möglich ist. Die gewünschten Mutationen wurden zunächst durch gerichtete Mutagenese (Primer siehe Tab. 20) in einen Vorklon, der die für die NS1-2A-2B-3-Region kodierende Sequenz des cDNA-Gesamtklons pACNR/FLYF17Dx enthielt, eingefügt. War die Mutagenese im 5'-terminalen Bereich des NS2A-Gens erfolgt, wurde die DNA des Vorklons mit Hilfe der Enzyme *KpnI* und *AvrII* restringiert (Abb. 6A). Durch eine Dreifragmenteligation des dabei entstandenen Fragments mit den durch Restriktion der Plasmid-DNA von pACNR/FLYF17Dx durch *AvrII* und *NgoMI* bzw. *NgoMI* und *KpnI* erzeugten Fragmenten wurde die gewünschte Mutation in den cDNA-Gesamtklon eingefügt (Abb. 6 A). Lagen erzeugte Mutationen im 3'-terminalen Bereich des NS2A-Gens vor, wurden diese durch *AvrII* und *SapI* ausgeschnitten und mit den beiden Fragmenten pACNR/FLYF17Dx (*SapI*-*NotI*) und pACNR/FLYF17Dx-*NotI*-*AvrII* ligiert (Abb. 6 B). Die erfolgreiche Mutagenese wurde jeweils durch Sequenzierung bestätigt. In Abbildung 7 ist die AS-Abfolge des GFV-NS2A-Proteins gezeigt, wobei die in verschiedenen Kombinationen zu Alanin mutagenisierten AS gekennzeichnet sind.



**Abbildung 6A und B: Klonierungsschemata zur Herstellung der NS2A-"charged-to-alanine" Mutanten.** Im oberen Bildabschnitt sind jeweils die drei Fragmente als Balken dargestellt, die zur Klonierung des GFV-Gesamtklons mit Mutation im NS2A erforderlich waren. Angezeigt sind auch die hierzu verwendeten Enzyme. Die Kreise symbolisieren jeweils das Ligationsergebnis. Hier sind durch Pfeile die für die GFV-Gene kodierenden Bereiche angezeigt. Sternchen markieren jeweils die mutagenisierte Stelle im NS2A. Striche kennzeichnen durch Restriktion getrennte Bereiche. Unter **A** wird die Klonierungsstrategie für im N-terminalen NS2A-Bereich erzeugte Mutationen, unter **B** die für im C-terminalen NS2A-Bereich eingefügten Mutationen gezeigt.

**Tabelle 20: Zur gerichteten Mutagenese eingesetzte Primer.** Ausgetauschte Nukleotide sind hervorgehoben.

Mutation	Nukleotide	Primer#
R22A-K23A	(agg> <b>gcg</b> )+(aaa> <b>gca</b> )	BNI 363 und BNI 364
R22A-K23A-R24A	(agg> <b>gcg</b> )+(aaa> <b>gca</b> )+(aga> <b>gca</b> )	BNI 67 und BNI 68
R22A-R24A	(agg> <b>gcg</b> )+(aga> <b>gca</b> )	BNI 5 und BNI 6
K23A	(aaa> <b>gca</b> )	BNI 271 und BNI 272
K23A-R24A	(aaa> <b>gca</b> )+(aga> <b>gca</b> )	BNI 365 und BNI 366
K28A	(aag> <b>gcg</b> )	BNI 69 und BNI 70
D50A-K53A	(gat> <b>gct</b> )+(aaa> <b>gca</b> )	BNI 1 und BNI 2
D70A	(gac> <b>gcc</b> )	BNI 3 und BNI 4
R83A	(aga> <b>gca</b> )	BNI 9 und BNI 10
R93A	(agg> <b>gcg</b> )	BNI 71 und BNI 72
R99A-E100A-R101A	(cgg> <b>gcg</b> )+(gaa> <b>gca</b> )+(cgc> <b>gcc</b> )	BNI 11 und BNI 12
K124A	(aag> <b>gcg</b> )	BNI 13 und BNI 14
R142A-K143A	(agg> <b>gcg</b> )+(aaa> <b>gca</b> )	BNI 15 und BNI 16
E162A-R164A	(gag> <b>gcg</b> )+(aga> <b>gca</b> )	BNI 7 und BNI 8
K184A-D185A	(aag> <b>gcg</b> )+(gac> <b>gcc</b> )	BNI 17 und BNI 18

**NS2A**

```

GGAGAAATACATGCTGTCCCTTTGGTTGGTGAGCATGATGATAGCAATGGAAGTGGTCCTAAGGAAAAGACAGGGACCAAAGCAAATGTTGGTTGGA
G E I H A V P F G L V S M M I A M E V V L R K R Q G P K Q M L V G
1      5      10     15     22 23 24     28

GGAGTAGTGCTCTTGGGAGCAATGCTGGTCGGGCAAGTAACTCTCCTTGATTGCTGAAACTCACAGTGGCTGTGGGATTGCATTTCCATGAGATGAAC
G V V L L G A M L V G Q V T L L D L L K L T V A V G L H F H E M N
35     40     45     50     53     60     65

AATGGAGGAGACGCCATGTATATGGCGTTGATTGCTGCCTTTTCAATCAGACCAGGGCTGCTCATCGGCTTTGGGCTCAGGACCCCTATGGAGCCCTCGG
N G G D A M Y M A L I A A F S I R P G L L I G F G L R T L W S P R
70     75     80     83     90     93     99

GAACGCCTTGTGCTGACCCTAGGAGCAGCCATGGTGGAGATTGCCCTTGGGTGGCGTGATGGCGGCCTGTGGAAGTATCTAAATGCAGTTTCTCTCTGC
E R L V L T L G A A M V E I A L G G V M G G L W K Y L N A V S L C
100101     105     110     115     120     124     130

ATCCTGACAATAAATGCTGTGCTTCTAGGAAAGCATCAAATACCATCTTGCCCTCATGGCTCTGTTGACACCTGTCACTATGGCTGAGGTGAGACTT
I L T I N A V A S R K A S N T I L P L M A L L T P V T M A E V R L
135     142143     150     155     162 164

GCCGCAATGTTCTTTTGTGCCGTGGTTATCATAGGGGTCCTTACCAGAAATTTCAAGGACACCTCCATGCAGAAGACTATACCTCTGGTGGCCCTCACA
A A M F F C A M V I I G V L H Q N F K D T S M Q K T I P L V A L T
170     175     180     184185     190     195

CTCACATCTTACCTGGGCTTGACACAACCTTTTGGGCTGTGTGCATTCTGGCAACCCGCATATTTGGGCGAAGG
L T S Y L G L T Q P F L G L C A F L A T R I F G R R
200     205     210     215     220
    
```

**Abbildung 7: AS-Abfolge des GFV-NS2A-Proteins und eingefügte "charged-to-alanine" Mutationen.** Die Abbildung zeigt die GFV-NS2A Nukleotid- und AS-Sequenz. Hervorgehobene AS wurden in verschiedenen Kombinationen jeweils gegen Alanin ausgetauscht.

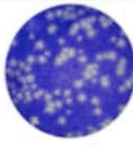
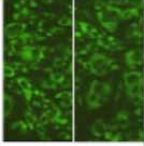

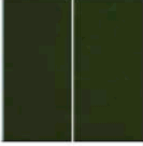
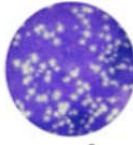
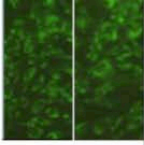

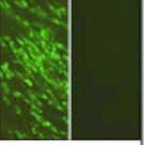

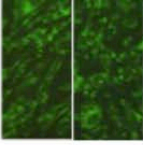
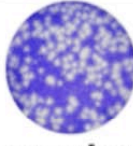
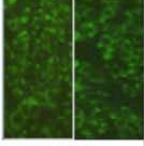

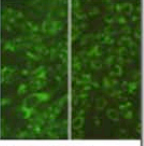
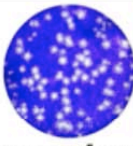
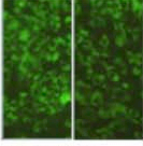

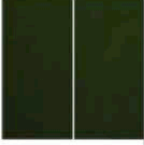

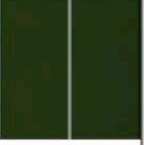
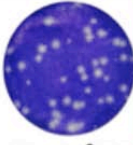
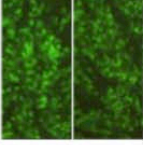
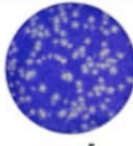
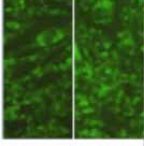

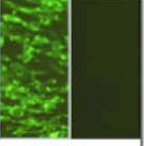
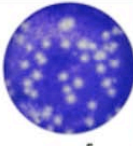
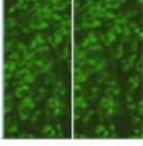

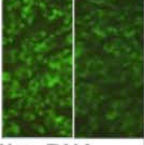



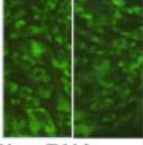


### **3.1.2 Ermittlung der Phänotypen der GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten**

Nach der Linearisierung durch *Xho*I-Restriktion, einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolfällung wurde die cDNA des GFV-Gesamtklons *in vitro* transkribiert. Je 3 µg der erzeugten RNA wurden durch Elektroporation (EP) in BHK-J-Zellen eingeschleust. Zur Ermittlung der spezifischen Infektiosität der RNA wurde ein "infectious center assay" (ICA) durchgeführt. Nach EP wurde mittels Lichtmikroskop jeweils im Abstand von 24 h überprüft, ob sich ein zytopathischer Effekt (ZPE) entwickelte. Zum gleichen Zeitpunkt wurden Proben aus dem Zellkulturüberstand zur Titerbestimmung entnommen. Separat nach der Elektroporation eingesäte Zellen, sowie mit Zellkulturüberstand infizierte Zellen wurden 24 h nach Elektroporation bzw. Infektion zur Immunfluoreszenz (IF) eingesetzt, um Replikation und Infektiosität der GFV-Mutanten zu detektieren. Abbildung 8 zeigt einen Überblick der Phänotypen der einzelnen "charged-to-alanine" Mutanten.

Die erzeugten Mutationen ließen sich in folgende drei Gruppen unterteilen:

1. Für das Virus letale Mutationen.
2. Mutationen, die weder Einfluss auf Replikation noch Infektiosität hatten.
3. Mutationen, die die Bildung infektiöser Partikel verhinderten obwohl eine RNA-Replikation stattfand.

Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion	Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion	Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion
GFV-WT	 5,0 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA					mock	 0,0 PFU	
R22A K23A	 5,0 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		R22A K23A R24A	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		R22A R24A	 5,0 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA	
K23A	 6,7 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		K23A R24A	 2,8 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		K28A	 3,3 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA	
D50A K53A	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		D70A	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		R83A	 1,7 x 10 <sup>6</sup> PFU/μg RNA	
R93A	 6,7 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		R99A E100A R101A	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		K124A	 5,0 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA	
R142A K143A	 4,3 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		E162A R164A	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		K184A D185A	 1,0 x 10 <sup>6</sup> PFU/μg RNA	

**Abbildung 8: Phänotypen der GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten.** Die *in vitro* transkribierte RNA des GFV-WT bzw. der erzeugten GFV-Mutanten wurde in BHK-J-Zellen elektroporiert. Stufenweise 10fach-Verdünnungen der elektroporierten Zellen wurden zusammen mit nichtelektroporierten Zellen ausgesät und mit einem Agarose-Medium-Gemisch überschichtet (ICA). Nach drei Tagen wurden die Zellen des ICA fixiert und mit Kristallviolettlösung angefärbt. Elektroporierte Zellen sowie mit 24 h-Überstand infizierte Zellen wurden zur IF ( $\alpha$ -E 6330-mAK und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC) eingesetzt. Zahlen unter den Plaqueabbildungen geben die spezifische Infektiosität der elektroporierten RNA in PFU/μg elektroporierter RNA an.

### Letale Mutationen

Nicht lebensfähig war das GFV mit der Mutation **D50A-K53A**. Zellen, die mit RNA-Transkript dieser Virusmutante elektroporiert wurden, zeigten eine negative IF. Im ICA bildeten sich keine Plaques und auch nach mehreren Passagen entwickelte sich kein ZPE (Abb. 8). Dementsprechend konnten in den Zellkulturüberständen 24, 48 und 72 h nach der EP keine plaquebildenden Einheiten ("Plaque forming Units" = PFU) detektiert werden

(Tab. 21). Negative IF zeigten sich ebenfalls nach EP der *in vitro* transkribierten GFV-RNA mit den Mutationen **D70A** bzw. **E162A-R164A**. Im ICA konnten keine Plaques detektiert werden (Abb. 8). Dennoch entwickelte sich ein ZPE. Bei Mutante D70A war bereits 24 h nach EP ein Titer von  $1,2 \times 10^3$  PFU/ml nachweisbar. Für Mutante E162A-R164A konnte erst 48 h nach EP ein Titer von  $1,8 \times 10^2$  PFU/ml bestimmt werden (Tab. 21).

**Tabelle 21: Überblick der letalen Mutationen und Rück- bzw. Wiedergewinnung infektiöser Viren.**

Mutation	Spezifische Infektiosität (PFU/ $\mu$ g RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Infektion mit 24 h-Überstand
		24 h	48 h	72 h		
GFV-WT	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	+	+
mock	0	0	0	0	-	-
<b>D50A</b> <b>K53A</b>	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$<5$	$<5$	-	-
<b>D70A</b>	$<3,3 \times 10^1$	$1,2 \times 10^3$	$4,0 \times 10^6$	$4,1 \times 10^7$	-	+
<b>E162A</b> <b>R164A</b>	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$1,8 \times 10^2$	$1,3 \times 10^4$	-	-

### Replizierende, infektiöse Mutanten

Ebenso wie der Wildtyp (WT) des GFV bildeten folgende Virusmutanten infektiöse Partikel: **R22A-K23A**, **R22A-R24A**, **K23A**, **K23A-R24A**, **K28A**, **R83A**, **R93A**, **K124A**, **R142A-K143A**, **K184A-D185A**. Die IF war, wie bei mit GFV-WT-RNA elektroporierten Zellen, positiv (Abb. 8). Die spezifische Infektiosität der RNA lag zwischen  $2,8 \times 10^5$  und  $1,7 \times 10^6$  PFU/ $\mu$ g RNA und ähnelte damit dem für die WT-RNA ermittelten Wert (Tab. 22). Auch die Titer der Zellkulturüberstände 24, 48 und 72 h nach EP zeigten keine große Abweichung von denen des GFV-WT mit einer Ausnahme: Der 24 h-Überstand von Mutante K23A-R24A hatte einen Titer von nur  $1,0 \times 10^3$  PFU/ml. Dagegen erzielte die Titration der Zellkulturüberstände von anderen infektiösen Mutanten Werte zwischen  $1,5 \times 10^6$  PFU/ml und  $3,5 \times 10^7$  PFU/ml. Der Titer dieser K23A-R24A-Mutante stieg auch 72 h nach der EP nicht über  $2,0 \times 10^5$  PFU/ml an, wogegen die Titer der anderen Mutanten und des GFV-WT durchschnittlich 100 fach höher lagen (siehe Tab. 22). Außerdem waren die durch diese Mutante gebildeten Plaques wesentlich kleiner als die der anderen infektiösen Mutanten und des GFV-WT (Abb. 8).

Tabelle 22: Überblick der Eigenschaften replizierender, infektiöser Mutanten.

Mutation	Spezifische Infektiosität (PFU/ $\mu$ g RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Infektion mit 24 h-Überstand
		24 h	48 h	72 h		
GFV-WT	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	+	+
mock	0	0	0	0	-	-
R22A K23A	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$1,0 \times 10^7$	+	+
R22A R24A	$5,0 \times 10^5$	$7,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	+	+
K23A	$6,7 \times 10^5$	$2,3 \times 10^7$	$9,5 \times 10^7$	$3,0 \times 10^7$	+	+
K23A R24A	$2,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^3$	$2,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$	+	+
K28A	$3,3 \times 10^5$	$1,9 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$	+	+
R83A	$1,7 \times 10^6$	$1,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7$	+	+
R93A	$6,7 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	$9,0 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$	+	+
K124A	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	+	+
R142A K143A	$4,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^6$	$6,5 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	+	+
K184A D185A	$1,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$4,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$	+	+

### Replizierende, nicht infektiöse Mutanten

Die beiden GFV-Mutanten **R22A-K23A-R24A** und **R99A-E100A-R101A** bildeten im ICA keine Plaques aus (Abb. 8). Demzufolge entstanden keine infektiösen Partikel. Da aber die IF nach EP positiv war, fand eine Replikation statt. Mangels infektiöser Partikel wurde nach Infektion von Zellen mit 24 h-Überstand keine positive IF beobachtet (Tab. 23). Während 24 h nach EP noch kein ZPE entstanden war, setzte später nach Zellpassage die Zelllyse ein. Dann konnte auch Virus im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Nach EP der *in vitro* transkribierten RNA mit der Mutation R22A-K23A-R24A konnte bereits 48 h nach EP ein Titer von  $9,3 \times 10^3$  PFU/ml detektiert werden (Tab.23). Mutation R99A-E100A-R101A entwickelte dagegen erst 48 h nach EP einen Titer von  $7,5 \times 10^2$  PFU/ml (Tab. 23).

**Tabelle 23: Überblick der replizierenden, nicht infektiösen Mutanten und Rückgewinnung infektiöser Viren.**

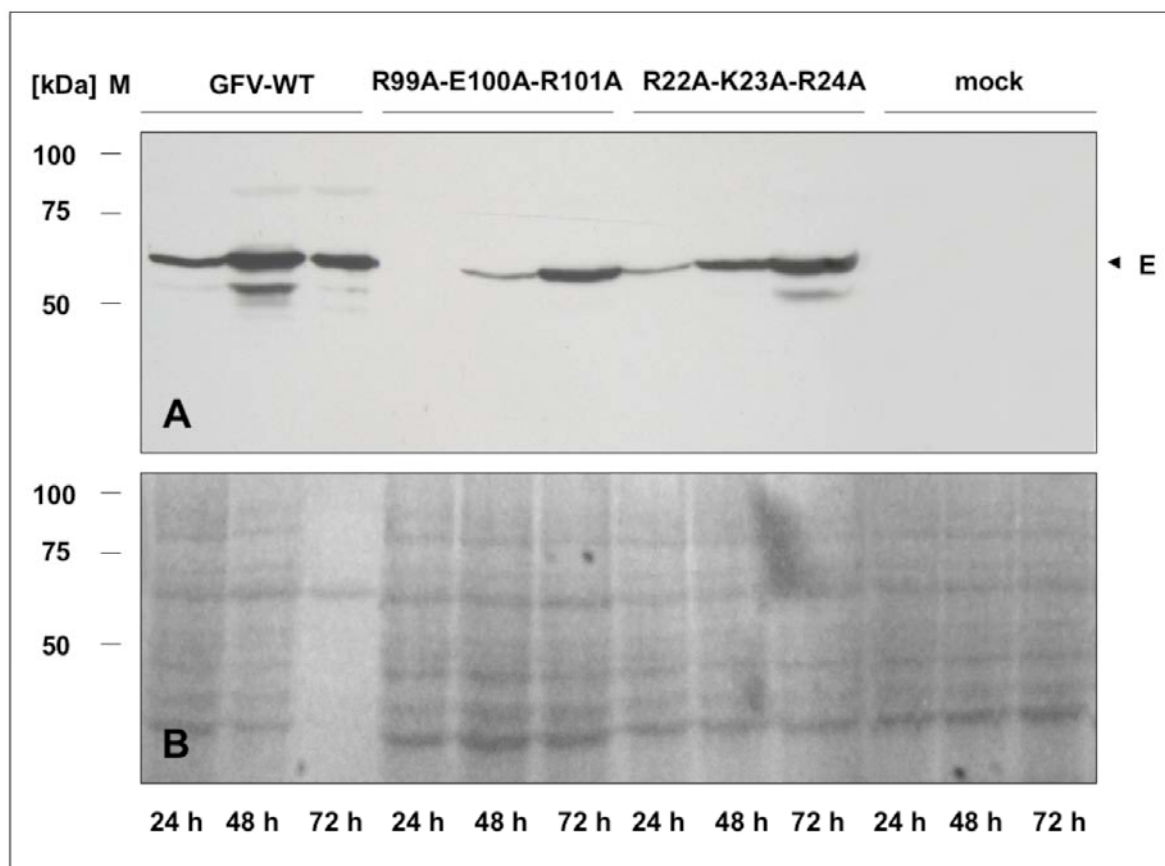
Mutation	Spezifische Infektiosität (PFU/ $\mu$ g RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Infektion mit 24 h-Überstand
		24 h	48 h	72 h		
GFV-WT	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	+	+
mock	0	0	0	0	-	-
R22A K23A R24A	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$9,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	+	-
R99A E100A R101A	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$<5$	$7,5 \times 10^2$	+	-

### **3.1.3 Charakterisierung der replizierenden, nicht infektiösen NS2A-Mutanten**

Unter 3.1.2 stellten sich zwei der untersuchten "charged-to-alanine" Mutanten als replizierend aber nicht infektiös heraus. Um das Replikationsverhalten dieser beiden Mutanten abschätzen zu können, wurde die Expression des Envelope- (E-) Proteins zu verschiedenen Zeitpunkten nach der EP verfolgt. Jeweils 24, 48 und 72 h nach EP wurden gleiche Zellmengen in Laemmli Ladepuffer lysiert. Nach einer SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, worauf das E-Protein mit Hilfe von  $\alpha$ -E-Antiserum und einem entsprechenden PO-gekoppelten Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Wie in Abbildung 9 A zu sehen, wurde das E-Protein (ca. 54 kDa groß) vom GFV-WT bereits nach 24 h exprimiert. Zwei Tage nach der EP zeigte sich eine leichte Steigerung der Expression des E-Proteins, die nach weiteren 24 h aufgrund der Zellabnahme durch Zellyse stagnierte (Abb. 9 A). Auch die GFV-Mutante **R22A-K23A-R24A** exprimiert bereits nach 24 h das E-Protein, allerdings im Vergleich zum WT-Virus in geringeren Mengen. In den folgenden 48 h stieg die Menge an exprimiertem E-Protein stetig an, was durch die zunehmende Bandenstärke zu verfolgen war (Abb. 9 A). Für die **R99A-E100A-R101A**-Mutante war nach 24 h noch kein E-Protein nachzuweisen. Nach 48 h zeigte sich eine schwache Proteinexpression. Erst 72 h nach EP konnte eine mit der 24 h-Bande des GF-WTV vergleichbare Bande detektiert werden (Abb. 9 A). Zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen zeigt Abbildung 9 B die mit Fast-Green angefärbte Nitrocellulosemembran. Wurde GFV-WT-RNA in BHK-J-Zellen eingeschleust, so war die Zellyse 72 h später bereits

so weit fortgeschritten, dass nur noch sehr wenige Zellen am Kulturschalenboden anhafteten. Daher fiel die Proteinmenge der GFV-WT-Probe 72 h nach EP gering aus. Die mit der mutierten RNA elektroporierten Zellen entwickelten dagegen keinen ZPE, weshalb die Proteinmengen der aufgetragenen Proben einander entsprachen.



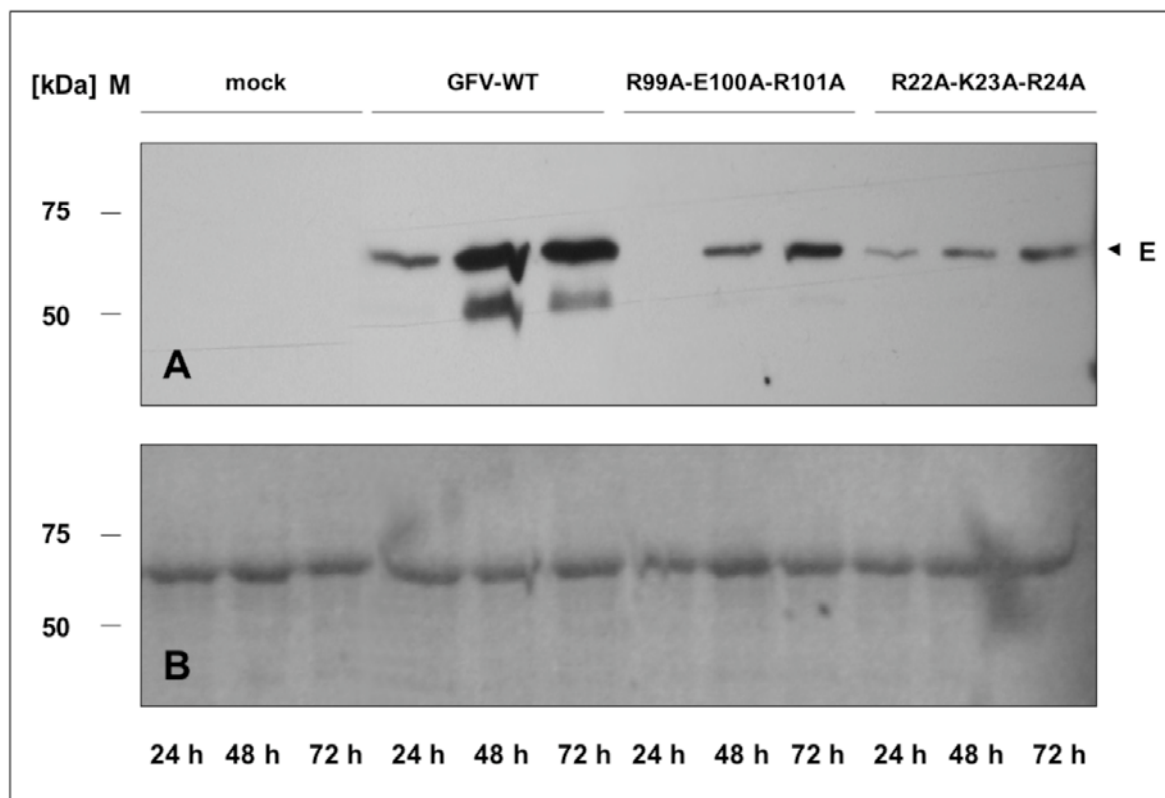
**Abbildung 9 A und B: Abschätzung des Replikationsverhaltens zweier GFV-NS2A Mutanten mittels Western Blot.** *In vitro* transkribierte RNA des GFV-WT bzw. der angegebenen Mutanten wurde in BHK-J-Zellen elektroporiert. Nach 24, 48 bzw. 72 h wurden die Zellen in Laemmli Ladepuffer lysiert. Eine Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (10%ig). M = Proteinmarker [kDa]. **A:** Auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wurde das E-Protein mittels  $\alpha$ -E-Antiserum (Kaninchen),  $\alpha$ -Kaninchen IgG-PO (Ziege) und Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. **B:** Durch Fast-Green angefärbte Nitrocellulosemembran.

Neben dem Replikationsverhalten der beiden Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A sollte außerdem untersucht werden, ob GFV-Proteine in den Zellkulturüberstand abgegeben werden. Wie bereits mittels Gradientenzentrifugation gezeigt werden konnte, wurden nach EP von *in vitro* transkribierter RNA der Mutante K190S zwar keine infektiösen Partikel gebildet aber weiterhin subvirale Partikel freigesetzt (Kümmerer & Rice, 2002). Letztere enthalten lediglich prM/M und E, während ihnen das Nukleokapsid fehlt (Stevens & Schlesinger, 1965; Schalich et al., 1996). Zum indirekten Nachweis der durch die

---

zu untersuchenden GFV-Mutanten freigesetzten subviralen Partikel wurde das E-Protein im Zellkulturüberstand mittels Western Blot nachgewiesen. Nach EP der entsprechenden *in vitro* Transkripte wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Zellkulturüberstände geerntet. Diese wurden niedrigtourig zentrifugiert, um darin befindliche GFV-Protein exprimierende Zellen zu entfernen. Um für den Nachweis per Western Blot mutmaßlich vorhandene subvirale Partikel aufzukonzentrieren, wurde der geklärte Überstand hochtourig zentrifugiert. Die im Pellet enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Anschließend erfolgte der Nachweis von E-Protein mittels  $\alpha$ -E-Antiserum (Kaninchen), einem entsprechenden PO-gekoppelten 2. Antikörper und Chemilumineszenzanalyse.

Wie in Abbildung 10 A zu sehen, konnte 24, 48 sowie 72 h nach EP mit GFV-WT-Transkript im Zellkulturüberstand das E-Protein nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu wurde zu sämtlichen untersuchten Zeitpunkten im Überstand der mit RNA von Mutante R22A-K23A-R24A elektroporierten Zellen eine geringere Menge des E-Proteins detektiert. Die mit *in vitro* Transkript von Mutante R99A-E100A-R101A elektroporierten Zellen schieden 24 h nach EP kein E-Protein in den Überstand ab. Lediglich in den 24 bzw. 48 h nach EP geernteten Proben konnte das E-Protein detektiert werden (Abb. 10 A). Durch die mit Fast-Green angefärbte Nitrocellulosemembran ist gezeigt, dass jeweils entsprechende Proteinmengen mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden (Abb. 10 B).



**Abbildung 10 A und B: Nachweis von E-Protein im Zellkulturüberstand mittels Western Blot.** *In vitro* transkribierte RNA des GFV-WT bzw. der angegebenen Mutanten wurde in BHK-J-Zellen elektroporiert. Nach 24, 48 bzw. 72 h wurden Zellkulturüberstände entnommen. Die geklärten Überstände wurden hochtourig (108565 x g, 1,5 h) zentrifugiert, wonach das Pellet in Laemmli Ladepuffer aufgenommen wurde. Die Auftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE (10%ig). M = Proteinmarker [kDa]. **A:** Auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wurde das E-Protein mittels  $\alpha$ -E-Antiserum (Kaninchen),  $\alpha$ -Kaninchen IgG-PO (Ziege) und Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. **B:** Durch Fast-Green angefärbte Nitrocellulosemembran.

### **3.1.4 Untersuchung zur Temperatursensitivität der GFV-NS2A-Mutanten**

Durch die "charged-to-alanine" Mutagenese können temperatursensitive Mutanten entstehen. Werden Wasserstoffbindungen oder elektrostatische Interaktionen an der Oberfläche des Proteins destabilisiert, können mögliche Interaktionen des zu untersuchenden Proteins thermosensitiver werden, wodurch wiederum das Überleben der entsprechenden Mutante nur bei einer hohen bzw. niedrigen Temperatur gewährleistet ist (Alber, 1989). Um zu untersuchen, ob einige der unter 3.1.2 untersuchten "charged-to-alanine" Mutanten temperatursensitiv sind, wurden die Zellen nach EP bei 32°C, 37°C und 39°C inkubiert. Dabei entsprach in allen Fällen jeweils der Phänotyp bei erniedrigter bzw. erhöhter Temperatur dem bei 37°C beobachteten Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Temperatursensitive Mutanten konnten demnach nicht gefunden werden.



### **3.1.5 Isolierung von Revertanten und Suche nach Varianten mit "second site" Mutationen**

Einige der unter 3.1.2 untersuchten "charged-to-alanine" Mutanten bildeten im ICA keine Plaques aus. Trotzdem entwickelte sich in verschiedenen Fällen später ein ZPE, was entweder auf die Rückmutation der ursprünglich eingefügten Mutation zum GFV-WT deutet oder auf die Entstehung einer kompensierenden "second site" Mutation hinweist. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen mit Überstand infiziert, der nach Entwicklung eines ZPE und vollständiger Zelllyse geerntet worden war. Aus diesen reinfizierten Zellen wurde die RNA isoliert und mittels RT-PCR und GFV-spezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Die Nukleotidsequenzen wurden anschließend hinsichtlich Rückmutationen bzw. "second site" Mutationen analysiert. Die durch Sequenzierung abgedeckten GFV-Genomabschnitte sind im Anhang in Tabelle 31 aufgelistet.

Während die Ursprungsmutation **R22A-K23A-R24A** jeweils erhalten war, wurden nach unterschiedlichen EP "second site" Mutationen im NS2B-Bereich (M39L) oder im NS3-Bereich (D3G, D343G bzw. E347A) identifiziert (Tab. 24). Nach drei unterschiedlichen EP wurde bei der **D70A**-Mutante jeweils eine Rückmutation von Alanin zu Asparaginsäure an Position 70 festgestellt (Tab. 24). Auch nach der EP der Virusmutante **R99A-E100A-R101A** konnten bei erhaltener Ursprungsmutation verschiedene "second site" Mutationen identifiziert werden. Im NS2A mutierte V118 zu Glutaminsäure. Nach drei unterschiedlichen EP wurde eine Mutation von K124E im NS2A gefunden. Weiterhin wurden nach einer EP "second site" Mutationen im 3'-NTR-Bereich gefunden: c10837g + t10844a (Tab. 24). Bei Mutation **E162A-R164A** blieben die ursprünglich eingefügten "charged-to-alanine" Mutationen erhalten. Nach zwei unterschiedlichen EP befand sich an Position 168 im NS2A statt Methionin Lysin. Einmal wurde an gleicher Stelle ein Arginin analysiert (Tab. 24).

**Tabelle 24: Nach analogen Elektroporationen gefundene "second site" Mutationen.** Gefundene "second site" Mutationen lagen im \*<sup>1</sup>NS2A; \*<sup>2</sup>NS2B; \*<sup>3</sup>NS3; \*<sup>4</sup>3'-NTR.

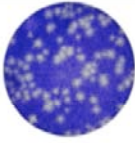
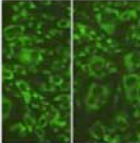



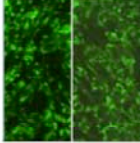

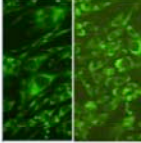

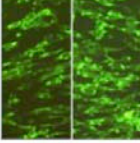
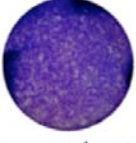
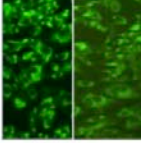

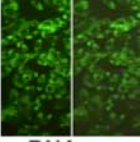
Ursprungsmutation	nach analogen EPs gefundene "second site" Mutationen
<b>R22A-K23A-R24A</b>	M39L* <sup>2</sup>
	D3G* <sup>3</sup>
	D343G* <sup>3</sup>
	E347A* <sup>3</sup>
<b>D70A</b>	A70D* <sup>1</sup>
	A70D* <sup>1</sup>
	A70D* <sup>1</sup>
<b>R99A-E100A-R101A</b>	V118E* <sup>1</sup>
	K124E* <sup>1</sup>
	K124E* <sup>1</sup>
	K124E* <sup>1</sup>
	c10837g* <sup>4</sup> + t10844a* <sup>4</sup>
<b>E162A-R164A</b>	M168K* <sup>1</sup>
	M168K* <sup>1</sup>
	M168R* <sup>1</sup>

### 3.1.6 Untersuchung der "second site" Mutationen auf kompensierende Eigenschaften

Um zu überprüfen, ob die unter 3.1.5 gefundenen "second site" Mutationen kompensierend sind, also zur Wiedererlangung der Infektiosität und Zytopathogenität erforderlich sind, wurde jeweils die zusätzlich entstandene Mutation in den GFV-Gesamtklon mit entsprechender Ursprungsmutation einkloniert. Nach EP der von der Doppelmutante abgeleiteten RNA wurde mittels ICA die spezifische Infektiosität der eingesetzten RNA bestimmt. Im Abstand von 24 h wurde die Entwicklung eines ZPE überwacht und Proben aus dem Zellkulturüberstand zur späteren Titerbestimmung entnommen. Um Replikation und Infektiosität der GFV-Mutanten zu untersuchen, wurden separat nach der EP eingesäte Zellen sowie mit Zellkulturüberstand infizierte Zellen zur IF eingesetzt.

Im Gegensatz zu der RNA, die lediglich die Ursprungsmutation enthielt, bildeten sich nach EP der *in vitro* Transkripte folgender Doppelmutationen Plaques im ICA aus: **M39L**(NS2B) oder **D343G**(NS3) bei der Ursprungsmutation R22A-K23A-R24A, **K124E**(NS2A) bei der Ursprungsmutation R99A-E100A-R101A und **M168K**(NS2A) oder **M168R**(NS2A) bei der Ursprungsmutation E162A-R164A (Tab. 25 und Abb. 11). Demnach handelt es sich um

kompensierende "second site" Mutationen. Die spezifische Infektiosität der RNA lag mit  $4,6 \times 10^3$  bis  $2,2 \times 10^5$  PFU/ml unter dem für GFV-WT bestimmten Wert (Tab. 25). Außerdem entstanden mit Ausnahme der "second site" Mutation M168R im NS2A deutlich kleinere Plaques im Vergleich zum GFV-WT (Abb. 11). Nach EP der von den Doppelmutanten abgeleiteten RNA als auch nach Infektion mit 24 h nach EP geernteten Zellkulturüberständen zeigte sich eine positive IF. Folglich waren Replikationsfähigkeit und zurückerlangte Infektiosität bewiesen (Abb. 11 und Tab. 25).

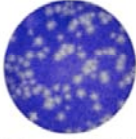
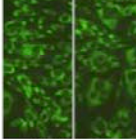



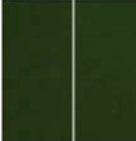



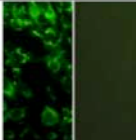


Ursprungs- und "second-site"-Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion	Ursprungs- und "second-site"-Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion
GFV-WT	 $5,0 \times 10^5$ PFU/ $\mu$ g RNA		mock	 0,0 PFU	
R22A-K23A-R24A M39L <sup>*2</sup>	 $6,0 \times 10^4$ PFU/ $\mu$ g RNA		R22A-K23A-R24A D343G <sup>*3</sup>	 $2,2 \times 10^5$ PFU/ $\mu$ g RNA	
R99A-E100A-R101A K124E <sup>*1</sup>	 $1,5 \times 10^4$ PFU/ $\mu$ g RNA		E162A-R164A M168K <sup>*1</sup>	 $1,2 \times 10^4$ PFU/ $\mu$ g RNA	
E162A-R164A M168R <sup>*1</sup>	 $4,6 \times 10^3$ PFU/ $\mu$ g RNA				

**Abbildung 11: Phänotypen von GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten mit kompensierenden "second site" Mutationen.** Nach EP der *in vitro* transkribierten GFV-RNA bzw. RNA-Transkripten der GFV-Mutanten wurde ein ICA, wie in der Legende von Abb. 8 beschrieben, durchgeführt. Sowohl elektroporierte als auch mit 24 h-Überstand infizierte Zellen wurden zur IF ( $\alpha$ -E 6330-mAK und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC) eingesetzt. "Second site" Mutationen lagen im <sup>\*1</sup> NS2A; <sup>\*2</sup> im NS2B; <sup>\*3</sup> NS3.

**Tabelle 25: Eigenschaften von GFV-Mutanten nach Einführung kompensierender "second site" Mutationen.** "Second site" Mutationen lagen im \*<sup>1</sup> NS2A; \*<sup>2</sup> im NS2B; \*<sup>3</sup> NS3.

Ursprungsmutation	"second-site" Mutation	Spezifische Infektiosität (PFU/ $\mu$ g RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Infektion mit 24 h-Überstand
			24 h	48 h	72 h		
GFV-WT	/	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	+	+
mock	/	0	0	0	0	-	-
R22A K23A R24A	M39L* <sup>2</sup>	$6,0 \times 10^4$	$9,5 \times 10^5$	$1,4 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	+	+
	D343G* <sup>3</sup>	$2,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$9,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^6$	+	+
R99A E100A R101A	K124E* <sup>1</sup>	$1,5 \times 10^4$	$7,0 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5$	+	+
E162A	M168K* <sup>1</sup>	$1,2 \times 10^4$	$5,5 \times 10^3$	$1,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	+	+
R164A	M168R* <sup>1</sup>	$4,6 \times 10^3$	$6,5 \times 10^4$	$4,2 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	+	+

Nach EP der *in vitro* Transkripte folgender Doppelmutationen entstanden keine Plaques im ICA: **E347A** (NS3) bzw. **D3G** (NS3) bei der Ursprungsmutation R22A-K23A-R24A und **V118E** (NS2A) oder **c10837g+t10844a** (3'-NTR) bei der Ursprungsmutation R99A-E100A-R101A (Abb. 12 und Tab. 26). Somit waren diese gefundenen "second site" Mutationen nicht kompensierend. Wie an der IF nach EP zu sehen, war lediglich die Doppelmutante R99A-E100A-R101A und V118E replikationskompetent. Die Einführung der übrigen "second site" Mutationen in RNA mit den jeweils zugehörigen Ursprungsmutationen resultierte in einem letalen Phänotypen (Abb. 12). Wie bei den Ursprungsmutationen war eine Reinfektion mit Zellkulturüberstand nicht möglich. Die Infektiosität wurde also nicht zurückerlangt, vielmehr ging sogar die Replikationskompetenz durch Einfügen der meisten "second site" Mutationen verloren. Daher sind die oben genannten "second site" Mutationen nicht kompensierend.

Ursprungs- und "second-site"-Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion	Ursprungs- und "second-site"-Mutation	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion
GFV-WT	 5,0 x 10 <sup>5</sup> PFU/μg RNA		mock	 0,0 PFU	
R22A-K23A-R24A D3G* <sup>3</sup>	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		R22A-K23A-R24A E347A* <sup>3</sup>	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA	
R99A-E100A-R101A V118E* <sup>1</sup>	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA		R99A-E100A-R101A c10847g+t10854a* <sup>4</sup>	 <3,3 x 10 <sup>1</sup> PFU/μg RNA	

**Abbildung 12: Phänotypen von GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten mit nicht kompensierenden "second site" Mutationen.** *In vitro* transkribierte RNA wurde in BHK-Zellen elektroporiert. Wie in der Legende von Abb. 8 beschrieben, wurde ein ICA durchgeführt. Elektroporierte Zellen sowie mit 24 h-Überstand infizierte Zellen wurden zur IF ( $\alpha$ -E 6330-mAK und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC) eingesetzt. "Second site" Mutationen lagen im \*<sup>1</sup> NS2A; \*<sup>3</sup> NS3; \*<sup>4</sup> 3'-NTR.

**Tabelle 26: Eigenschaften von GFV-Mutanten nach Einführung nicht kompensierender "second site" Mutationen.** "Second site" Mutationen lagen im \*<sup>1</sup> NS2A; \*<sup>3</sup> NS3; \*<sup>4</sup> 3'-NTR.

Ursprungsmutation	"second-site" Mutation	Spezifische Infektiosität (PFU/μg RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Infektion mit 24 h-Überstand
			24 h	48 h	72 h		
GFV-WT	/	5,0 x 10 <sup>5</sup>	1,3 x 10 <sup>7</sup>	1,2 x 10 <sup>8</sup>	8,0 x 10 <sup>7</sup>	+	+
mock	/	0	0	0	0	-	-
R22A K23A R24A	E347A* <sup>3</sup>	<3,3 x 10 <sup>1</sup>	<5	<5	<5	-	-
	D3G* <sup>3</sup>	<3,3 x 10 <sup>1</sup>	<5	<5	<5	-	-
R99A	V118E* <sup>1</sup>	<3,3 x 10 <sup>1</sup>	<5	<5	<5	+	-
E100A R101A	c10847g* <sup>4</sup> t10854a* <sup>4</sup>	<3,3 x 10 <sup>1</sup>	<5	<5	<5	-	-

### 3.1.7 Untersuchung der *trans*-Komplementation von nicht infektiösen aber replikationskompetenten GFV-NS2A-Mutanten

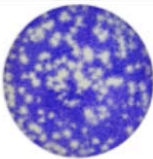
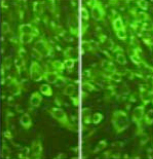
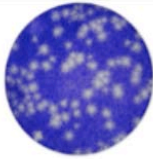
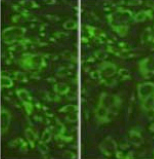

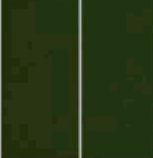

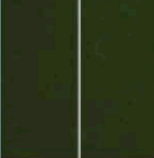

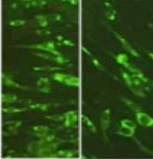

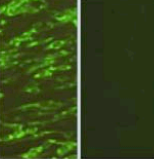

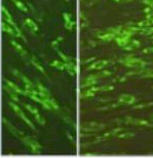

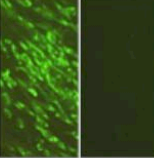

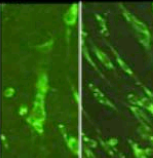

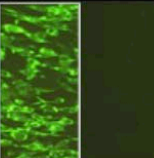
Ferner wurde untersucht, ob die zwar replizierenden, aber nicht infektiösen Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A in *trans* zu komplementieren sind. Hierfür mussten zunächst Zellen erzeugt werden, die das GFV-NS2A-Protein exprimierten. In vorangegangenen Arbeiten wurde das nicht zytopathogene Sindbis-Virus (SIN) Expressionssystem (Agapov et al., 1998) zur Herstellung einer GFV-NS1-2A exprimierenden Zelllinie verwendet (Lindenbach & Rice, 1997). Rekombinante, selbst replizierende (Replikon) SIN RNA stellt zwei subgenomische mRNAs her. Das zu exprimierende Fremdgen, in diesem Fall der für GFV NS1-2A kodierende Bereich, steht dabei unter Kontrolle eines subgenomischen Promotors. Da dem exprimierten GFV-NS1 eine Signalsequenz (24 C-terminale AS des E-Proteins) vorgeschaltet ist, wird der Transport des NS1 in das ER-Lumen gewährleistet. Dort ist eine ER ständige Protease für die Prozessierung an der NS1-2A Spaltstelle verantwortlich, so dass der authentische N-Terminus des NS2A generiert wird. Ein zweiter subgenomischer Promotor reguliert die Expression des *pac*-Gens, das für die Puromycin *N*-acetyltransferase kodiert.

Nach EP von BHK-Zellen mit *in vitro* transkribierter RNA von pSINrep19/NS1-2A wurden replikonexprimierende Zellpopulationen durch Zugabe von Puromycin selektiert. Die etablierte Zelllinie wurde mit *in vitro* Transkripten der zu untersuchenden GFV-Mutanten elektroporiert. Als Positivkontrolle diente die GFV-NS2A Mutante K190S, für die bereits eine *trans*-Komplementation durch NS1-2A exprimierende Zellen erfolgreich gezeigt werden konnte (Kümmerer & Rice, 2002). Zur Ermittlung der spezifischen Infektiosität wurde ein ICA durchgeführt. Sowohl 24 h nach EP fixierte Zellen als auch mit 24 h-Überstand infizierte Zellen wurden zur IF eingesetzt. Außerdem wurde täglich die Entstehung eines ZPE mittels Lichtmikroskop überprüft. Die Titer der im Abstand von 24 h geernteten Zellkulturüberstände wurden bestimmt.

Wie in Abbildung 13 und Tabelle 27 zu sehen, entstanden Plaques im ICA, wenn *in vitro* transkribierte RNA der bereits bekannten Mutante **K190S** (Kümmerer & Rice, 2002) in NS1-2A exprimierende Zellen elektroporiert wurde. Dagegen konnten sich ohne die in *trans* zur Verfügung gestellten Proteine keine Plaques entwickeln. Durch Titration der BHK-Zellkulturüberstände auf BHK-Zellen wurde kein Virustiter detektiert. Dagegen wurde im 24 h nach EP geerntetem Zellkulturüberstand der NS1-2A-exprimierenden Zellen durch

Titration auf ebensolchen Zellen ein Titer von  $9,0 \times 10^4$  PFU/ml erreicht (Tab. 27). Im Verhältnis zum GFV-WT entstanden allerdings kleinere Plaques (Abb. 13) und die Titer lagen 24 bis 72 h nach EP um das 10- bis 100-fache unter denen der mit GFV-WT-RNA elektroporierten Zellen (Tab. 27). Die IF war nach EP von BHK- sowie von replikonexprimierenden Zellen positiv. Wurden allerdings BHK-Zellen mit Zellkulturüberstand infiziert, der nach EP von BHK-Zellen geerntet wurde, so war die IF negativ. Infizierte man dagegen BHK-Zellen oder auch BHK-NS1-2A-Zellen mit Zellkulturüberstand, der nach einer EP von NS1-2A exprimierenden Zellen geerntet wurde, war die IF positiv (Abb. 13 und Tab. 27). Die Mutation K190S kann also durch zur Verfügung gestelltes WT-GFV-NS1-2A in *trans* komplementiert werden, d.h. infektiöse Viruspartikel können nun freigesetzt werden, wodurch eine Reinfektion von Zellen ermöglicht wird. Ähnlich verhielt sich auch die Mutante **R22A-K23A-R24A**. Im Gegensatz zu mit *in vitro* transkribierter RNA elektroporierten BHK-Zellen entstanden nach EP von NS1-2A exprimierenden Zellen Plaques im ICA (Abb. 13). Während im BHK-Zellkulturüberstand 24 h nach der EP kein Virus nachzuweisen war, enthielt der Überstand der NS1-2A exprimierenden Zellen bereits  $7,0 \times 10^3$  PFU/ml. Daher ist auch die R22A-K23A-R24A-Mutante in *trans* komplementierbar. Zwei Tage nach EP konnte auch auf den BHK-Zellen ein Virustiter nachgewiesen werden. Dieser war im Vergleich zum Titer des NS1-2A-Zellkulturüberstandes geringer und beruhte wahrscheinlich, wie bereits in vorangegangenen Versuchen untersucht, auf der Entwicklung einer kompensierenden "second site" Mutation. Wie bei der oben beschriebenen Mutante K190S waren die durch *trans*-Komplementation entstandenen Plaques im Vergleich zum GFV-WT kleiner, und die Titer der Zellkulturüberstände lagen im Vergleich sogar 2 bis fast 4  $\log_{10}$ -Stufen niedriger. Die Ergebnisse der IF entsprechen denen der Mutation K190S und beweisen ebenfalls die *trans*-Komplementation der Mutante R22A-K23A-R24A. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen GFV-NS2A Mutanten konnte nach EP des *in vitro* Transkripts der Mutante **R99A-E100A-R101A** in NS1-2A exprimierende Zellen keine Plaquebildung im ICA nachgewiesen werden (Abb. 13). Auch die IF von BHK bzw. NS1-2A exprimierenden Zellen, die mit Zellkulturüberstand aus dem *Trans*-Komplementationsversuch inkubiert wurden, verlief negativ. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass 24 h nach EP in NS1-2A exprimierenden Zellen ein Titer von nur  $1,5 \times 10^1$  PFU/ml nachgewiesen werden konnte (Tab. 27). Da aber in bisherigen Experimenten mit BHK-Zellen keine "second site" Mutation innerhalb von 24 h entstanden war, deuten die Ergebnisse folgender Infektionsversuche

dennoch auf eine *trans*-Komplementation der Mutante R99A-E100A-R101A hin. Während BHK-Zellen nicht durch den 48 h nach EP von BHK-Zellen geernteten Überstand infiziert werden konnten (negative IF), war eine Infektion möglich (positive IF), wenn der Überstand aus einer EP von NS1-2A exprimierenden Zellen stammte (Tab. 27 und Abb. 13).

Mutation	NS1-2A-Zellen		BHK-J-Zellen	
	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion	Plaques (ICA)/ spez. Infekt.	IF nach EP bzw. Infektion
GFV-WT	 $8,3 \times 10^5$ PFU/ $\mu$ g RNA		 $5,0 \times 10^5$ PFU/ $\mu$ g RNA	
mock	 0,0 PFU		 0,0 PFU	
K190S	 $4,3 \times 10^4$ PFU/ $\mu$ g RNA		 $<3,3 \times 10^1$ PFU/ $\mu$ g RNA	
R22A K23A R24A	 $4,2 \times 10^4$ PFU/ $\mu$ g RNA		 $<3,3 \times 10^1$ PFU/ $\mu$ g RNA	
R99A E100A R101A	 $<3,3 \times 10^1$ PFU/ $\mu$ g RNA		 $<3,3 \times 10^1$ PFU/ $\mu$ g RNA	

**Abbildung 13: *Trans*-Komplementation der GFV-Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A.** Die *in vitro* transkribierte RNA wurde in WT-NS1-2A exprimierende Zellen elektroporiert. Wie in der Legende von Abb. 8 beschrieben, wurde ein ICA durchgeführt. Sowohl elektroporierte als auch mit 24 h-Überstand infizierte Zellen (48 h-Überstand für Mutante R99A-E100A-R101A) wurden zur IF ( $\alpha$ -E 6330-mAK und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC) eingesetzt. Als *in trans* zu komplementierende Positivkontrolle diente Mutante K190S.



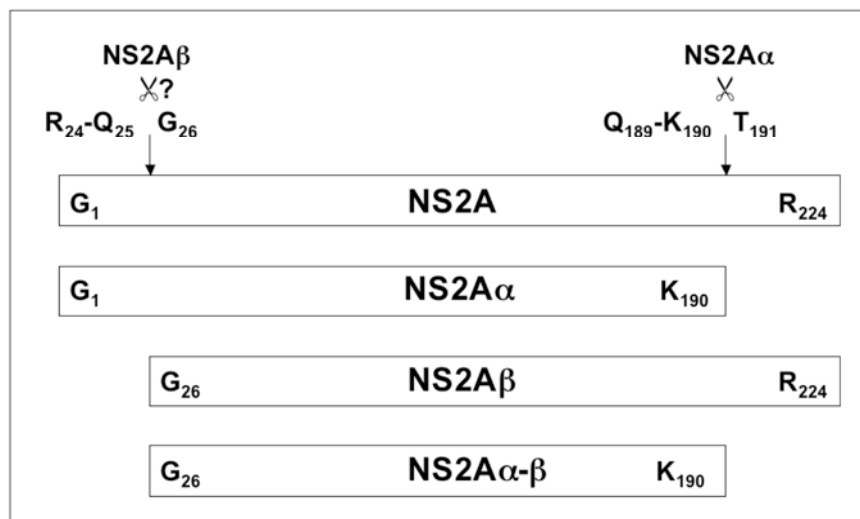
**Tabelle 27: Trans-Komplementation der Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A.** BHK-Zellkulturüberstände wurden auf BHK-Zellen titriert und zur Infektion von BHK-Zellen eingesetzt. Dagegen wurden Überstände aus EP von NS1-2A exprimierenden Zellen auf NS1-2A-Zellen titriert und zur Infektion von NS1-2A-Zellen eingesetzt. Als in *trans* zu komplementierende Positivkontrolle diente Mutante K190S. n. b.: nicht bestimmt.

Mutation	Zellen	Spezifische Infektiosität (PFU/ $\mu$ g RNA)	Titer nach			IF nach EP	IF nach Inf. mit	
			24 h	48 h	72 h		24 h-Überstand	48 h-Überstand
GFV-WT	BHK-J	$5,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	+	+	n. b.
	NS1-2A	$8,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	+	+	n. b.
mock	BHK-J	0	0	0	0	-	-	n. b.
	NS1-2A	0	0	0	0	-	-	n. b.
K190S	BHK-J	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$<5$	$<5$	+	-	n. b.
	NS1-2A	$4,3 \times 10^4$	$9,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	+	+	n. b.
R22A K23A R24A	BHK-J	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$9,3 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	+	-	n. b.
	NS1-2A	$4,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^3$	$5,0 \times 10^4$	$6,5 \times 10^4$	+	+	n. b.
R99A E100A R101A	BHK-J	$<3,3 \times 10^1$	$<5$	$<5$	$7,5 \times 10^2$	+	-	-
	NS1-2A	$<3,3 \times 10^1$	$1,5 \times 10^1$	$4,5 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	+	-	+

### 3.1.8 Analyse einer vermuteten zweiten Spaltstelle im NS2A

Flavivirale Serinproteasen erkennen und spalten eine Abfolge von zwei AS mit basischem Rest und eine darauffolgende AS mit kurzer Seitenkette (Chambers et al., 1990a). Im Fall von GFV sind die Spaltstellen an den Positionen P2, P1 und P1' [(R/K/Q)-(R/K) ↓ (G/S/A/T)] hoch konserviert (Chambers et al., 1990a). Neben den Spaltstellen zwischen den einzelnen Nichtstrukturproteinen konnte auch im C-terminalen NS2A-Bereich eine interne serinproteaseabhängige Spaltstelle identifiziert werden (Nestorowicz et al., 1994; Kümmerer & Rice, 2002). Die Prozessierung an dieser sogenannten NS2A $\alpha$ -Spaltstelle (Q189-K190 ↓ T191) führt dazu, dass neben NS2A ein C-terminal verkürztes NS2A-Protein, das NS2A $\alpha$ , entsteht (Abb. 14). Untersuchungen von NS2A $\alpha$ -Spaltstellenmutanten zeigten, dass aufgrund einzelner AS-Austausche an den Positionen P2 und P1 ein geringfügiger Größenshift des NS2A zu beobachten war. Interessanterweise wurde zwischen den NS2A- und NS2A $\alpha$ -Banden eine weitere Bande detektiert, die jeweils dem Größenshift des NS2A folgte (mündliche Mitteilung, Dr. B. Kümmerer). Dies ließ die Entstehung eines weiteren NS2A-Spaltproduktes vermuten. Im N-terminalen Teil des NS2A-Proteins findet sich die AS-

Abfolge R24-Q25-G26, die eine potentielle, serinproteaseabhängige Spaltstelle darstellt. Dabei könnte die Prozessierung aufgrund von Q statt R oder K an Position P1 suboptimal verlaufen. Eine Spaltung zwischen den AS R24-Q25 ↓ G26 im NS2A (Abb. 14) könnte die detektierte, dem NS2A-Größenshift folgende Bande erklären.



**Abbildung 14: NS2A-interne Serinproteasespaltstellen.** Die Balken stellen das ungespaltene NS2A bzw. die Produkte nach möglicher Serinproteasespaltung (NS2Aα, NS2Aβ, NS2Aα-β) dar. Dabei sind jeweils die erste und letzte AS eines (Teil-)Proteins angezeigt. Weiterhin sind die AS-Sequenzen der NS2Aα- und der mutmaßlichen NS2Aβ-Spaltstelle markiert.

Um zu untersuchen, ob die AS-Abfolge R24-Q25 ↓ G26 tatsächlich eine serinproteaseabhängige Spaltstelle ist, sollte diese durch Mutagenese erstens optimiert und zweitens zerstört werden. Anschließend sollte der Phänotyp der hergestellten Mutanten sowie das Spaltungsmuster im NS2A-Bereich analysiert werden.

Zur Herstellung der Mutante mit optimierter Spaltstelle wurde die AS Glutamin an Position 25 des NS2A mit Hilfe der Primer BNI 275 und BNI 276 durch gerichtete Mutagenese gegen ein Arginin ausgetauscht. Die Klonierungsstrategie entsprach dem in Abbildung 6A (siehe 3.1.1) gezeigten Schema. Diese Mutante replizierte, war infektiös und zeigte eine ähnliche Wachstumskurve wie der GFV-WT (Daten nicht gezeigt). Als Varianten mit zerstörter NS2Aβ-Spaltstelle wurden die unter 3.1.1 erzeugten Mutanten R22A-K23A-R24A und K23A-R24A verwendet. Beide replizierten, allerdings war die Bildung infektiöser Partikel der R22A-K23A-R24A-Mutante unterbunden, bei Mutante K23A-R24A beeinträchtigt (kleinere Plaques als GFV-WT). Die bereits unter 3.1.7 erwähnte Mutante K190S mit beseitigter NS2Aα-Spaltstelle wurde als Kontrolle mitgeführt. Für sie ist bekannt, dass im Vergleich zum GFV-WT kein NS2Aα-Protein nachweisbar ist (Kümmerer &

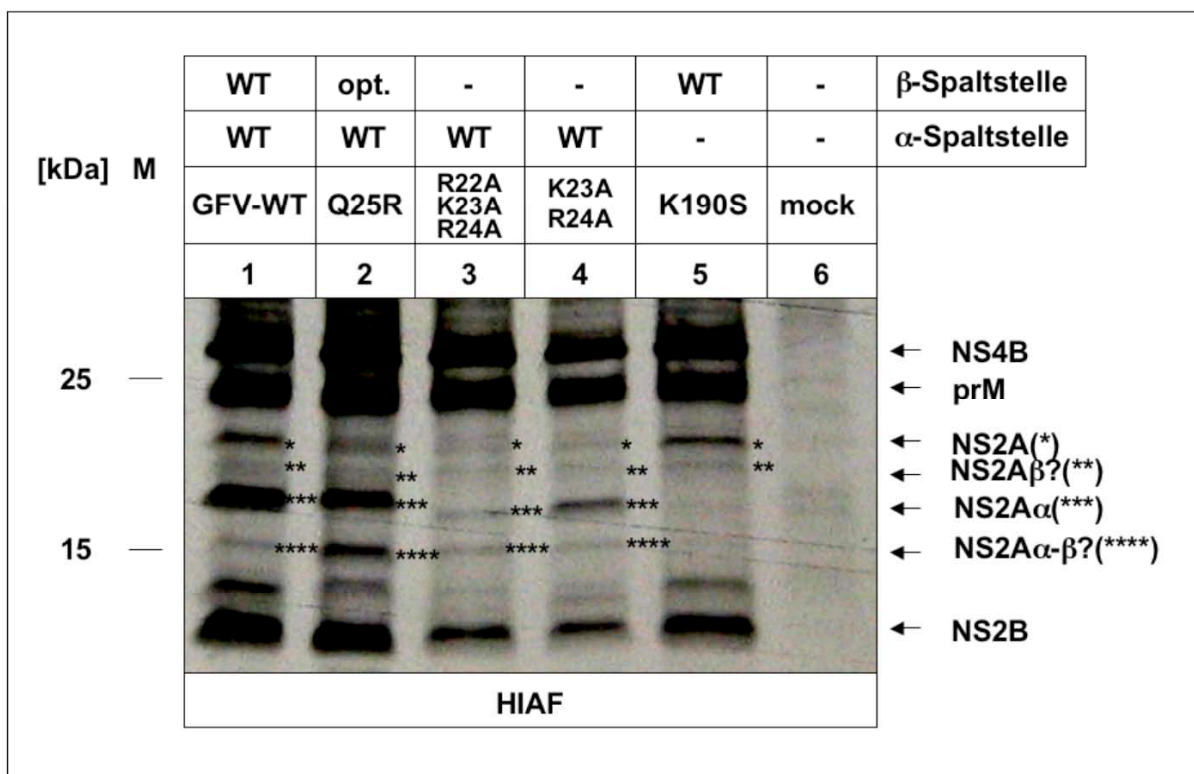
Rice, 2002). Außerdem wurde eine Mutante untersucht, der sowohl die NS2A $\alpha$ - als auch die vermutete zweite Spaltstelle fehlten. Hierzu wurde die Mutation R22A-K23A-R24A unter Verwendung der Restriktionsenzyme *KpnI*, *AvrII* und *NgoMI* in den GFV-Gesamtklon, der bereits die Mutation K190S trug, eingefügt (Klonierungsschema siehe 3.1.1, Abb. 6A). Die so erzeugte Doppelmutante verhielt sich wie die entsprechenden Einzelmutanten R22A-K23A-R24A und K190S. Sie replizierte (positive IF), war aber nicht infektiös (kein ZPE) (Daten nicht gezeigt).

Einen Tag nach EP der von den Mutanten abgeleiteten *in vitro* transkribierten RNAs erfolgte eine radioaktive Markierung der translatierten Proteine mit <sup>35</sup>S Methionin/Cystein. Die geernteten Zelllysate wurden für die Immunpräzipitation mit einem GFV spezifischen Antiserum ("hyperimmune ascitic fluid" = HIAF) eingesetzt. Mit Hilfe dieses Serums lässt sich NS2A wie auch NS2A $\alpha$  bzw. das mutmaßliche NS2A $\beta$  unter nicht denaturierenden Bedingungen aus dem Lysat GFV-infizierter Zellen präzipitieren. Da unter denaturierenden Bedingungen oder nach alleiniger, transients Expression des NS2A-Proteins kein Nachweis mit HIAF erfolgt, wird eine Präzipitation über Interaktion (Koimmunpräzipitation) mit anderen flaviviralen Proteinen vermutet. Anschließend folgten Proteinauftrennung mittels SDS-PAGE und Fluorographieanalyse.

Wie Abbildung 15 zeigt, konnten nach der EP der GFV-WT-RNA (Spur 1) neben den Proteinen NS4B (~27 kDa), prM (~25 kDa) und NS2B (~14 kDa) auch die NS2A-spezifischen Proteine NS2A (~23 kDa), NS2A $\beta$  (~20 kDa), NS2A $\alpha$  (~18 kDa) und NS2A $\alpha$ - $\beta$  (~15 kDa) aus dem Zelllysate mittels HIAF präzipitiert werden. Die in Spur 2 aufgetrennten Proteine der **Q25R**-Mutante mit optimierter NS2A $\beta$ -Spaltstelle entsprachen denen des GFV-WT, allerdings war die Bandenstärke des NS2A $\alpha$ - $\beta$ -Proteins stärker als beim GFV-WT. Im Vergleich zu den in Spuren 1 und 2 entstandenen Banden wurden die Proteine NS2A $\alpha$  und NS2A $\alpha$ - $\beta$  von der **K190S**-Mutante mit zerstörter NS2A $\alpha$ -Spaltstelle nicht exprimiert (Abb. 15, Spur 5). Im Vergleich zum GFV-WT konnten nach Antigenpräzipitation aus Zelllysaten der beiden Mutanten mit zerstörter NS2A $\beta$ -Spaltstelle **R24A-K23A-R24A** und **K23A-R24A** nur schwache NS2A-Banden detektiert werden (Abb. 15 Spuren 3 und 4). Erstaunlicherweise entstanden sowohl sehr schwache Banden in Höhe des vermuteten NS2A $\beta$ - als auch NS2A $\alpha$ - $\beta$ -Proteins. Auffällig waren auch die erniedrigten Laufhöhen der im Vergleich zum GFV-WT schwächeren NS2A $\alpha$ -Banden dieser beiden Mutanten. Nach EP des *in vitro* Transkripts der Doppelmutante mit zerstörter NS2A $\alpha$ - und NS2A $\beta$ -Spaltstelle

(**R24A-K23A-R24A+K190S**) konnte keine NS2A-spezifische Bande detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten mittels der Mutanten mit zerstörter mutmaßlichen NS2A $\beta$ -Spaltstelle keine Aussagen zur NS2A $\beta$ -Spaltstelle getroffen werden. Das verstärkte Auftreten der 15 kDa Bande bei der Q25R-Mutante lässt jedoch vermuten, dass sich im Bereich der AS 24-25 ↓ 26 eine suboptimale Serinproteasespaltstelle befindet.



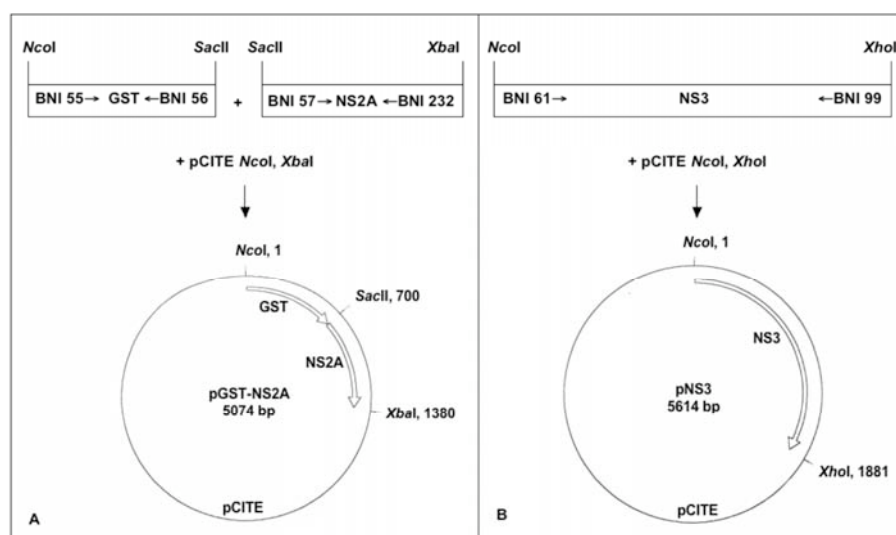
**Abbildung 15: Radioimmunpräzipitation der Mutanten mit mutierter, mutmaßlicher NS2A $\beta$ -Spaltstelle.** Die von den Mutanten abgeleitete, *in vitro* transkribierte RNA wurde in BHK-J-Zellen elektroporiert; 24 h später wurden die zu exprimierenden Proteine mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zellysate wurden einer Präzipitation mittels HIAF und Sepharose-A unterzogen. Die Auftrennung der präzipitierten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE (14%ig). M = Proteinmarker [kDa]. NS2A-spezifische Banden wurden mit Hilfe von Sternchen hervorgehoben.

### 3.2 Untersuchung der Interaktion von NS2A und NS3 im T7-Vaccinia-Virus-System

Für die beiden replizierenden aber nicht infektiösen GFV-NS2A-Mutanten Q189S (Kümmerer & Rice, 2002) und R22A-K23A-R24A (siehe 3.1.6) konnte jeweils eine kompensierende "second site" Mutation an Position 343 im NS3 detektiert werden. Dies deutet auf eine Interaktion zwischen den Proteinen NS2A und NS3 hin.

### 3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide pGST-NS2A und pNS3

Um zu untersuchen, ob eine Interaktion dieser beiden NS-Proteine stattfindet, wurden die für die AS kodierenden Sequenzen einzeln in den Vektor pCITE<sup>®</sup>-2a(+) kloniert. Da gegen GFV-NS2A kein spezifischer Antikörper vorhanden ist, wurde für spätere Immunpräzipitationsuntersuchungen NS2A mit N-terminaler Glutathion-S-Transferase-(GST-) Fusion exprimiert. Im folgenden wird die Klonierung des Plasmidkonstruktes pGST-NS2A beschrieben (Klonierungsschema siehe Abb. 16 A). Mit Hilfe der Primer BNI 55 und BNI 56 (siehe Tab. 2, 2.1.3) wurde zunächst per PCR das für GST kodierende Fragment synthetisiert. Als DNA-Matrize diente das Plasmid pGST, das die GST-Nukleotidsequenz enthält. Das NS2A-Fragment wurde unter Verwendung der Primer BNI 57 und BNI 232 amplifiziert. Hier diente die cDNA des GFV-WT-Gesamtklons als Matrize. Nach der Restriktion der PCR-Fragmente mit den Enzymen *Nco*I und *Sac*II (GST-Fragment) bzw. *Sac*II und *Xba*I (NS2A-Fragment) und der Restriktion des Vektors pCITE<sup>®</sup>-2a(+) durch *Nco*I und *Xba*I (Abb. 16 A) wurden die drei entstandenen DNA-Fragmente ligiert und in Bakterien transformiert. Die aus den gewachsenen Kolonien präparierte Plasmid-DNA wurde sequenziert. Zur Herstellung des Plasmids pNS3 (Abb. 16 B) wurde zunächst das NS3-Fragment amplifiziert, wozu die Primer BNI 61 und BNI 99 und die DNA des GFV-WT-Gesamtklons eingesetzt wurden. Nach der Restriktion mit *Nco*I und *Xho*I wurde das PCR-Fragment in die entsprechend restringierte Vektor-DNA kloniert (Abb. 16 B).

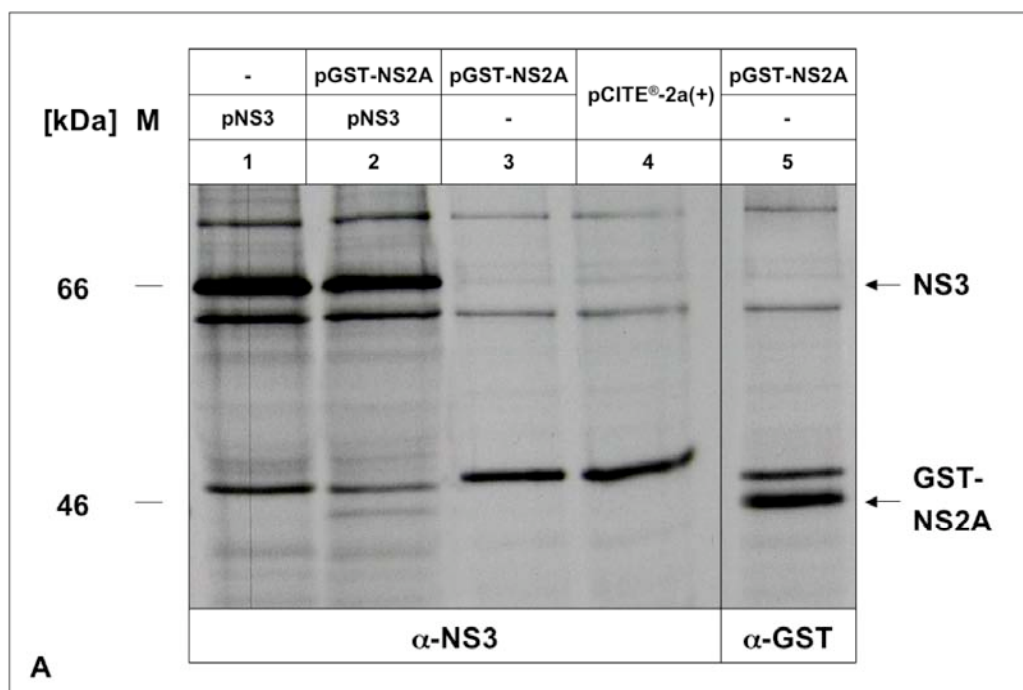


**Abbildung 16: Klonierungsschemata der Plasmide pGST-NS2A und pNS3.** A: pGST-NS2A. B: pNS3. Die durch PCR erzeugten Fragmente sind als Balken dargestellt, wobei die dazu benötigten Primer, sowie das PCR-Produkt angezeigt sind. Weiterhin sind die Enzyme aufgezeigt, die zur Restriktion der entsprechenden Fragmente benötigt wurden. Die Kreise stellen jeweils die Ligationsprodukte dar, wobei unter A eine Dreifragmente-, unter B eine Zweifragmenteligation durchgeführt wurde.

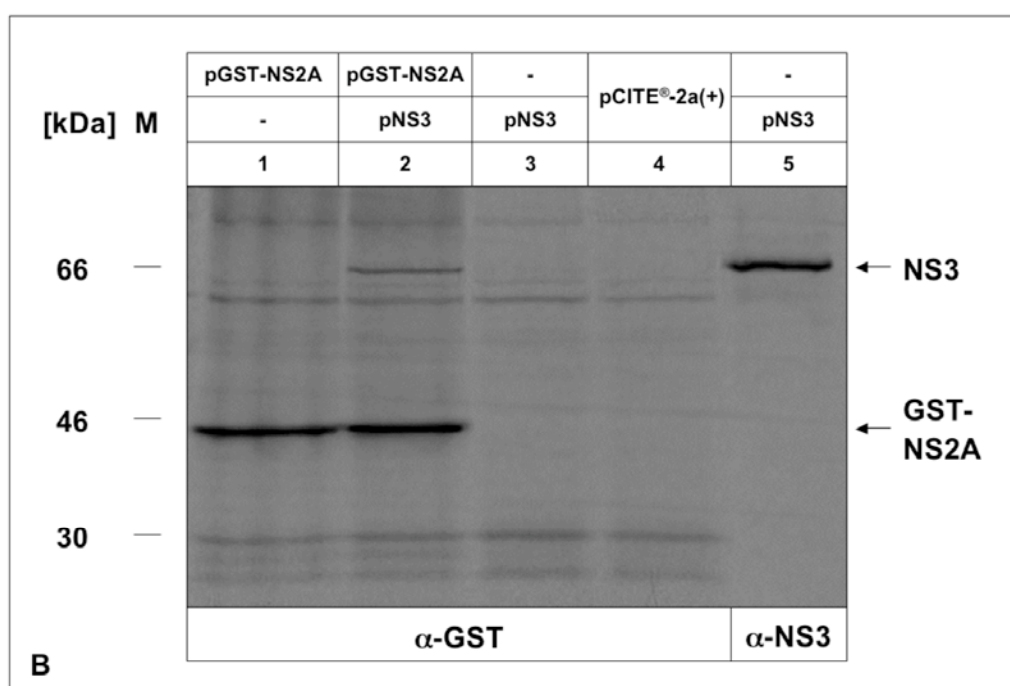
### **3.2.2 Analyse der Interaktion zwischen NS2A und NS3 mittels Koimmunpräzipitation**

Um zu untersuchen, ob die Proteine NS2A und NS3 interagieren, wurde eine transiente Expression im T7-Vaccinia-Virus-System durchgeführt. Eine Stunde nach Infektion mit modifiziertem T7-Vaccinia-Virus erfolgte die Transfektion der Plasmide pGST-NS2A, pNS3 bzw. die Kotransfektion der beiden Konstrukte. Nach 4 h wurden die zu exprimierenden Proteine mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein markiert. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen hergestellten Zelllysate wurden zur Immunpräzipitation mit  $\alpha$ -NS3- oder  $\alpha$ -GST-Antiserum eingesetzt. Nach Auftrennung der präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE folgte die Analyse durch Fluorographie.

Nach Expression und Präzipitation des GST-NS2A-Proteins durch  $\alpha$ -GST-Antiserum konnte eine ca. 45 kDa große, dem Fusionsprotein entsprechende Bande nachgewiesen werden (Abb. 17 A, Spur 5 und Abb. 17 B, Spur 1). Eine Expression des NS3-Proteins und anschließende Präzipitation durch  $\alpha$ -NS3-Antiserum resultierte in einer ca. 70 kDa großen NS3-Bande (Abb. 17 A, Spur 1 und Abb. 17 B, Spur 5). Nach Kotransfektion der beiden Plasmide pGST-NS2A und pNS3 konnte mit Hilfe der Antiseren  $\alpha$ -NS3 (Abb. 17 A, Spur 2) bzw.  $\alpha$ -GST (Abb. 17 B, Spur 2) sowohl die GST-NS2A- als auch die NS3-Bande detektiert werden. Wie die Abbildungen 18 A und B (jeweils Spur 3) zeigen, wird weder das GST-NS2A-Fusionsprotein durch  $\alpha$ -NS3-Antiserum, noch das NS3-Protein durch das  $\alpha$ -GST-Antiserum präzipitiert. Nach Transfektion des Vektors pCITE<sup>®</sup>-2a(+) und Präzipitation der Zelllysate konnte weder durch  $\alpha$ -NS3- (Abb. 17 A, Spur 4) noch mittels  $\alpha$ -GST-Antiserum (Abb. 17 B, Spur 4) eine spezifische Bande auf Höhe des NS3 bzw. des GST-NS2A detektiert werden. Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass eine Koimmunpräzipitation der beiden GFV-Proteine NS2A und NS3 möglich ist und daher eine Interaktion stattfindet.



**Abbildung 17 A: Nachweis der Interaktion zwischen NS2A und NS3 durch  $\alpha$ -NS3-Präzipitation.** Die Plasmid-DNA der Konstrukte pGST-NS2A und pNS3 wurden separat bzw. gemeinsam in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-J-Zellen transfiziert. Anschließend wurden die zu exprimierenden Proteine mittels <sup>35</sup>S Methionin/Cystein radioaktiv markiert. Nach der Zellyse unter nicht denaturierenden Bedingungen erfolgte die Präzipitation der Proteine mit Hilfe von  $\alpha$ -NS3-Antiserum und Sepharose-A bzw.  $\alpha$ -GST-Antiserum und Sepharose-G. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (12%ig) aufgetrennt und anschließend durch Fluorographie analysiert. M = <sup>14</sup>C-Proteinmarker [kDa].



**Abbildung 17 B: Nachweis der Interaktion zwischen NS2A und NS3 durch  $\alpha$ -GST-Präzipitation.** Legende siehe Abb. 17 A.

Die oben beschriebene Interaktion zwischen NS2A und NS3 wurde außerdem sowohl bei Hemagglutinin- (HA-) als auch bei Flag-markierten NS2A-Fusionsproteinen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.3 Einfluss von Mutationen im NS2A und NS3 auf die Interaktion der beiden Proteine**

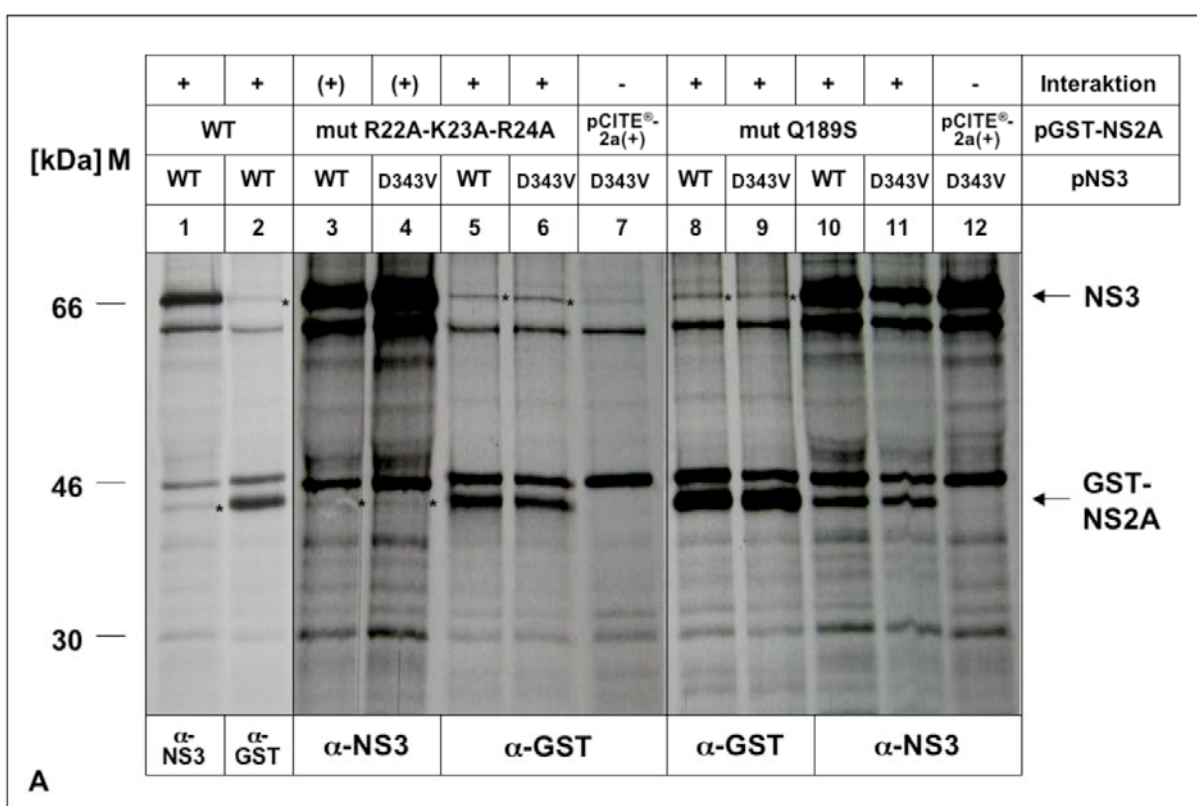
In den vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen im GFV-NS2A [R22A-K23A-R24A (siehe 3.1.2) und Q189S (Kümmerer & Rice, 2002)] selektiv die Bildung bzw. Freisetzung infektiöser Partikel hemmen können. Aufgrund der Entstehung der kompensierenden "second-site" Mutation D343G im NS3 wurde eine Interaktion zwischen NS2A und NS3 vermutet, welche durch Koimmunpräzipitationsanalyse bestätigt werden konnte (siehe 3.2.2). In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob eine Korrelation zwischen der Bildung bzw. Freisetzung der infektiösen Partikel und der NS2A-NS3-Interaktion besteht. Daher sollte im folgenden geprüft werden, ob die Einführung dieser Mutationen in das NS2A mit einer Zerstörung der NS2A-NS3-Interaktion einhergeht und ob nach Einführung der "second-site" Mutation in das NS3 die Interaktion wieder erfolgen kann.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, wurde zunächst die Mutation R22A-K23A-R24A bzw. Q189S in das unter 3.2.1 beschriebene Konstrukt pGST-NS2A eingefügt. Die Klonierungsstrategie (siehe Abb. 16 A) entsprach der unter 3.2.1 beschriebenen, allerdings wurden jeweils DNA-Matrizen verwendet, die die gewünschten Mutationen bereits enthielten. Außerdem wurde eine Doppelmutante hergestellt, in der beide Mutationen im NS2A vorhanden waren. Weiterhin wurde die Mutation D343V, die nach EP der Q189S-Mutante besonders häufig als "second-site" Mutation gefunden wurde (mündliche Mitteilung, Dr. B. Kümmerer), in die Plasmid-DNA von pNS3 eingeschleust. Die Klonierung erfolgte, wie unter 3.2.1 beschrieben (siehe Abb. 16 B), während die erwünschte Mutation in der Matrizen-DNA bereits enthalten war. Nach Kotransfektion der Konstrukte pGST-NS2AmutR22A-K23A-R24A und pNS3 bzw. pNS3mutD343V konnten nach Präzipitation durch  $\alpha$ -NS3- bzw.  $\alpha$ -GST-Antiserum sowohl die dem NS2A-Fusionsprotein als auch die dem NS3-Protein entsprechende Bande detektiert werden (Abb. 18 A, Spuren 3-6). Ebenso konnte eine Koimmunpräzipitation für die exprimierten Proteine der Konstrukte pGST-NS2AmutQ189S und pNS3 bzw. pNS3mutD343V mittels  $\alpha$ -NS3- bzw.  $\alpha$ -GST-Antiserum nachgewiesen werden (Abb. 18 A, Spuren 8-11). Im Gegensatz zum NS2A-Fusionsprotein ohne Mutation (Abb. 18 B, Spur 1) konnte das mit Doppelmutation R22A-K23A-

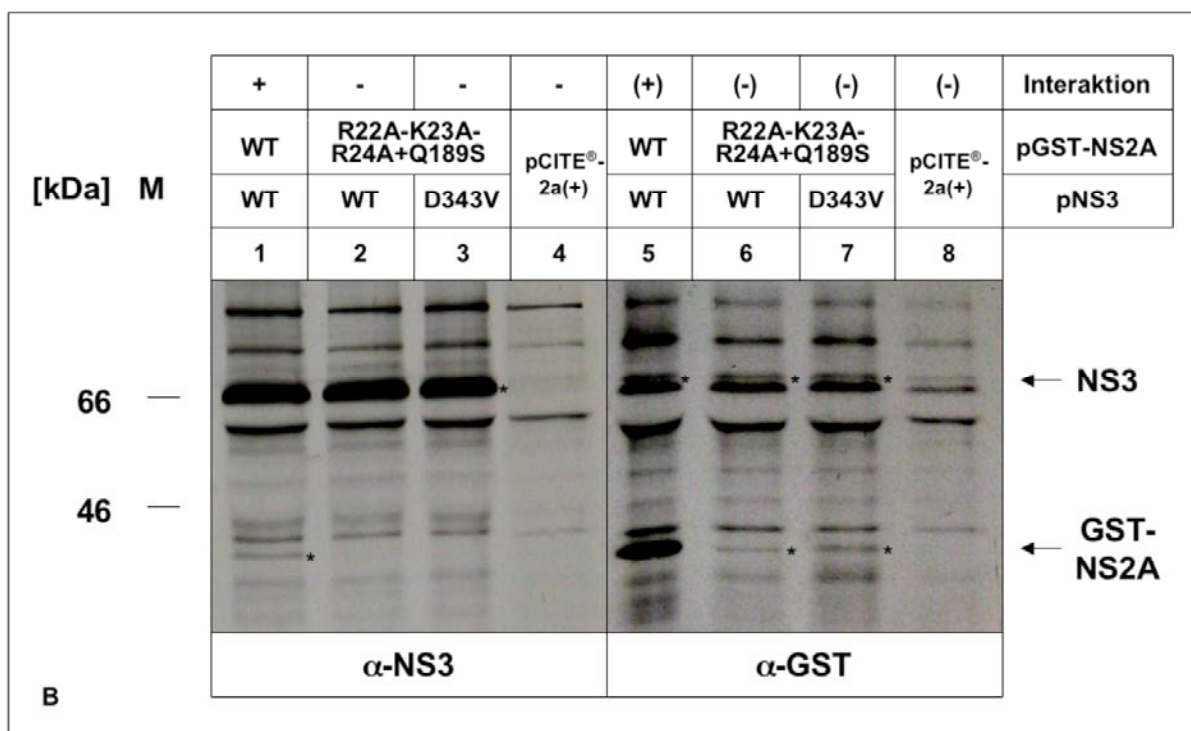


R24A+Q189 nach Koexpression des NS3- bzw. NS3mutD343V-Proteins nicht durch  $\alpha$ -NS3-Antiserum präzipitiert werden (Abb. 18 B, Spuren 2 und 3). Die Fluorographieanalyse nach Präzipitation mittels  $\alpha$ -GST-Antiserum (Abb. 18 B, Spuren 5-8) zeigt lediglich schwache GST-NS2A-Banden. Ob eine Koimmunpräzipitation stattfindet, wird aus diesem Gel nicht ersichtlich, da von den mit pCITE<sup>®</sup>-2a(+) transfizierten Kontrollzellen (Spur 8) ein Protein exprimiert wurde, das auf der Höhe des NS3-Proteins lief.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in das NS2A-Protein eingeführte Mutationen, welche mit der Hemmung der Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel einhergehen, nicht zur Verhinderung der NS2A-NS3-Interaktion führen.



**Abbildung 18 A: Interaktionsnachweis der Proteine NS2A und NS3 bzw. deren Mutationsvarianten mittels Koimmunpräzipitationsassay.** Nach T7-Vaccinia-Virus Infektion und Plasmidtransfektion von BHK-J-Zellen erfolgte eine radioaktive Proteinmarkierung mittels <sup>35</sup>S Methionin/Cystein. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zelllysate wurden einer Präzipitation mit  $\alpha$ -NS3-Antiserum und Sepharose-A bzw.  $\alpha$ -GST und Sepharose-G unterzogen. Anschließend wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt (12%ig) und durch Fluorographie analysiert. M = <sup>14</sup>C-Proteinmarker [kDa]. Besonders schwache Banden sind mit Sternchen hervorgehoben.



**Abbildung 18 B:** Koimmunpräzipitationsassay des NS2A-Proteins mit Doppelmutante und NS3 bzw. NS3mutD343V. Legende siehe Abb. 18 A.

### **3.2.4 Ermittlung der für die Interaktion mit NS3 entscheidenden NS2A-Domäne**

Durch Koimmunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass eine NS2A-NS3-Interaktion weiterhin stattfindet, wenn die für die Bildung bzw. Freisetzung infektiöser Partikel essentielle AS im NS2A mutiert sind (3.2.3). Demnach besteht keine direkte Korrelation zwischen der Bildung/Freisetzung der infektiösen Partikel und der NS2A-NS3-Interaktion. Allerdings konnte keine Interaktion dieser NS-Proteine nachgewiesen werden, sobald beide für die Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel essentiellen AS-Bereiche (R22A-K23A-R24A+Q189S) im NS2A mutiert waren (3.2.3). Dies lässt vermuten, dass beide AS-Bereiche als Interaktionsorte agieren könnten, wobei aber eine der beiden Stellen ausreichend ist, um die Interaktion zu vermitteln. Daher sollten als nächstes die Bereiche des NS2A-Proteins identifiziert werden, an denen die Interaktion zwischen NS2A und NS3 stattfindet.

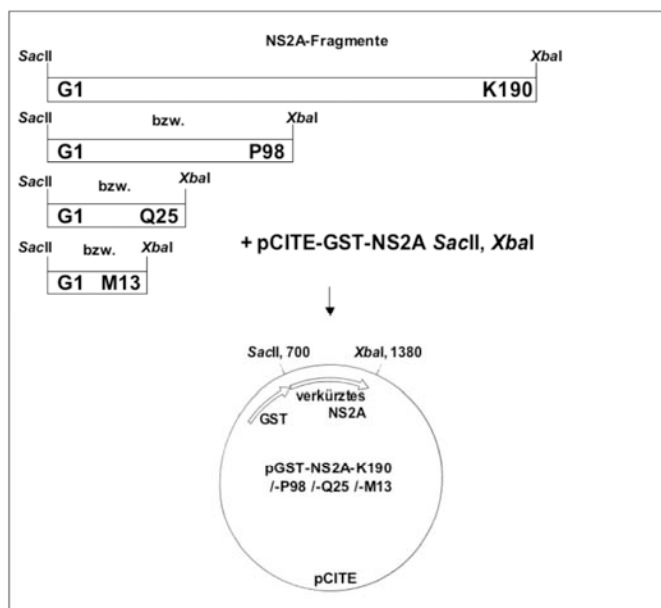
### **3.2.5 Herstellung von Konstrukten mit verkürzter NS2A-Sequenz**

Um NS2A-Domänen zu ermitteln, die für die Interaktion mit NS3 entscheidend sind, sollten verschiedene Plasmidkonstrukte hergestellt werden, die C- bzw. N-terminal verkürzte NS2A-Proteine exprimierten. Hierzu wurden 3'- bzw. 5'-terminal verkürzte NS2A-Fragmente mittels PCR amplifiziert. Die dazu eingesetzten Primer sind in Tabelle 28 aufgelistet.

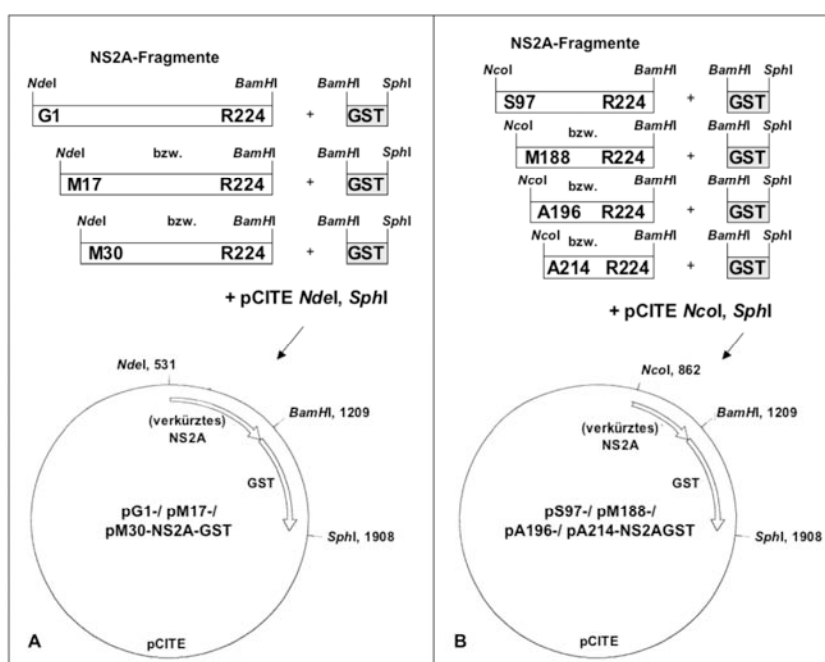
**Tabelle 28: Zur Herstellung der Verkürzungskonstrukte eingesetzte Primer.**

Klon	Primer
pGST-NS2A-K190	BNI 57 und BNI 263
pGST-NS2A-P98	BNI 57 und BNI 264
pGST-NS2A-Q25	BNI 57 und BNI 265
pGST-NS2A-M13	BNI 57 und BNI 277
pNS2A-G1-GST	BNI 306 und BNI 305
pNS2A-M17-GST	BNI 307 und BNI 305
pNS2A-M30-GST	BNI 308 und BNI 305
pNS2A-S97-GST	BNI 309 und BNI 305
pNS2A-M188-GST	BNI 310 und BNI 305
pNS2A-A196-GST	BNI 311 und BNI 305
pNS2A-A214-GST	BNI 379 und BNI 285

Die vom C-Terminus her verkürzten NS2A-Fragmente wurden mit den Enzymen *SacII* und *XbaI* restringiert und gegen die vollständige NS2A-Sequenz des bereits unter 3.2.1 hergestellten Plasmids pGST-NS2A ausgetauscht (siehe Abb. 19). Dagegen wurden die vom N-terminalen Ende her verkürzten NS2A-Proteine C-terminal mit GST fusioniert (Abb. 20). Hierzu wurde zunächst das für GST kodierende Gen mit Hilfe der Primer BNI 284 und BNI 285 synthetisiert, wobei das pGST-NS2A-Konstrukt als DNA-Matrize diente. Auch die NS2A-Abschnitte wurden mittels PCR synthetisiert (Primer siehe Tab. 28). Die NS2A-Fragmente G1-R224, M17-R224 und M30-R224 wurden mit Hilfe der Enzyme *NdeI* und *BamHI* restringiert und zusammen mit dem *BamHI-SphI* restringierten GST-Fragment mittels Dreifragmenteligation in die durch *NdeI* und *SphI* restringierte Vektor-DNA kloniert (Abb. 20 A). Dagegen wurden die NS2A-Fragmente S97-R224, M188-R224, A196-R224 und A214-R224 mittels *NcoI* und *BamHI* restringiert. Die dabei entstandenen Fragmente wurden jeweils zusammen mit dem GST-Fragment, das mittels *BamHI* und *SphI* restringiert worden war, in die durch *NcoI-SphI* restringierte Vektor-DNA eingefügt (Abb. 20 B).



**Abbildung 19: Klonierungsschema der Konstrukte zur Expression C-terminal verkürzter GST-NS2A-Proteine.** Im oberen Abbidungsabschnitt sind die vom 3'-Ende her verkürzten NS2A-Fragmente als Balken dargestellt. Die jeweils kodierte erste und letzte AS ist dabei angezeigt. Weiterhin sind die Restriktionsenzyme markiert, mit deren Hilfe die NS2A-Abschnitte in das bereits erzeugte Plasmid pGST-NS2A eingefügt wurden. Der Kreis stellt schematisch ein nach Ligation entstandenes Plasmid dar, wobei das GST- bzw. die unterschiedlichen, verkürzten NS2A-Fragmente jeweils als Pfeil dargestellt sind.

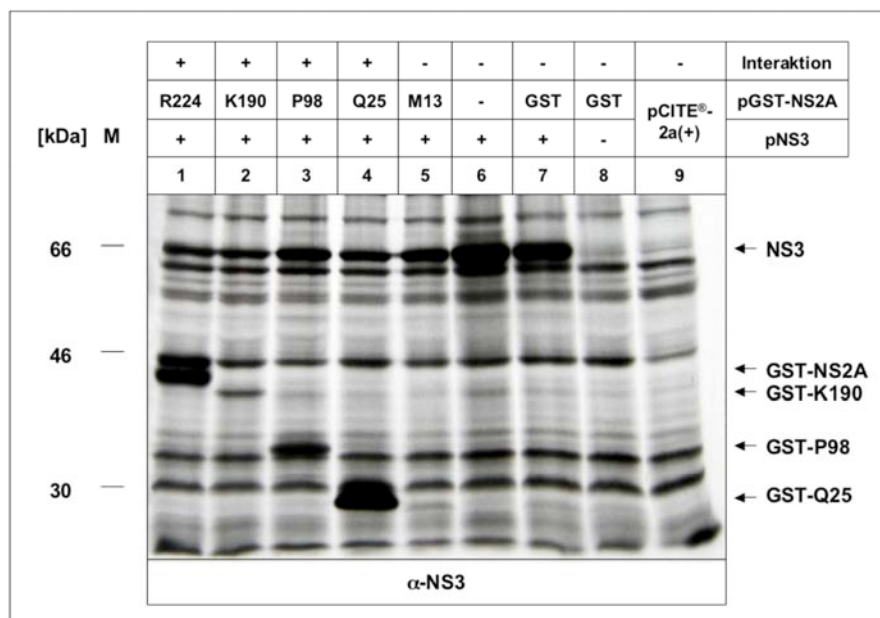


**Abbildung 20 A und B: Klonierungsschemata des Plasmids pNS2A-GST und der Konstrukte zur Expression N-terminal verkürzter NS2A-GST-Proteine.** A: pG1-, pM17-, pM30-NS2A-GST. B: pS97-, pM188-, pA196-, pA214-NS2A-GST. Im oberen Abbidungsteil sind das NS2A-Fragment, bzw. die vom 5'-Ende her verkürzten NS2A-Fragmente als Balken dargestellt, wobei jeweils die ersten und letzten kodierte AS angegeben sind. Graue Balken stellen die GST-Fragmente dar. Weiterhin sind die Enzyme angegeben, die zur Restriktion der Fragmente eingesetzt wurden. Nach einer Dreifragmenteligation der jeweiligen NS2A-Fragmente, dem GST-Fragment und dem restringierten Vektor entstanden die Plasmide, die beispielhaft und schematisch als Kreis dargestellt sind. Hier wird nochmals auf die eingesetzten Restriktionsenzyme verwiesen. Außerdem ist die Fragmentorientierung im Plasmid dargestellt.

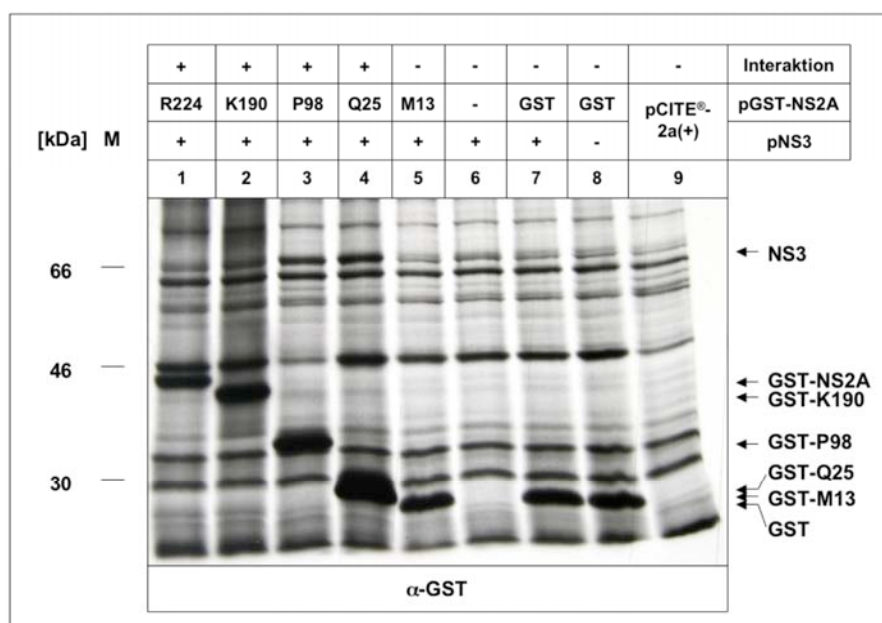
### **3.2.6 Koimmunpräzitationsanalysen von NS3 und C-terminal verkürzten GST-NS2A Fusionsproteinen**

Für die Koimmunpräzitationsanalysen der C-terminal verkürzten GST-NS2A-Fusionsproteine wurden die entsprechenden Konstrukte jeweils gemeinsam mit pNS3 in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-Zellen transfiziert. Nach metabolischer Markierung der Proteine mit  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein wurden die Zelllysate unter nicht denaturierenden Bedingungen hergestellt. Mittels Immunpräzitation mit den Antiseren  $\alpha$ -GST bzw.  $\alpha$ -NS3 wurden die Proteine präzipitiert und durch SDS-PAGE aufgetrennt. Bei Immunpräzitation mit  $\alpha$ -NS3-Antiserum konnte in allen Fällen ein ca. 70 kDa großes Protein nachgewiesen werden, welches dem NS3 entspricht (Abb. 21 A, Spalten 1-7). Letzteres konnte nicht in den als Kontrolle eingesetzten Zelllysaten von pGST bzw. pCITE<sup>®</sup>-2a(+) transfizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 21 A, Spalten 8 und 9). In den Kotransfektionsansätzen mit pGST-NS2A-R224, -K190, -P98 und -Q25 konnten nach Immunpräzitation mit  $\alpha$ -NS3-Antiserum neben dem NS3-Protein jeweils auch Proteine von 45, 43, 35 und 28 kDa nachgewiesen werden (Abb. 21 A, Spalten 1-4). Aufgrund der Größe entsprechen die Proteine dem GST-NS2A bzw. den C-terminal verkürzten GST-NS2A Fusionsproteinen. Dies deutet auf eine erfolgte Koimmunpräzitation und damit stabile Interaktion von NS3 mit den jeweiligen Proteinen hin. Durch Präzitation mit  $\alpha$ -GST-Antiserum konnte die Identität der GST-Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 21 B, Spalten 1-5). In Analogie zu den eben beschriebenen Daten konnte nach Kotransfektion von pNS3 mit pGST-NS2A-R224, -K190, -P98 und -Q25 und nachfolgender Immunpräzitation mit  $\alpha$ -GST neben den GST-NS2A Fusionsproteinen auch NS3 präzipitiert werden, was eine Interaktion zwischen diesen Proteinen bestätigt. Interessanterweise konnte keine Koimmunpräzitation der Proteine GST-NS2A-M13 und NS3 festgestellt werden. Durch  $\alpha$ -NS3-Antikörper wurde lediglich das NS3-Protein präzipitiert, eine Bande in der Höhe des GST-NS2A-M13 Proteins fehlte aber (Abb. 21 A, Spalte 5). Analog dazu konnte durch das  $\alpha$ -GST-Antiserum ausschließlich die GST-NS2A-M13-Bande detektiert werden, was die Funktionalität des pGST-NS2A-M13 Konstrukts beweist; eine NS3-Bande wurde nicht festgestellt (Abb. 21 B, Spalte 5). Die Tatsache, dass in diesem Fall keine Koimmunpräzitation stattfindet, deutet darauf hin, dass der Proteinabschnitt zwischen den AS M13 und R224 an der Interaktion mit NS3 beteiligt ist. Die Tatsache, dass GST alleine nicht mit NS3 kopräzipitierte (Abb. 21 A und B, Spuren 7) zeigt, dass die Koimmunpräzitation nicht über den GST-Anteil vermittelt wird. Zudem

präzipitierte das GST-Protein nicht bei Verwendung des  $\alpha$ -NS3 Antiserums (Abb. 21 A, Spur 8) und das NS3 nicht bei Verwendung des  $\alpha$ -GST-Serums (Abb. 21 B, Spur 6). Dies zeigt, dass keine Kreuzreaktion zwischen  $\alpha$ -GST und NS3 bzw.  $\alpha$ -NS3 und GST stattfindet.



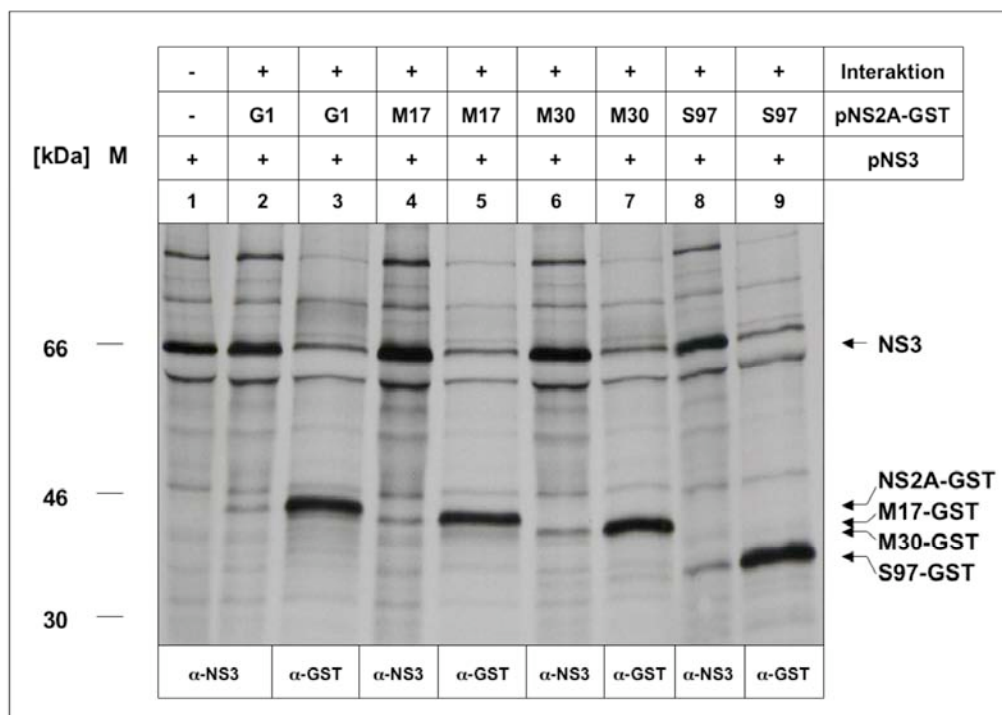
**Abbildung 21 A: Interaktion von NS3 mit C-terminal verkürzten GST-NS2A-Proteinen.** Nach T7-Vaccinia-Virus Infektion und Plasmidtransfektion von BHK-J-Zellen erfolgte eine radioaktive Proteinmarkierung mittels <sup>35</sup>S Methionin/Cystein. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zelllysate wurden einer Präzipitation durch  $\alpha$ -NS3-Antiserum und Pansorbin unterzogen. Anschließend wurden die Proben per SDS-PAGE aufgetrennt (12%ig) und durch Fluorographie analysiert. M = <sup>14</sup>C-Proteinmarker [kDa].



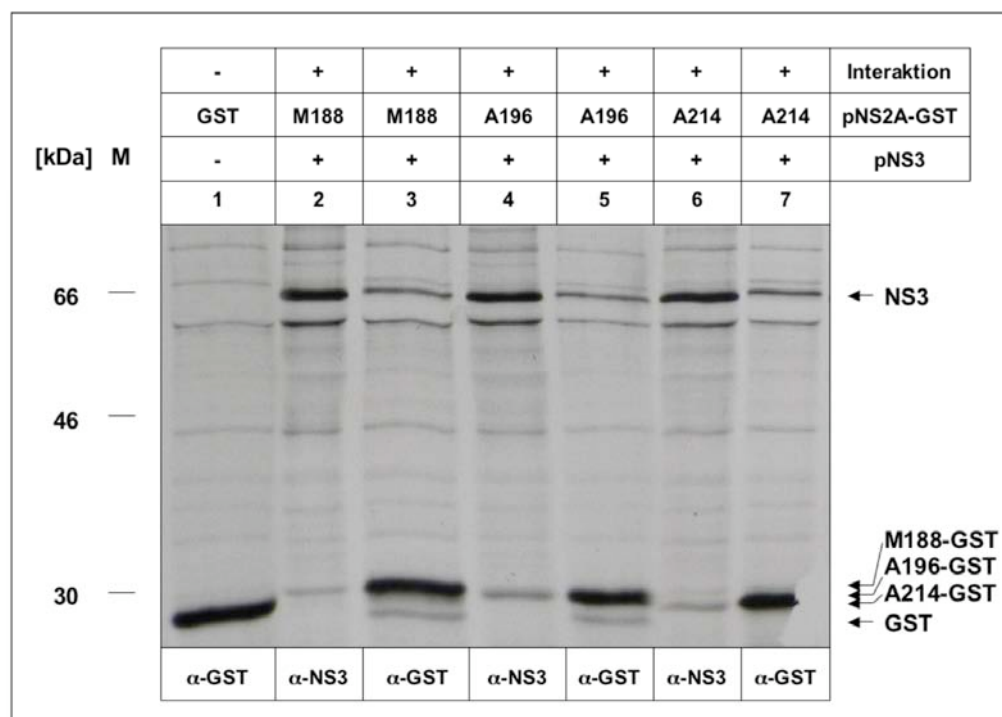
**Abbildung 21 B: Interaktion von NS3 mit C-terminal verkürzten GST-NS2A-Proteinen.** Legende siehe Abb. 21 A.

### **3.2.7 Koimmunpräzitationsanalysen von NS3 und N-terminal verkürzten NS2A-GST Fusionsproteinen**

Analog zu den unter 3.2.6 durchgeführten Versuchen wurden für die Koimmunpräzitationsanalysen der N-terminal verkürzten NS2A-GST-Fusionsproteine die entsprechenden Konstrukte jeweils gemeinsam mit pNS3 in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-Zellen transfiziert. Nach radioaktiver Markierung der Proteine mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein wurden die Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert. Die mittels  $\alpha$ -GST- bzw.  $\alpha$ -NS3-Antiserum präzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Immunpräzitation mit  $\alpha$ -NS3-Antiserum wurde in allen Proben das ca. 70 kDa große NS3-Protein detektiert (Abb. 22 A, Spuren 1, 2, 4, 6, 8 und B, Spuren 2, 4, 6). Letzteres wurde in zur Kontrolle mit pGST transfizieren Zellen nicht nachgewiesen (Abb. 22 B, Spur 1). Neben den NS3-Banden wurden mittels  $\alpha$ -NS3-Antiserum zusätzlich Proteine kopräzipitiert, bei denen es sich der Größe nach um die N-terminal verkürzten NS2A-GST Fusionsproteine handelte (Abb. 22 A, Spuren 1, 2, 4, 6, 8 und B, Spuren 2, 4, 6). Da auf derselben Höhe auch die durch  $\alpha$ -GST-Antiserum präzipitierten Banden (Abb. 22 A, Spuren 3, 5, 7, 9 und B, Spuren 3, 5, 7) liefen, war deren Identität eindeutig bewiesen. Auch durch den Einsatz des  $\alpha$ -GST-Antiserums wurde das koexprimierte NS3-Protein kopräzipitiert, was auf die Interaktion zwischen NS3 und den Proteinen G1-, M17-, M30-, S97-, M188-, A196-, bzw. A214-NS2A-GST hindeutet. Aus den unter 3.2.6 und 3.2.7 erzielten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Interaktion mit NS3 im AS-Abschnitt M13 bis Q25 bzw. am C-Terminus des NS2A-Proteins stattfinden muss.



**Abbildung 22 A: Interaktion von NS3 mit N-terminal verkürzten NS2A-GST-Proteinen.** Nach T7-Vaccinia-Virus Infektion und Transfektion von BHK-J-Zellen erfolgte eine radioaktive Markierung durch  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zelllysate wurden einer Präzipitation mit  $\alpha$ -NS3-Antiserum und Sepharose-A bzw.  $\alpha$ -GST-Antiserum und Sepharose-G unterzogen. Die Probenauftrennung erfolgte mittels SDS-PAGE (12%ig). M =  $^{14}\text{C}$ -Proteinmarker [kDa].



**Abbildung 22 B: Interaktion von NS3 mit N-terminal verkürzten NS2A-GST-Proteinen.** Legende siehe Abb. 22 A.



### **3.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Membrantopologie von NS2A**

Zur Überprüfung und weiterführenden Interpretation der bisher erzielten Ergebnisse sollte die Membrantopologie des NS2A-Proteins untersucht werden. Wie schon erwähnt, handelt es sich um ein hydrophobes Protein, das wahrscheinlich membrandurchspannend ist. Da Virusreplikation und "Partikelassembly" an der ER-Membran abzulaufen scheinen (Lindenbach & Rice, 2001), liegt die Vermutung nahe, dass NS2A im ER lokalisiert ist.

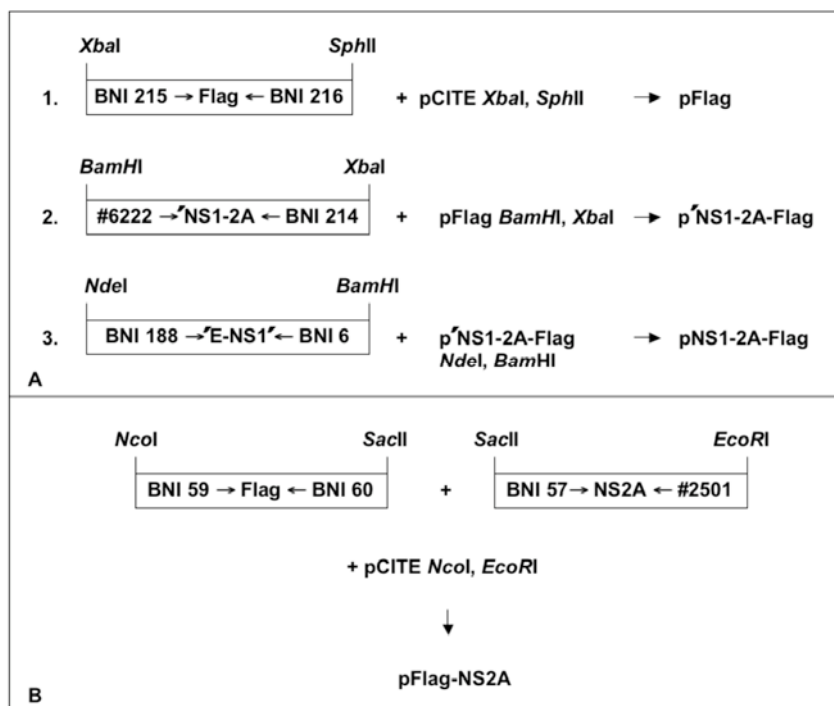
#### **3.3.1 Analyse der subzellulären Lokalisation von NS2A mittels IF**

Um die Lokalisation von NS2A zu untersuchen, wurde das in BHK-J-Zellen exprimierte Protein mittels indirekter IF bei einer Wellenlänge von 520 nm nachgewiesen. Gleichzeitig wurde ein spezifisch das ER anfärbender Farbstoff eingesetzt, der bei einer Wellenlänge von 461 nm fluoresziert. Durch Überlagerung der erhaltenen Fluoreszenzsignale kann untersucht werden, ob NS2A und ER kolokalisieren.

#### **3.3.2 Herstellung der Expressionsplasmide pNS1-2A-Flag und pFlag-NS2A**

Für die NS2A-Lokalisationsstudien wurde das Konstrukt pNS1-2A-Flag hergestellt. Um eine authentische Lokalisation des NS2A-Proteins zu erhalten, wurde dem zu exprimierenden NS2A das NS1-Protein inklusive seiner Signalsequenz (24 C-terminale AS des E-Proteins) vorangeschaltet. Letztere bewirkt die Translokation ins ER, wodurch die Proteine NS1-NS2A durch eine ER ständige Protease gespalten werden können. Aus dieser Prozessierung ergibt sich wiederum der authentische N-Terminus des NS2A-Proteins. Da gegen das NS2A-Protein keine spezifischen Antikörper vorhanden sind, wurde an den C-Terminus des NS2A ein Flag-Tag fusioniert. Zur Synthese der Flag-Sequenz wurden die beiden Primer BNI 215 und BNI 216 annealt und in den durch *XbaI* und *SphI* restringierten Vektor pCITE<sup>®</sup>-2a(+) kloniert, wodurch das Plasmid pFlag entstand (Abb. 23 A). Das 'NS1-2A-PCR-Fragment, das mit Hilfe der Primer #6222 und BNI 214, sowie dem GFV-Gesamtklon als Matrize entstanden war, wurde durch die Enzyme *BamHI* und *XbaI* restringiert und in die Plasmid-DNA des durch die entsprechenden Enzyme restringierten Konstruktes pFlag eingefügt (Abb. 23 A). Im letzten Schritt wurde der noch fehlende Abschnitt 'E-NS1' durch PCR mit den Primern BNI 188 und BNI 6 und dem GFV-Gesamtklon als DNA-Matrize amplifiziert. Nach Restriktion mit *NdeI* und *BamHI* wurde dieses Fragment in die vorklonierte Plasmid-DNA eingefügt. Somit kodierte das Plasmid für die Proteine 'E-NS1-NS2A-Flag. Außerdem

wurde das Plasmid pFlag-NS2A hergestellt. Dieses bestand aus dem Vektor pCITE<sup>®</sup>-2a(+), der NS2A mit N-terminaler Flag-Tag-Fusion exprimiert. Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde das Flag-Fragment per Annealing mit den beiden Primern BNI 59 und BNI 60 synthetisiert. Durch PCR mit den Primern BNI 57 und #2501 wurde das NS2A-Fragment amplifiziert, wobei die cDNA des GFV-Gesamtklons als Matrize diente. Das Annealingprodukt, das mit den Enzymen *Sac*II und *Eco*RI restringierte NS2A-Fragment und die *Nco*I/*Eco*RI-restringierte pCITE<sup>®</sup>-2a(+)-DNA wurden ligiert. Nach Transformation wurde die Plasmid-DNA präpariert und sequenziert. Als Negativ-Kontrollen dienten die Plasmide pCITE<sup>®</sup>-2a(+) bzw. pFlag-VP30. Letzteres exprimiert das VP30-Protein des Ebola-Virus mit N-terminaler Flag-Tag-Fusion. Laut Computervorhersage ist das VP30-Protein nicht membrandurchspannend.

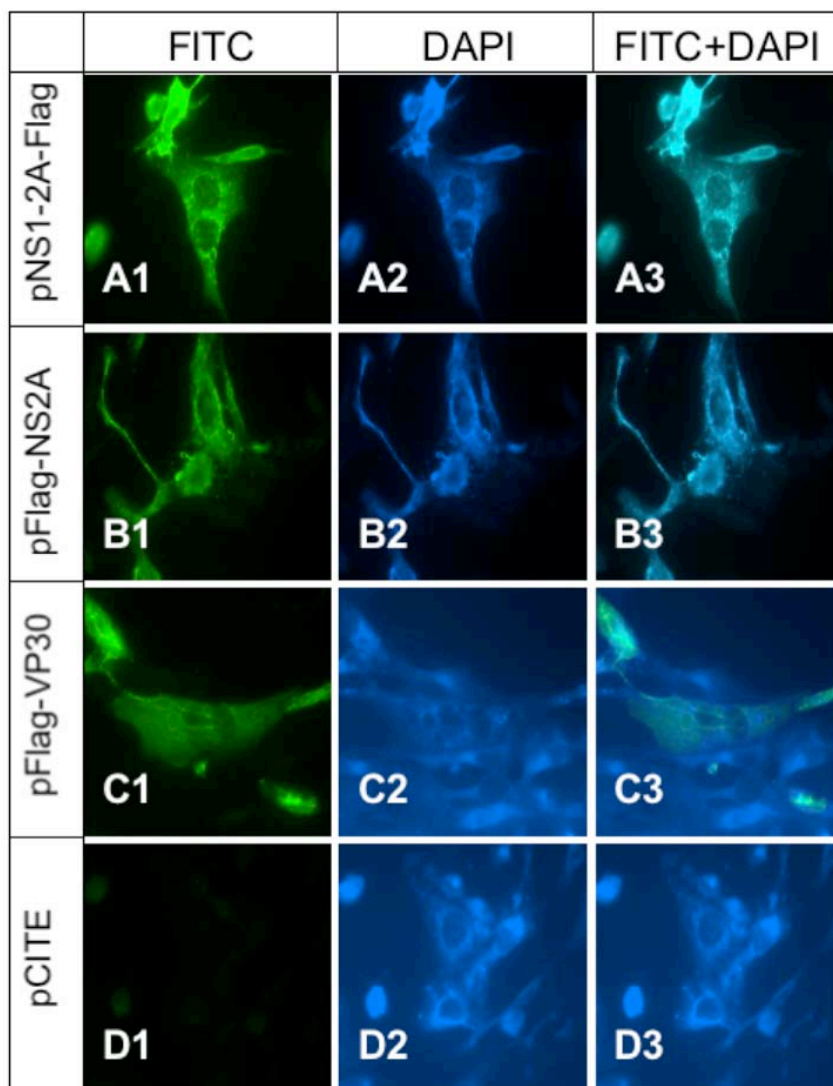


**Abbildung 23 A und B: Klonierungsschemata der Konstrukte pNS1-2A-Flag und pFlag-NS2A.** A: pNS1-2A-Flag. B: pFlag-NS2A. Die durch PCR erzeugten Fragmente sind durch Balken dargestellt, wobei die verwendeten Primer, sowie der Name des PCR-Produkts bzw. der vom PCR-Produkt kodierte Genabschnitt aufgeführt sind. Weiterhin sind die zur Restriktion der Fragmente eingesetzten Enzyme angegeben. Unter A ist die schrittweise durch jeweils Zweifragmenteligation erfolgte Klonierung des Plasmids pNS1-2A-Flag dargestellt, dagegen wird unter B eine Dreifragmenteligation zur Erzeugung des Konstruktes pFlag-NS2A gezeigt.

### **3.3.3 Kolokalisationsstudien**

Einen Tag nach Transfektion der Plasmide pNS1-2A-Flag, pFlag-NS2A, pFlag-VP30 bzw. pCITE<sup>®</sup>-2a(+) wurde das ER mittels ER-Trackers angefärbt. Zum Nachweis der Flag-markierten Proteine wurde anschließend eine indirekte IF mit Hilfe von mAK  $\alpha$ -Flag und FITC konjugiertem  $\alpha$ -Maus IgG-Antiserum durchgeführt. Die Zellen wurden unter UV-Licht der Wellenlängen 520 nm und 461 nm mikroskopiert (Leica TCS NT) und fotografiert (Leica DFC 350FX). Die Übereinanderlegung der Bilder erfolgte am Computer durch das Programm OpenLab 4.0.4.

Nach Transfektion der Plasmide pNS1-2A-Flag bzw. pFlag-NS2A zeigten die Flag-markierten Proteine unter Anregung bei 520 nm ein durch Punkte gekennzeichnetes, perinukleares Muster, wie es für ER-assoziierte Proteine typisch ist (Abb. 24 A1 bzw. B1). In Abbildung 24 A2 bzw. B2 ist jeweils das mittels ER-Tracker angefärbte ER sichtbar. Nach dem Übereinanderlegen der beiden bei unterschiedlichen Wellenlängen erzeugten Bilder konnte man erkennen, dass das NS2A-Protein mit dem ER kolokalisiert (Abb. 24 A3 bzw. B3). Im Gegensatz dazu konnte nach Transfektion des Kontrollplasmides pFlag-VP30 ein Fluoreszenzsignal im gesamten Zytoplasma beobachtet werden (Abb. 24 C1). Auch die Überlagerung mit dem nach ER-Färbung entstandenen Bild (Abb. 24 C2) zeigt, dass VP30 kein ER ständiges Protein ist (Abb. 24 C3). Die zur Kontrolle mit pCITE<sup>®</sup>-2a(+) transfizierten Zellen zeigten bei 520 nm keine Immunfluoreszenz, da hier kein Flag-markiertes Protein exprimiert wurde (Abb. 24 D1). Daher ist in den Abbildungen 25 D2 und D3 lediglich das gefärbte ER zu sehen.



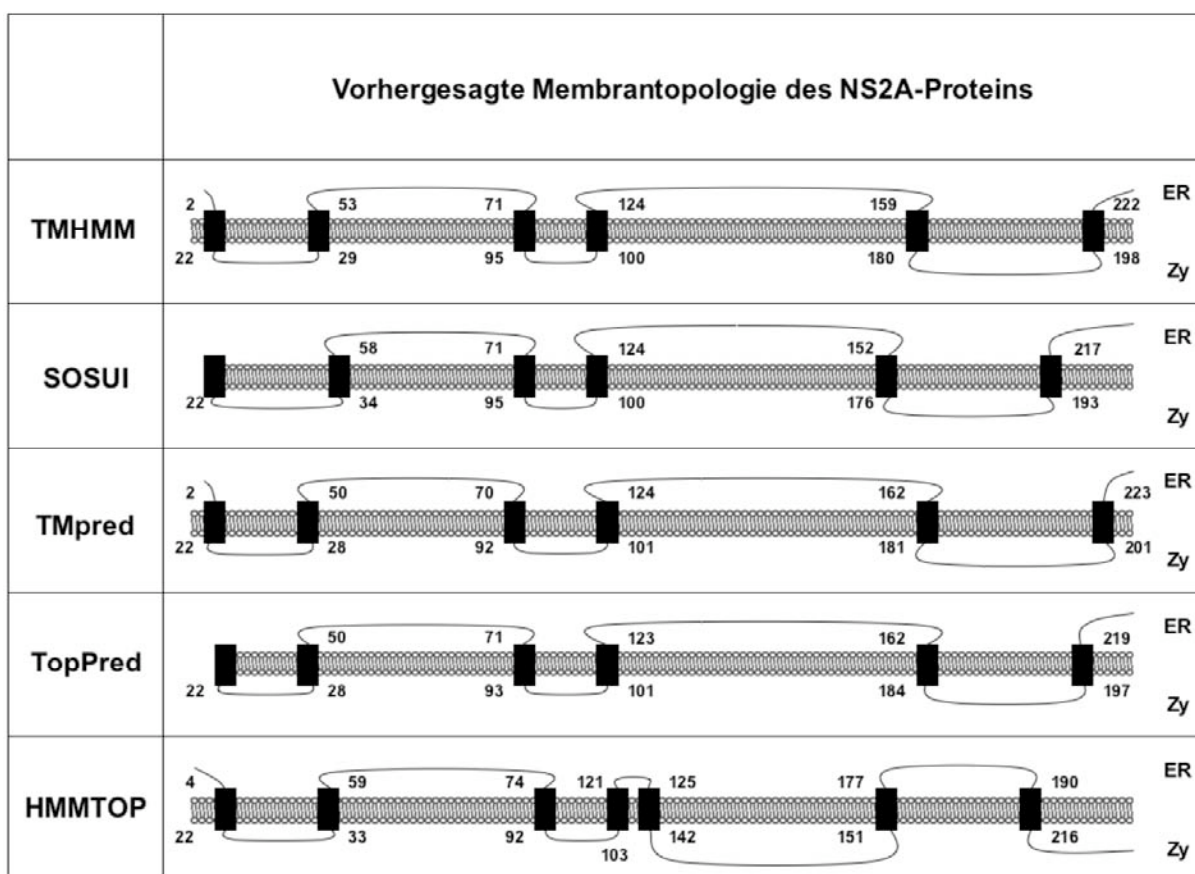
**Abbildung 24: Lokalisation des NS2A-Proteins.** Einen Tag nach Transfektion T7-Vaccinia-Virus infizierter BHK-J-Zellen wurde das ER mittels ER-Tracker angefärbt. Die anschließend fixierten Zellen wurden mit Hilfe des mAK  $\alpha$ -Flag (Maus) und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC-Antiserum zur indirekten IF vorbereitet. **1:** Alle Bilder der Spalte 1 wurden unter Bestrahlung der Wellenlänge von 520 nm fotografiert (FITC). **2:** Dagegen entstanden die Fotos der Spalte 2 bei einer Wellenlänge von 461 nm (DAPI) **3:** Spalte 3 zeigt die übereinandergelegten Bilder von Spalte 1 und 2 (FITC und DAPI) **A:** pNS1-2A-Flag **B:** pFlag-NS2A. **C:** pFlag-VP30 **D:** pCITE<sup>®</sup>-2a(+)

### **3.3.4 Vergleich verschiedener Computervorhersagen der NS2A-Topologie**

Eine erste Vorstellung der NS2A-Membrantopologie entstand durch Computervorhersagen mit Hilfe folgender Programme: TMHMM2.0 (Sonnhammer et al., 1998 und Krogh et al., 2001), HMMTOP (Tusnady & Simon, 1998 und Tusnady & Simon, 2001), SOSUI (Hirokawa et al., 1998), TMpred (Hofmann & Stoffel, 1993), TopPred (Claros & von Heijne, 1994). Abbildung 25 zeigt die durch verschiedene Programme vorhergesagten Membrantopologien des GFV-Proteins NS2A. Um die *in vivo* Situation bestmoglich nachzuahmen, d.h. die Translokation des N-terminalen NS2A-Endes in das ER zu

gewährleisten, wurde bei den Vorhersagen der NS2A-AS-Sequenz die des NS1 inklusive dessen Signalsequenz vorangeschaltet. (In Abbildung 25 ist allerdings lediglich der NS2A-Bereich gezeigt.) Auch der C-Terminus von NS2A entsprach der natürlichen Endung; der letzten AS des NS2A (R224) wurde die erste AS des NS2B (S1) angehängt.

Die einzige Prognose mit sieben Transmembrandomänen (TMD) entstand durch das Programm HMMTOP. Alle anderen Computerprogramme sagten sechs TMD in mehr oder weniger übereinstimmenden Bereichen vorher. Daher diente die Vorhersage des TMHMM-Programms mit sechs TMD als Ausgangspunkt für den Entwurf der im folgenden beschriebenen Konstrukte. Dieses Computerprogramm zeichnet sich laut Sonnhammer et al. (1998) durch sehr hohe Genauigkeit aus.



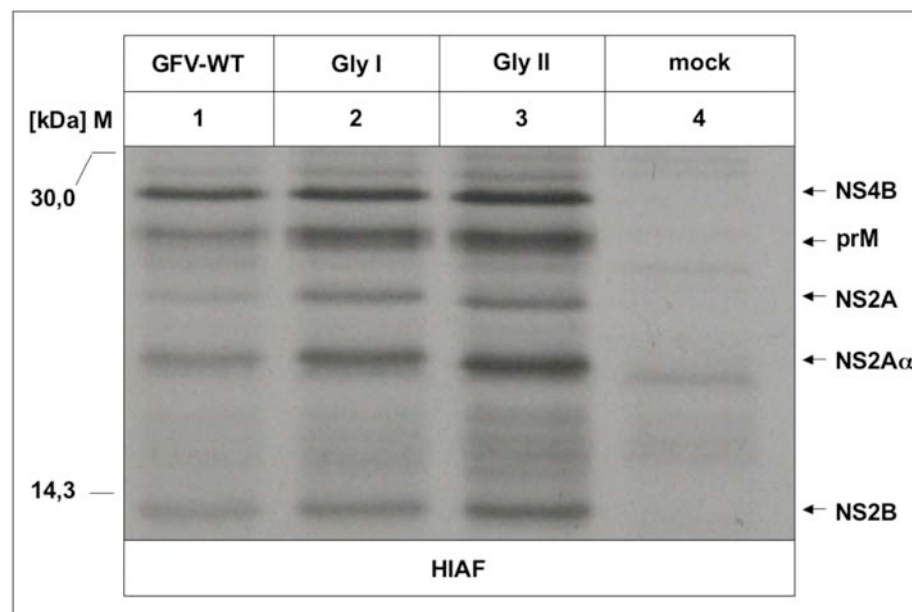
**Abbildung 25: Verschiedene Modelle der Membrantopologie von NS2A, basierend auf Ergebnissen unterschiedlicher Computerprogramme.** Gezeigt werden hier lediglich die Membrantopologievorhersagen für den NS2A-Abschnitt, während zur Berechnung auch die AS-Sequenzen von E-NS1 miteinbezogen wurden. Die schematisch dargestellte Membran wird von den vorhergesagten TMD (schwarze Kästen) durchspannt. Die Positionen der jeweils ersten und letzten NS2A-AS, die noch außerhalb der Membran liegen, sind gekennzeichnet. ER: Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Zy: Zytoplasma.

### **3.3.5 Untersuchung der NS2A-Topologie durch Insertion von Glykosylierungsstellen**

Die N-Glykosylierung von Asparaginresten gerade entstehender Polypeptidketten findet im Lumen des ER statt. Hierbei überträgt die N-Oligosaccharyltransferase ein schrittweise aufgebautes Oligosaccharid auf Asparagin-Reste der Sequenz N-X-S/T. Jede AS außer Prolin kann dabei die Stelle von X einnehmen (Berg et al., 2003). Durch das angehängte Oligosaccharid nimmt das Molekulargewicht des glykosylierten Proteins um 2 kDa zu. Die Endoglykosidase PNGaseF spaltet N-glykosydisch gebundene Seitenketten wieder ab, was durch die Abnahme des apparenten Molekulargewichts zu verfolgen ist. Um die computervorhergesagte Membrantopologie von NS2A zu überprüfen, wurde an verschiedenen Stellen des Proteins jeweils eine Glykosylierungsstelle eingefügt. Dabei wurde darauf geachtet, dass diese laut TMHMM-Modell (Abb. 25) entweder im Zytoplasma oder im ER-Lumen, aber nicht in einer TMD lagen. Nach EP bzw. Transfektion der unterschiedlichen Konstrukte und anschließender Radioimmunpräzipitation konnte man bei einer Molekulargewichtszunahme von 2 kDa davon ausgehen, dass sich die untersuchte Stelle im ER-Lumen befindet.

#### **3.3.5.1 Einfügen von Glykosylierungsstellen in den GFV-Gesamtklon und dessen Expression**

An den in Abbildung 27 mit GI und GII markierten Stellen wurden mit Hilfe der Primer BNI 81 und BNI 82, bzw. BNI 83 und BNI 84 durch gerichtete Mutagenese Glykosylierungsstellen eingebaut. Dies erfolgte entsprechend dem in Abbildung 6 A und B (3.1.1) dargestellten Klonierungsschema. Die erfolgreiche Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach Linearisierung durch *Xho*I-Restriktion, einer Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung wurde die so erhaltene DNA *in vitro* transkribiert. Je 3 µg der entstandenen RNA wurden durch EP in BHK-J-Zellen eingeschleust. Ein Tag später erfolgte eine radioaktive Markierung der translatierten Proteine durch Zugabe von <sup>35</sup>S Methionin/Cystein. Die geernteten Zelllysate wurden mit Hilfe von HIAF präzipitiert. Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels Fluorographie analysiert. Gegenüber den GFV-WT-NS2A-spezifischen Proteinen (Abb. 26, Spalte 1) zeigten die der Glykosylierungsvarianten (Abb. 26, Spalten 2 und 3) keine Molekulargewichtszunahme. Eine Glykosylierung der NS2A-Positionen I und II fand also offenbar nicht statt.

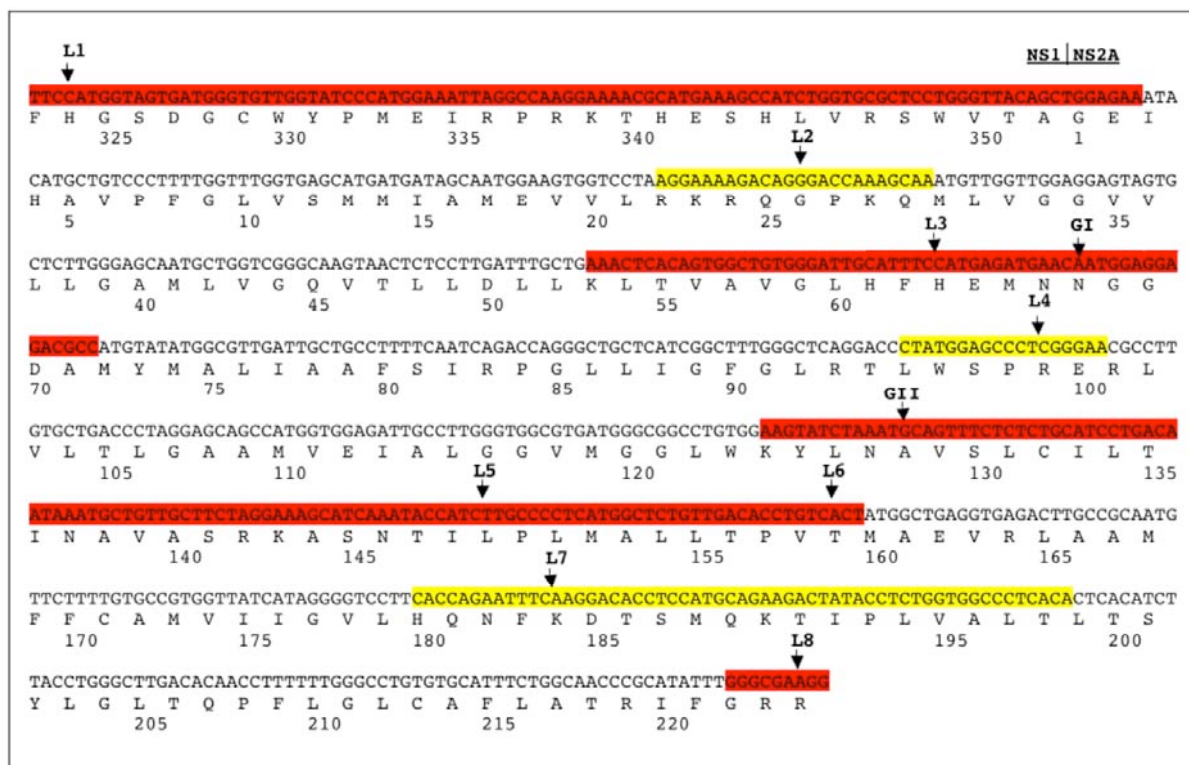


**Abbildung 26: Radioimmunpräzipitation der Glykosylierungsvarianten.** Nach EP *in vitro* transkribierter mutierter bzw. nicht mutierter GFV-RNA in BHK-J-Zellen und radioaktiver Markierung mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein wurden die Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert. Die Präzipitation erfolgte mit Hilfe von HIAF und Pansorbin. Die Präzipitate wurden mittels SDS-PAGE (14%ig) aufgetrennt. M =  $^{14}\text{C}$ -Proteinmarker [kDa].

### 3.3.5.2 Herstellung der Expressionsplasmide mit Glykosylierungsloop

Nilsson & von Heijne (1993) fordern einen minimalen Abstand von 12 bis 14 AS von der Membran bis zum Akzeptor Asparagin, damit eine Glykosylierung stattfinden kann. Die unterbliebene Glykosylierung der unter 3.3.5.1 beschriebenen Mutanten an Position GI und GII könnte demnach auch darauf zurückzuführen sein, dass die Glykosylierungsstellen zu nah an der Membran gelegen sind. Um eine Distanz der Glykosylierungsstelle zur Membran von 12-14 AS zu gewährleisten, verwendeten Lundin et al. (2003) einen Glykosylierungsloop mit folgender AS-Sequenz Y<sub>T</sub>Q<sub>K</sub>L<sub>S</sub>V<sub>P</sub>D<sub>G</sub>F<sub>K</sub>V<sub>S</sub>N<sub>S</sub>S<sub>A</sub>R<sub>G</sub>W<sub>V</sub>I<sub>H</sub>P<sub>L</sub>G<sub>L</sub>R<sub>S</sub>E<sub>F</sub>. Letztere stellt einen extrazellulären Loop des als Anionenaustauscher menschlicher Erythrozyten fungierenden Proteins "Band 3" dar (Tanner et al., 1988). In Analogie zu der von Lundin et al. beschriebenen Untersuchung sollte ein Glykosylierungsloop an verschiedenen Stellen des NS2A eingefügt werden. Hierzu wurde zunächst an den in Abbildung 27 mit L1-L8 markierten Stellen jeweils eine *Xho*I-Schnittstelle durch gerichtete Mutagenese in die NS2A-Sequenz des Plasmids pNS1-2A-Flag (siehe Abb. 23 A, 3.3.2) eingefügt. Die hierbei verwendeten Primer sind in Tabelle 29 aufgelistet. Anschließend wurde die DNA mittels *Xho*I restringiert und der durch Annealing der beiden Primer BNI 255 und BNI 256 erzeugte Glykosylierungsloop eingefügt. Ob das Loop-Fragment mit dem Glykosylierungsloop in

gewünschter Richtung inkloniert worden war, wurde durch Screening-PCR und Sequenzierung überprüft. Laut Computervorhersagen (TMHMM bzw. SOSUI) sollte die Einführung der Glykosylierungsloops nicht zur Veränderung der NS2A-Membrantopologie führen.



**Abbildung 27: Positionen der in die NS2A-Sequenz eingefügten Glykosylierungsstellen.** Die Abbildung zeigt die GFV-NS2A-Nukleotid- und AS-Sequenz. An den mit L1-L8 markierten Stellen wurden innerhalb des Plasmids pNS1-2A-Flag durch gerichtete Mutagenese *XhoI*-Schnittstellen erzeugt, um danach die Loopsequenz inklusive Glykosylierungsstelle einfügen zu können. Loopposition 1 liegt im NS1, während sich die Looppositionen 2 bis 8 im NS2A befinden. An den mit GI und GII gekennzeichneten Positionen wurden innerhalb des GFV-Gesamtklons Glykosylierungsstellen ohne Loopstruktur eingefügt. Farblich nicht unterlegte Bereiche durchspannen nach der TMHMM-Vorhersage die Membran, rot markierte Bereiche liegen im ER-Lumen, gelb markierte Bereiche im Zytoplasma.

**Tabelle 29: Zur Einfügung der *XhoI*-Schnittstelle eingesetzte Primer.**

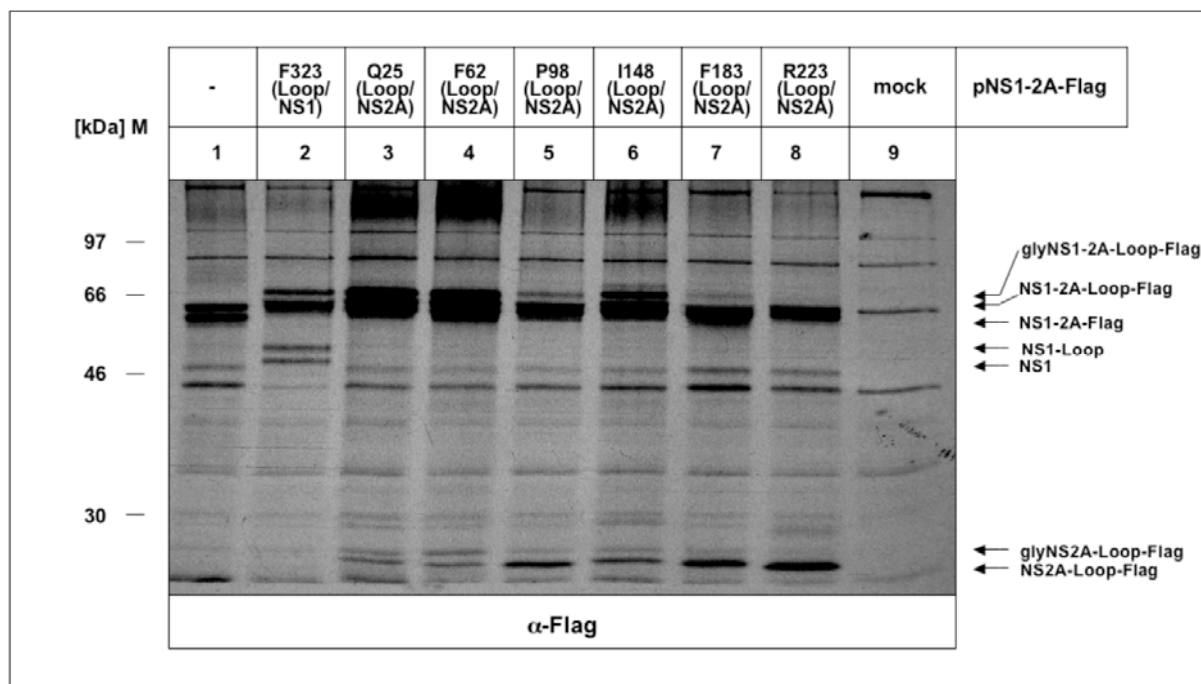
<i>XhoI</i> -Stelle	Klon	Primer
L1	pNS1(F323 <i>XhoI</i> )-2A-Flag	BNI 237 und BNI 238
L2	pNS1-2A(Q25 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 239 und BNI 240
L3	pNS1-2A(F62 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 241 und BNI 242
L4	pNS1-2A(P98 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 243 und BNI 244
L5	pNS1-2A(I148 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 245 und BNI 246
L6	pNS1-2A(P157 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 396 und BNI 397
L7	pNS1-2A(F183 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 247 und BNI 248
L8	pNS1-2A(R223 <i>XhoI</i> )-Flag	BNI 249 und BNI 250



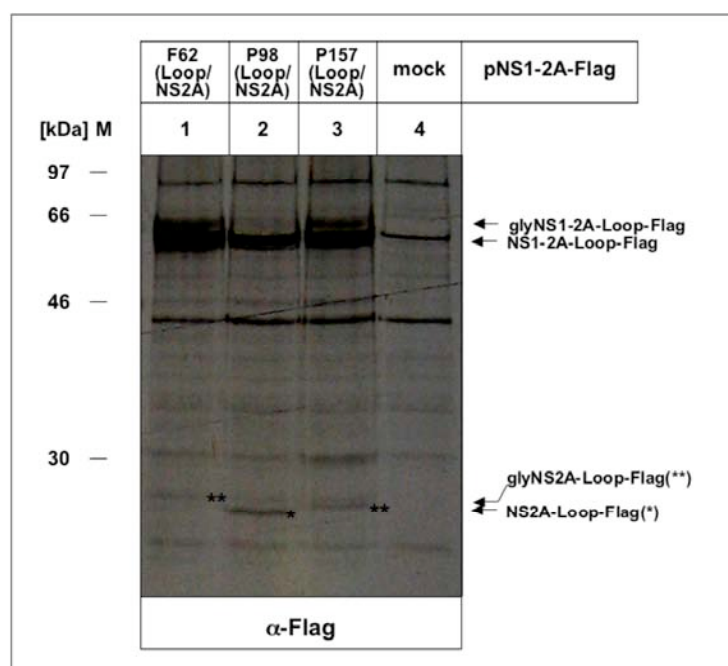
### **3.3.5.3 Expression der Glykosylierungsloop tragenden NS2A-Varianten im T7-Vaccinia-Virus-System**

Um zu untersuchen, ob eine Glykosylierung an den in Abbildung 27 markierten Stellen erfolgt, wurden die Glykosylierungsloopkonstrukte in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-Zellen transfiziert. Exprimierte Proteine wurden nach metabolischer Markierung durch <sup>35</sup>S Methionin/Cystein und anschließender Immunpräzipitation mit Hilfe des mAK  $\alpha$ -Flag analysiert. Nach der Proteinauftrennung durch SDS-PAGE und Fluorographieanalyse zeigten sich die in Abbildung 28 dargestellten Expressionsmuster.

Nach Expression der Plasmide pQ25(Loop/NS2A), pF62(Loop/NS2A), pP98(Loop/NS2A), pI148(Loop/NS2A), pF183(Loop/NS2A) und pR223(Loop/NS2A) wurde mittels mAK  $\alpha$ -Flag ein ca. 27 kDa großes Protein präzipitiert, welches dem NS2A-Loop-Flag Fusionsprotein entsprach (Abb. 28 A, Spalten 3-8). Dagegen war das durch die Plasmide pNS1-2A-Flag bzw. pF323(Loop/NS1) exprimierte NS2A-Protein um ca. 2 kDa kleiner. Letzteres wurde zur besseren Auftrennung der glykosylierten und nicht glykosylierten Proteine in dem in Abbildung 28 A dokumentierten Versuch aus dem Gel herauslaufen gelassen. In analogen Versuchen konnte aber der Größenunterschied belegt werden (Daten nicht gezeigt). Nach Expression der Konstrukte pQ25(Loop/NS2A), pF62(Loop/NS2A) und pI148(Loop/NS2A) konnte ein zusätzliches Protein detektiert werden, das geringfügig größer als das NS2A-Loop-Flag-Protein war und für dessen glykosylierte Variante gehalten wurde (Abb. 28 A, Spalten 3, 4, 6). Für das Konstrukt pF323(Loop/NS1) konnte eine Molekulargewichtszunahme des NS1-Proteins beobachtet werden. Letzteres wurde als ca. 50 kDa Doppelbande (Abb. 28 A, Spalte 2) detektiert, während sich die für unmodifiziertes NS1-Protein typische Doppelbande bei ca. 46 kDa zeigte (Abb. 28 A, Spalten 1 und 3-8). Auffallend war noch eine andere, dem ungespaltenen NS1-2A-Flag-Protein zugeschriebene Bande. Diese lief nach Expression sämtlicher Glykosylierungskonstrukte gegenüber dem durch das Kontrollplasmid exprimierten Protein erhöht (Abb. 28 A, Spalten 2-8). Bei den Konstrukten pF323(Loop/NS1), pQ25(Loop/NS2A), pF62(Loop/NS2A), pI148(Loop/NS2A) und pP157(Loop/NS2A) konnte noch eine geringfügig über dieser liegende Bande detektiert werden, die für die glykosylierte Form des entsprechenden Proteins gehalten wurde (Abb. 28 A, Spalten 2, 3, 4, 6 und B, Spalten 1 und 3).



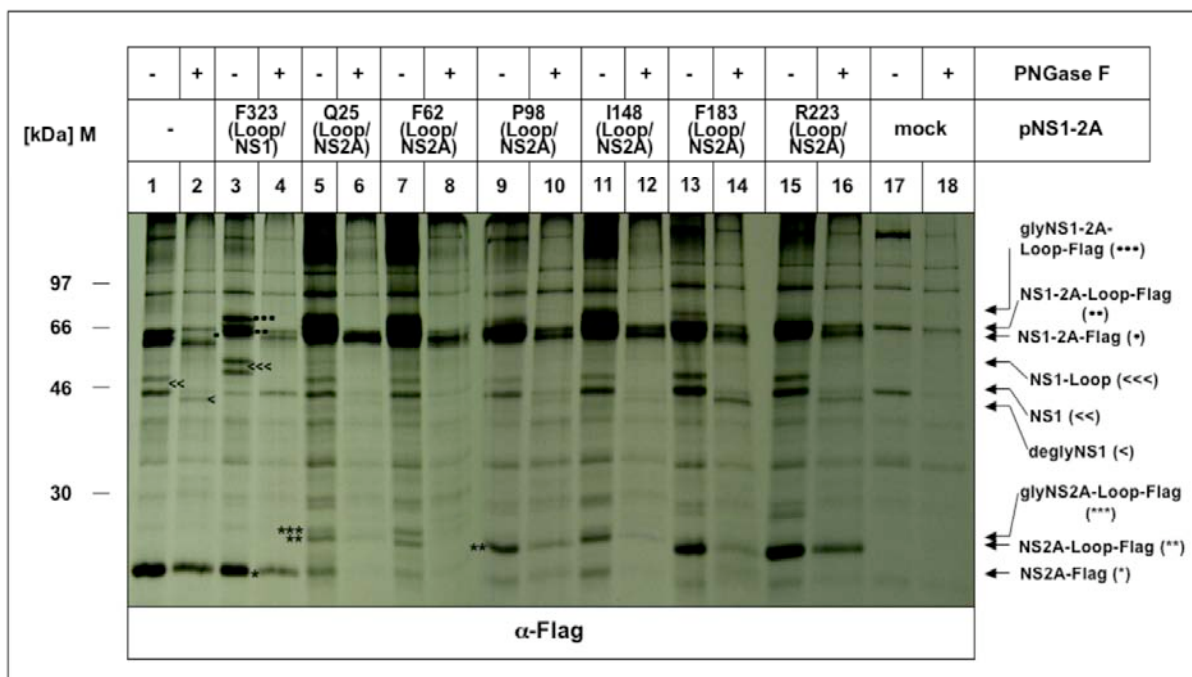
**Abbildung 28 A: Expressionsmuster der Glykosylierungsloopkonstrukte.** Nach Transfektion in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-Zellen wurden die zu exprimierenden Proteine metabolisch mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein markiert. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zelllysate wurden einer Präzipitation durch mAK  $\alpha$ -Flag und Sepharose-A unterzogen. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE (12%ig) aufgetrennt und durch Fluorographie analysiert.  $M = ^{14}\text{C}$ -Proteinmarker [kDa].



**Abbildung 28 B: Expressionsmuster der Glykosylierungsloopkonstrukte.** Legende siehe Abb. 28 A. Mit Sternchen sind besonders schwache Banden markiert.

#### **3.3.5.4 Nachweis der Glykosylierung durch Deglykosylierung mittels PNGaseF**

Um zu untersuchen, ob es sich bei den NS2A-Flag- bzw. NS1-2A-Flag Fusionsproteinen um die glykosylierte Form handelte, oder die beobachtete Molekulargewichtszunahme lediglich auf der zusätzlichen Loopexpression basierte, wurden die durch den mAK  $\alpha$ -Flag präzipitierten Proteine mittels PNGaseF deglykosyliert und anschließend per SDS-PAGE aufgetrennt. Die durch sämtliche Konstrukte exprimierten NS1-Proteine konnten deglykosyliert werden, was die Enzymaktivität der PNGaseF beweist (Abb. 29, Spalten 1-16). Ebenso war das NS2A-Flag Fusionsprotein der Konstrukte pQ25(Loop/NS2A), pF62(Loop/NS2A) und pI148(Loop/NS2A) gegenüber der PNGaseF sensitiv, was dafür spricht, dass es sich bei den entsprechenden Proteinen um die glykosylierten Varianten handelte (Abb. 29, Spalten 5, 7, 11). Daraus folgt, dass sich diese Proteinabschnitte offensichtlich im ER-Lumen befinden. Dagegen konnten die durch die Konstrukte pF323(Loop/NS1), pP98(Loop/NS2A), pF183(Loop/NS2A) und pR223(Loop/NS2A) exprimierten NS2A-Flag-Fusionsproteine nicht deglykosyliert werden (Abb. 29, Spalten 3, 4, 9, 10, 13, 14, 15, 16), weshalb die entsprechenden Glykosylierungsstellen sich sehr wahrscheinlich nicht im ER-Lumen befinden. Die erfolgte bzw. nicht erfolgte Deglykosylierung ist ebenfalls auf der Ebene der NS1-2A-Flag Proteine zu verfolgen. Während die NS2A-Flag-Bande des Konstruktes pI148(Loop/NS2A) nach PNGaseF-Behandlung noch ganz schwach zu detektieren war, fand die Deglykosylierung des NS1-2A-Flag-Proteins eindeutig statt (Abb. 29, Spalten 11 und 12). Erstaunlicherweise konnte auch das durch pF183(Loop/NS2A) exprimierte NS1-2A-Flag-Protein deglykosyliert werden, während dies beim NS2A-Flag-Protein nicht möglich war. Die Deglykosylierung der durch das Konstrukt pP157(Loop/NS2A) exprimierten Proteine konnte nicht verfolgt werden, da sich keine auswertbaren Banden ergaben (Daten nicht gezeigt).

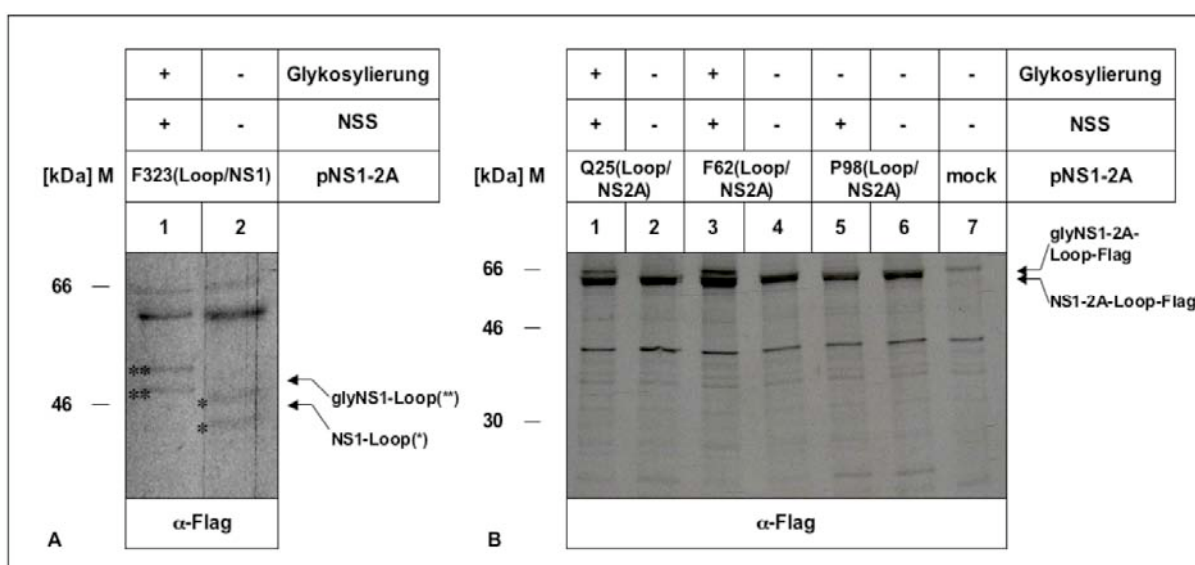


**Abbildung 29: Proteindeglykosylierung mittels PNGaseF.** Nach Transfektion der Glykosylierungsloopkonstrukte in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-Zellen wurden die zu exprimierenden Proteine metabolisch mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein markiert. Die unter nicht denaturierenden Bedingungen gewonnenen Zelllysate wurden einer Präzipitation durch mAK  $\alpha$ -Flag und Sepharose-A unterzogen. Die präzipitierten Proteine wurden mittels PNGaseF deglykosyliert und anschließend durch SDS-PAGE (14%ig) aufgetrennt. M =  $^{14}\text{C}$ -Proteinmarker [kDa]. Beispielhaft sind Banden unterschiedlicher Proteine bzw. deren Glykosylierungsvarianten durch Sternchen, Pfeile oder Punkte gekennzeichnet.

### 3.3.5.5 Nachweis der Glykosylierung durch Vergleich von NS2A-Loop-Varianten mit und ohne Glykosylierungsstellen

Um über einen weiteren Versuchsansatz unterscheiden zu können, ob der beobachtete Größenshift des NS2A-Flag-Fusionsproteins lediglich auf die Einführung des Glykosylierungsloops oder auch auf eine erfolgte Glykosylierung zurückzuführen ist, wurde zu jedem Konstrukt noch eine Variante hergestellt, bei der durch gerichtete Mutagenese mit den Primern BNI 321 und BNI 322 die Glykosylierungsstelle innerhalb der Loopsequenz entfernt wurde. Die AS-Abfolge der Glykosylierungsstelle N-S-S wurde zu N-S-A mutiert. Nach Transfektion der Loopkonstrukte mit bzw. ohne Glykosylierungsstelle konnten in einigen Fällen auf Höhe der NS1-2A-Flag-Proteine Größenunterschiede festgestellt werden. War die Glykosylierungsstelle bei den Konstrukten pQ25(Loop/NS2A), pF62(Loop/NS2A), pI148(Loop/NS2A) vorhanden, so war eine geringfügig über dem NS1-2A-Flag-Protein liegende Bande zu detektieren (Abb. 30 B, Spalten 1 und 3, Abb. 30 C, Spalte 1). Letztere fehlte, wenn die Glykosylierungsstelle entfernt worden war (Abb. 30 B, Spalten 2 und 4, Abb. 30 C, Spalte 2). Daher war der Beweis erbracht, dass es sich bei dem größeren Protein

um die glykosylierte Variante handelte. Demzufolge befanden sich die entsprechenden Glykosylierungsstellen im ER-Lumen. Letzteres war bei den Konstrukten pP98(Loop/NS2A), pF183(Loop/NS2A) und pR223(Loop/NS2A) nicht der Fall, da hier keine zusätzliche, glykosylierte Variante des NS1-2A-Flag-Proteins nachzuweisen war (Abb. 30 B, Spalten 5 und 6, Abb. 30 C, Spalten 3-6). Ein Vergleich der durch das Konstrukt pP157(Loop/NS2A) mit bzw. ohne Glykosylierungsstelle war nicht möglich, da die entsprechend detektierten Banden zu schwach waren, als dass sie ausgewertet hätten werden können (Daten nicht gezeigt). Das zur Kontrolle eingesetzte Plasmid pF323(Loop/NS1) exprimierte bei intakter Glykosylierungsstelle ein NS1-Protein, das über Koimmunpräzipitation mittels mAK  $\alpha$ -Flag durch eine ca. 50 kDa große Doppelbande nachgewiesen werden konnte (Abb. 30 A, Spalte 1). Fehlte dem Konstrukt die Glykosylierungsstelle innerhalb der Loopsequenz, so folgte daraus die Detektion einer erniedrigt laufenden Bande (Abb. 30 A, Spalte 2).



**Abbildung 30 A und B: Vergleich der Expressionsmuster von Loopkonstrukten mit bzw. ohne Glykosylierungsstellen.** Die Konstrukte mit bzw. ohne Glykosylierungsstelle innerhalb der Loopsequenz wurden in T7-Vaccinia-Virus infizierte Zellen transfiziert. Nach metabolischer Markierung mittels  $^{35}\text{S}$  Methionin/Cystein wurden die Zellen unter nicht denaturierenden Bedingungen lysiert. Anschließend erfolgte eine Proteinpräzipitation durch mAK  $\alpha$ -Flag und Sepharose-A. Die per SDS-PAGE (12%ig) aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe von Fluorographie analysiert. M =  $^{14}\text{C}$ -Proteinmarker [kDa].

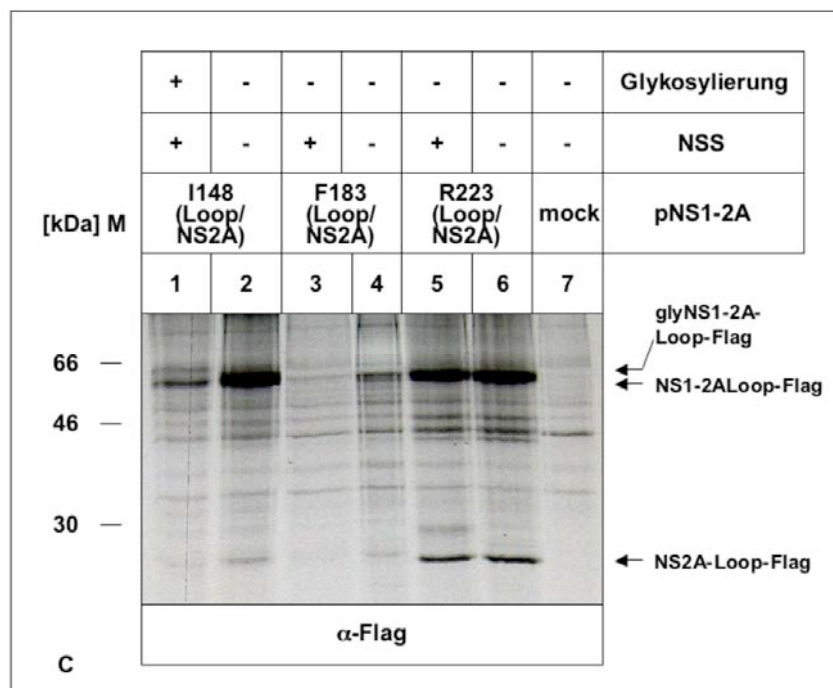


Abbildung 30 C: Vergleich der Expressionsmuster von Loopkonstrukten mit bzw. ohne Glykosylierungsstellen.

### 3.3.6 Untersuchung der NS2A-Topologie mittels Insertion von HA-Tags und anschließender Immunfluoreszenzanalyse

Um die in den vorangegangenen Versuchen erzielten Ergebnisse zu überprüfen, wurde jeweils statt der Glykosylierungsstelle enthaltenden Loopsequenz eine kurze, für das Hemagglutinin-(HA-) Tag kodierende Sequenz (YPYDVPDYA) in die unter 3.3.5.2 beschriebenen Konstrukte eingefügt. Dazu wurden zunächst die DNA der Loopkonstrukte mit *XhoI* restringiert, wodurch der Loop entfernt wurde. Die so restringierte DNA wurde anschließend mit der HA-Tag-Sequenz, die durch Annealing der Primer BNI 382 und BNI 383 entstanden war, ligiert. Nach Transformation in Bakterien wurde die entsprechende Plasmid-DNA der Konstrukte pF323(HA/NS1), pQ25(HA/NS2A), pF62(HA/NS2A), pP98(HA/NS2A), pI148(HA/NS2A), pP157(HA/NS2A), pF183(HA/NS2A) und pR223(HA/NS2A) isoliert und per Screening-PCR und Sequenzierung überprüft. Laut Computervorhersage (TMHMM bzw. SOSUI) sollten die Topologiemodelle der HA-Tag-markierten NS2A-Proteine dem des NS2A-WT-Proteins entsprechen.

Nach Transfektion der HA-Tag enthaltenden pNS1-2A-Konstrukte in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-J-Zellen wurde eine selektive Permeabilisierung der Zellen durchgeführt. Eine niedrige Digitoninkonzentration macht lediglich die Plasmamembran durchlässig, da diese

verglichen mit intrazellulären Membranen über eine höhere Konzentration an Cholesterol verfügt (Lange, 1991). Die ER-Membran bleibt also intakt. Daher ist nach Inkubation mit mAK  $\alpha$ -HA nur ein positives Fluoreszenzsignal zu sehen, wenn das HA-Tag im Zytoplasma exponiert ist. Befindet sich das HA-Tag im ER-Lumen, kann der entsprechende Antikörper nicht daran binden, und es ist keine Fluoreszenz zu beobachten. Als Positivkontrolle dienen mit Triton X 100 behandelte Zellen. Die vollständige Permeabilisierung führte dazu, dass sowohl im Zytoplasma als auch im ER lokalisierte HA-Tags für den Nachweis mittels indirekter IF zugänglich sind. Wie Abbildung 31 zeigt, konnte nach Transfektion der Plasmide pQ25(HA/NS2A), pF62(HA/NS2A), pF183(HA/NS2A) und pR223(HA/NS2A) ein positives IF-Signal sowohl nach Permeabilisierung mittels Triton X 100 als auch Digitonin beobachtet werden. Daher ist davon auszugehen, dass die entsprechenden HA-Tag enthaltenden NS2A-Bereiche im Zytoplasma lokalisiert sind. Dagegen wurde nach Transfektion der Plasmide pF323(HA/NS2A), pP98(HA/NS2A), pI148(HA/NS2A) und pP157(HA/NS2A) lediglich nach Triton X 100 Behandlung ein positives Fluoreszenzsignal erhalten (Abb. 31). Demzufolge liegen die entsprechenden Bereiche nicht im Zytoplasma. Auffällig war, dass nach Transfektion des Plasmids pP157(HA/NS2A) die Fluoreszenz nach Behandlung mit Triton X 100 schwächer war, selbst wenn die Permeabilisierung durch eine 0,5%ige Triton X 100 Lösung erfolgte. Mit pNS1-2A-Flag transfizierte Zellen fluoreszierten weder nach Digitonin- noch Triton X 100 Behandlung, da diese kein HA-markiertes Protein exprimierten (Abb. 31).

HA-Tag-Stelle	Digitonin	Triton X 100	HA-Tag-Stelle	Digitonin	Triton X 100
F323 (HA/ NS1)	-	+	P157 (HA/ NS2A)	-	+
Q25 (HA/ NS2A)	+	+	F183 (HA/ NS2A)	+	+
F62 (HA/ NS2A)	+	+	R223 (HA/ NS2A)	+	+
P98 (HA/ NS2A)	-	+	- HA	-	-
I148 (HA/ NS2A)	-	+			

**Abbildung 31: IF nach selektiver Permeabilisierung.** Die pNS1-2A-Konstrukte, bei denen an unterschiedlichen Positionen ein HA-Tag eingefügt worden war, wurden in T7-Vaccinia-Virus infizierte BHK-J-Zellen transfiziert, die 24 h später mit 4%igem Paraformaldehyd fixiert wurden. Durch Behandlung mit Digitonin wurden lediglich äußere Zellmembranen permeabilisiert, während ER-Membranen intakt blieben. Alternativ wurden Zellen mit Triton X 100 behandelt, wodurch eine Permeabilisierung sämtlicher Membranen erfolgte. Anschließend wurde eine indirekte IF (mAK  $\alpha$ -HA (Maus) und  $\alpha$ -Maus IgG-FITC) durchgeführt. -HA: Negativkontrolle mit pNS1-2A-Flag



## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Charakterisierung von GFV-NS2A "charged-to-alanine-scanning" Mutanten und kompensierenden "second site" Mutanten**

Um Hinweise auf Eigenschaften und mögliche Interaktionspartner des Gelbfieber-Virus (GFV) Nichtstruktur- (NS-) Proteins 2A zu erlangen, wurde ein sogenanntes "charged-to-alanine-scanning" durchgeführt. Hierbei werden geladene Aminosäuren (AS) zu ungeladenem Alanin ausgetauscht. Durch diesen Ladungswechsel möglicherweise beeinflusste Interaktionen zwischen Proteinen können in einem vom Wildtyp (WT) abweichenden Phänotyp resultieren, woraus wiederum Rückschlüsse auf mutmaßliche Interaktionspartner und Proteinfunktionen gezogen werden können. Mittels solcher "charged-to-alanine" Mutanten war es z.B. möglich, die Interaktionsregionen der GFV-Proteine NS2B und NS3, die für die Bildung des Serinproteasekomplexes entscheidend sind, zu bestimmen (Droll et al., 2000).

Die in dieser Arbeit an verschiedenen Stellen der GFV-NS2A-Sequenz eingefügten "charged-to-alanine" Mutationen führten nach Elektroporation (EP) der entsprechenden *in vitro* Transkripte zu drei verschiedenen Phänotypgruppen. Ein Verteilungsmuster der verschiedenen Phänotypen innerhalb des NS2A war nicht zu erkennen. Die meisten der untersuchten Mutanten waren replikationskompetent und bildeten infektiöse Partikel. Damit entsprach der Phänotyp dem des GFV-WT, wodurch eine weitere Untersuchung dieser Mutanten nicht von Interesse war. Es fiel allerdings auf, dass im Vergleich zu GFV-WT RNA nach EP der von Mutante K23A-R24A abgeleiteten RNA kleinere Plaques im "infectious center assay" (ICA) entstanden. Hier war offensichtlich die Bildung oder Freisetzung infektiöser Partikel beeinträchtigt. Besonders interessant erschienen die im Phänotyp vom GFV-WT abweichenden Mutanten, bei denen davon auszugehen war, dass ein für das Virus essentieller AS-Abschnitt von der Mutation betroffen war. So hatten drei der untersuchten "charged-to-alanine" Mutationen (D50A-K53A; D70A und E162A-R164A) einen für das Virus letalen Effekt. Die beiden Mutanten R22A-K23A-R24A und R99-E100A-R101 waren dagegen replikationskompetent, konnten aber keine infektiösen Partikel bilden. Der Zurückerlangung von Infektiosität und/oder Replikationskompetenz während des Versuchs lag entweder eine Rückmutation zum GFV-WT oder die Entstehung einer kompensierenden "second site" Mutation zugrunde.

Eine Rückmutation wurde nach drei separaten EP der Mutante **D70A** gefunden. Zur Erzeugung dieser Mutation wurde lediglich ein Nukleotid ausgetauscht (gac:gcc), welches offensichtlich aufgrund der hohen Fehlerrate von  $2 \times 10^{-7}$  Fehler/kopiertes Nukleotid (Pugachev et. al, 2004) der RNA abhängigen RNA Polymerase ("RNA dependent RNA polymerase" = RdRp) des GFV sehr schnell zurückmutieren konnte. Die hohe RdRp-Fehlerrate von RNA-Viren resultiert aus dem Fehlen einer Korrekturfunktion ("proofreading") dieses Enzyms. Aufgrund dieser Fehleranfälligkeit und einer zusätzlich hohen Replikationsrate finden während der Replikation von RNA-Viren sehr viele Mutationen in kurzer Zeit statt. Sind diese für das Virus von Vorteil, so setzen sie sich schnell durch (Ball, 2001).

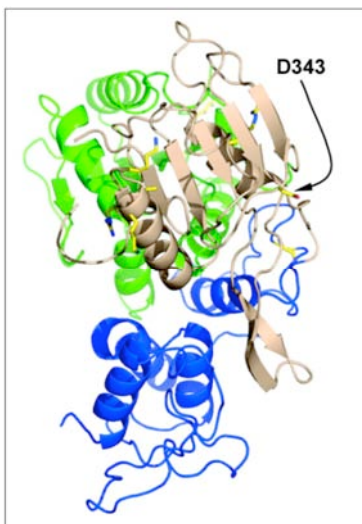
Kompensierende "second site" Mutationen konnten in unterschiedlichen Bereichen des GFV-Genoms gefunden werden. Z.B. wurde nach drei voneinander unabhängigen EP des *in vitro* Transkripts der Mutante R99A-E100A-R101A ein Austausch der AS Lysin an Position 124 im **NS2A** zu Glutaminsäure analysiert (**K124E**). Obwohl Ursprungsmutation und kompensierende "second site" Mutation im NS2A-Protein lagen und daher nicht auf die Interaktion mit einem anderen Protein geschlossen werden kann, ist die Entstehung dieser neuen Mutation sehr interessant. Wie die ursprünglich zu Alanin mutierten AS an den Positionen R99, E100 und R101 liegt auch die AS K124 in einem hydrophilen, wahrscheinlich exponierten und daher für Interaktionen zugänglichen Bereich des NS2A-Proteins. Durch den Austausch des positiv geladenen Lysins zu negativ geladener Glutaminsäure erfolgt ein Ladungswechsel, der den von der zuvor eingefügten "charged-to-alanine" Mutation hervorgerufenen Defekt offensichtlich ausgleichen kann. Eventuell kann auf diese Weise eine vermutete Rekrutierungsfunktion von NS2A zurückerlangt werden. Eine solche Aufgabe des NS2A-Proteins wird diskutiert, da *in vitro* Studien mit rekombinantem Glutathion-S-Transferase- (GST-) Kunjin-Virus- (KUN-) NS2A-Fusionsprotein sowohl eine Interaktion mit RNA-Transkripten der 3'-nichttranslatierten Region (NTR) als auch mit den Replikationskomponenten NS3 und NS5 zeigten (Mackenzie et al., 1998).

Auch nach EP des *in vitro* Transkripts mit der Mutation E162A-R164A entstanden im NS2A liegende, kompensierende "second site" Mutationen. Nach drei EP wurde ein AS-Austausch an Position 168 im **NS2A** gefunden. Zweimal war Methionin durch Lysin (**M168K**) ersetzt worden, einmal wurde die AS Arginin (**M168R**) analysiert. In diesem Fall könnte die Kompensation allerdings eher auf membrantopologische Veränderungen des NS2A-Proteins als auf einen Ladungswechsel zurückzuführen sein, was daher näher unter 4.3 diskutiert wird.

Nach EP der von der NS2A-Mutante R22A-K23A-R24A abgeleiteten RNA entwickelte sich einmal eine kompensierende "second-site" Mutation im **NS2B**. An Position 39 wurde statt Methionin ein Leucin analysiert (**M39L**). Da diese beiden AS ungeladen sind, findet kein Ladungswechsel statt, durch den die Kompensation zu erklären gewesen wäre. Der wesentliche Unterschied findet sich in den Seitenketten der beiden AS. Während Methionin über eine relativ wenig reaktive Thioetherseitenkette verfügt, besitzt Leucin eine Kohlenwasserstoffseitenkette, die innerhalb von Proteinstrukturen häufig an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt ist. Die AS an Position 39 befindet sich im hydrophoben N-Terminus des NS2B-Proteins in direkter Nachbarschaft zu drei Leucinen (L37, L38 und L41). Ein zusätzliches Leucin an Position 39 könnte also mutmaßliche hydrophobe Wechselwirkungen verstärken. Offensichtlich kann der durch die "charged-to-alanine" Mutation an den Positionen R22-K23-R24 hervorgerufene Defekt auf diese Weise ausgeglichen werden. NS2B fungiert als essentieller Kofaktor der NS3-Serinprotease (Chambers et al., 1993; Falgout et al., 1993). Über N- und C-terminale hydrophobe Bereiche könnte das NS2B in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) verankert sein, während es durch einen mittigen, geladenen und hoch konservierten Bereich (Rice et al., 1985) mit der Serinproteasedomäne des NS3-Proteins interagiert und somit einen stabilen Komplex bildet (Chambers et al., 1993; Falgout et al., 1993). Aus den Arbeiten von Khromykh et al. (1999) und Mackenzie et al. (1999) entstand die Theorie, dass eine Verpackung von flaviviralen Proteinen zu infektiösen Partikeln nur erfolgen kann, wenn die RNA-Replikation an einem membranständigen Ort abläuft, damit die anschließende Partikelbildung durch die Membran hindurch ablaufen kann. Weiterhin wurde für KUN gezeigt, dass Replikation und RNA-Verpackung eng zusammenhängen (Khromykh et al., 2001). Sollte das GFV-NS2A eine durch die Mutation verlorengegangene Rekrutierungsfunktion erfüllen, könnte diese eventuell durch die entstandene "second site" Mutation im NS2B ausgeglichen werden. Eine stärkere Verankerung des NS2B in der ER-Membran könnte eine effizientere Bindung des Replikationskomplexes nach sich ziehen, sodass ein Ablauf des Replikationsvorgangs direkt an der Membran trotzdem gewährleistet wäre.

Nach einer analogen EP des *in vitro* Transkripts der Mutante R22A-K23A-R24A entwickelte sich die kompensierende "second site" Mutation **D343G** im **NS3**. In einer vorangegangenen Arbeit konnte interessanterweise die gleiche kompensierende "second site" Mutation nach EP der GFV-NS2A Mutante Q189S beobachtet werden (Kümmerer & Rice, 2002). Dies deutet

stark auf eine Interaktion der beiden Proteine NS2A und NS3 hin. Eventuell könnte diese Interaktion über Ladungsbindungen stattfinden, denn es fällt auf, dass nach der Umwandlung der positiv geladenen AS R22, K23 und R24 zu ungeladenem Alanin eine kompensierende "second site" Mutation entstand, bei der die negativ geladene Asparaginsäure an Position 343 zu ungeladenem Glycin mutierte. Der Bereich, in dem sich die "second site" Mutation D343G entwickelte, befindet sich in der am RNA-Replikationsprozess maßgeblich beteiligten Helikasedomäne des NS3-Proteins. In Abbildung 32 ist ein auf Kristallstrukturanalyse basierendes Modell der GFV-Helikase gezeigt, in dem die AS D343 auf der Oberfläche eines Loops positioniert ist (Wu et al., 2005). Daher ist es gut möglich, dass diese NS3-Domäne an der Interaktion mit NS2A, anderen viralen oder auch zellulären Proteinen beteiligt sein könnte.



**Abbildung 32: Kristallstruktur der flaviviralen Helikase (aus Wu et al., 2005, abgeändert).** Die Helikase besitzt drei Domänen von etwa gleicher Größe. Helikasedomäne 1 ist grün, Domäne 2 braun und Domäne 3 ist blau dargestellt. Die Position der AS D343 ist hervorgehoben.

Erstaunlicherweise konnten die im 3'-NTR gefundene "second site" Mutationen **c10847g+t10854a** den durch die ursprünglich eingefügte Mutation R99A-E100A-R101A erzeugten Defekt nicht ausgleichen. Während die Ursprungsmutation nicht zum WT-GFV zurückmutiert war, konnte im gesamten GFV-Genom keine andere "second site" Mutation gefunden werden, die die Zurückerlangung der Infektiosität hätte hervorrufen können. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich ein Gemisch aus verschiedenen Mutanten gebildet hat, aus dem durch Direktsequenzierung Mutationen einzelner Subvarianten nicht detektiert wurden. Um dies auszuschließen, hätte man eine mehrmalige Plaquareinigung des Virusstocks durchführen können. Da Mackenzie et al. (1998) für KUN eine Interaktion zwischen dem NS2A-Protein und dem RNA-Transkript des 3'-NTRs hatte nachweisen

können, wäre es nicht verwunderlich gewesen, wenn auch für GFV ein Hinweis auf eine solche Interaktion hätte gefunden werden können.

#### **4.1.1 Charakterisierung der replizierenden, nicht infektiösen NS2A-Mutanten**

Zwei der untersuchten GFV-NS2A "charged-to-alanine" Mutanten stellten sich zwar als replikationskompetent heraus, waren aber nicht in der Lage, infektiöse Partikel zu bilden. Zur Abschätzung des Replikationsverhaltens dieser beiden Mutanten wurde die in Zelllysaten enthaltene Envelopeproteinmenge durch Western Blot Analyse ermittelt. Zusätzlich wurde untersucht, ob diese Mutanten weiterhin subvirale Partikel bilden, wie es auch beim GFV-WT der Fall ist. Hierzu wurden die Zellkulturüberstände auf sekretiertes E-Protein hin untersucht, da dieses lediglich in Form von infektiösen oder subviralen Partikeln in den Zellkulturüberstand entlassen wird (mündliche Mitteilung, Dr. C. Rice).

Sowohl nach EP geerntetem Überstand als auch in Zelllysaten der mit *in vitro* Transkripten der Mutanten **R22A-K23A-R24A** und **R99A-E100A-R101A** elektroporierten Zellen konnte das E-Protein, wenn auch in geringeren Mengen als bei mit WT-GFV RNA elektroporierten Zellen, nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die untersuchten Mutanten höchst wahrscheinlich subvirale Partikel in den Überstand abgeben und langsamer als der GFV-WT replizieren. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob ein Mechanismus bei Plusstrang-RNA-Viren existiert, der die Amplifikation und Verpackung defekter RNA minimieren und dadurch die hohe Fehlerrate der RdRp ausgleichen könnte (Khromykh et al., 2001). In zu späteren Zeitpunkten nach EP geernteten Zelllysaten bzw. Überständen konnte eine Zunahme des E-Proteins verfolgt werden, was durch die Entstehung einer kompensierenden "second site" Mutation zu erklären sein könnte. Eine solche würde zur Bildung infektiöser Partikel und dadurch zu Reinfektionen von Zellen führen, was in analogen Versuchen gezeigt werden konnte. Die beobachtete Expressionszunahme könnte also darauf beruhen, dass die virusexprimierende Zellzahl zunimmt. Ein direkter Replikationsratenvergleich könnte mit Hilfe eines Replikonsystems bestimmt werden, bei dessen Einsatz sich eine vorteilhafte "second site" Mutation nicht in diesem Maße durchsetzen würde, da eine Reinfektion von Zellen nicht möglich wäre.

#### **4.1.2 Trans-Komplementation der NS2A-Defekte**

Die beiden replikationskompetenten "charged-to-alanine" Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A waren nicht in der Lage, infektiöse Partikel zu bilden. Ob dieser Defekt in *trans* komplementiert werden konnte, wurde mittels WT-GFV-NS1-2A exprimierender Zellen eruiert. Letztere wurden mit Hilfe des nicht zytopathogenen Sindbis-Virus (SIN) Expressionssystems (Agapov et al., 1998) hergestellt. Wie in vorangegangenen Studien gezeigt werden konnte, interferiert dieses SIN Expressionssystem nicht mit der Replikation des GFV (Lindenbach & Rice, 1997). Weiterhin konnte unter Verwendung von pSINrep19/NS1-2A sowohl eine GFV-NS1-Deletions-Mutante (Lindenbach & Rice, 1997) als auch eine NS2A $\alpha$ -Mutante erfolgreich in *trans* komplementiert werden (Kümmerer & Rice, 2002).

Wie für die bereits untersuchte GFV-NS2A-Mutante K190S (Kümmerer & Rice, 2002) konnte auch für die **R22A-K23A-R24A**-Mutante eine Komplementation durch in *trans* zur Verfügung gestelltes GFV-WT-NS2A nachgewiesen werden. Allerdings entwickelten sich im Verhältnis zu GFV-WT kleinere Plaques und niedrigere Titer. Dies lässt darauf schließen, dass NS2A effizienter in der *cis*- als in der *trans*-Konfiguration agiert. Die Versuchsergebnisse der **R99A-E100A-R101A**-Mutante sprechen ebenfalls für eine *trans* Komplementation, obwohl nach EP in keiner der beiden Zelllinien Plaques im ICA entstanden waren. Allerdings konnte im Überstand der NS1-2A-exprimierenden Zellen sowohl nach 24 als auch 48 h ein Titer detektiert werden, wogegen im Zellkulturüberstand der elektroporierten BHK-Zellen kein Virus nachweisbar war. Drei Tage nach EP wurde allerdings auch in den BHK-Zellen infektiöses Virus gefunden, das offensichtlich durch die Entwicklung einer kompensierenden "second site" Mutation entstanden war. Letztere hatte sich nach diversen EP der R99A-E100A-R101A-RNA niemals innerhalb von 24 h entwickelt. Daher ist davon auszugehen, dass der zu diesem Zeitpunkt detektierte Titer der NS1-2A-Zellen auf eine *trans* Komplementation und nicht auf die Entstehung einer kompensierenden "second site" Mutation zurückzuführen ist. Um dies sicher beweisen zu können, hätte der aus den NS1-2A-Zellen geerntete 24 h-Überstand auf BHK-Zellen titriert werden müssen. Wenn hierbei keine Plaques entstanden wären, hätte die Entstehung einer kompensierenden "second site" Mutation ausgeschlossen werden können, wodurch die *trans* Komplementation dann eindeutig nachgewiesen worden wäre.

### **4.1.3 Untersuchung von Spaltstellenmutanten**

Nach der Ergebnisanalyse des "charged-to-alanine-scannings" fiel auf, dass die GFV-NS2A-Mutante R22A-K23A-R24A den gleichen Phänotyp wie die in einer vorangegangenen Arbeit untersuchte GFV-NS2A-Mutante Q189S (Kümmerer & Rice, 2002) zeigte. Beide Mutanten waren replikationskompetent, konnten aber keine infektiösen Partikel bilden. Weiterhin fiel auf, dass nach EP der *in vitro* transkribierten RNA beider Mutanten eine kompensierende "second site" Mutation an der Position D343 im NS3 entstanden war. Schaut man sich diese beiden NS2A-Bereiche näher an, so wird ersichtlich, dass es sich jeweils um Erkennungssequenzen der flaviviralen Serinprotease handelt. Diese erkennen und spalten eine Abfolge von zwei AS mit basischem Rest und eine darauffolgende AS mit kurzer Seitenkette (Chambers et al., 1990a). Im Fall von GFV sind die Spaltstellen an den Positionen P2, P1 und P1' [(R/K/Q)-(R/K) ↓ (G/S/A/T)] hoch konserviert (Chambers et al., 1990a). Neben den Spaltstellen zwischen den einzelnen Nichtstrukturproteinen, konnte auch im C-terminalen NS2A-Bereich (Q189-K190 ↓ T191) die interne serinproteaseabhängige NS2A $\alpha$ -Spaltstelle identifiziert werden (Nestorowicz et al., 1994; Kümmerer & Rice, 2002). Im N-terminalen Teil des NS2A-Proteins findet sich die AS-Abfolge R24-Q25-G26, die eine potentielle, serinproteaseabhängige Spaltstelle darstellt. Da es sich bei den im Fall von GFV-Serinproteasespaltstellen bisher identifizierten AS an Position P1 immer um Arginin oder Lysin handelt (Chambers et al., 1990a), könnte eine mutmaßliche Prozessierung im Bereich der AS R24-Q25-G26 eventuell suboptimal ablaufen. Allerdings wurde für GFV bereits gezeigt, dass eine Mutation der AS Arginin an P1 zu Glutamin der Serinproteasespaltstelle zwischen den Proteinen NS4B und NS5 eine Spaltung weiterhin erlaubt (Lin et al., 1993). Außerdem kommt Glutamin neben Arginin und Lysin auch an Position P2 von GFV-Serinproteasespaltstellen vor (Chambers et al., 1990a). Neben der AS-Sequenz weisen auch Untersuchungen von NS2A $\alpha$ -Spaltstellenmutanten auf die Existenz einer zweiten, NS2A-internen Serinproteasespaltstelle hin. Nach dem Austausch einzelner AS an den Positionen P2 und P1 wurde neben einem geringfügigen Größenshift des NS2A-Proteins eine weitere Bande detektiert, die diesem Größenshift folgte (mündliche Mitteilung, Dr. B. Kümmerer), woraus auf die Entstehung eines weiteren NS2A-Spaltprodukts geschlossen werden kann.

Um diese mutmaßliche NS2A $\beta$ -Spaltstelle näher zu untersuchen, wurden die Spaltungsmuster von optimierten bzw. zerstörten Spaltstellenmutanten untersucht. Hierbei ist anzumerken, dass zur Zerstörung der mutmaßlichen NS2A $\beta$ -Spaltstelle je zwei AS ausgetauscht werden

mussten, da nach Austausch von nur einer AS eine neue Serinproteaseerkennungssequenz entstanden wäre. Im Vergleich zum GFV-WT exprimierte die Mutante mit optimierter Spaltstelle (**Q25R**) eine geringfügig größere Menge des ca. 15 kDa-großen NS2A $\alpha$ - $\beta$ -Proteins, das nach gleichzeitiger Spaltung an der NS2A $\alpha$ - und der NS2A $\beta$ -Spaltstelle entstehen könnte (siehe Abb. 14, 3.1.8). Wenn die Spaltung an der mutmaßlichen NS2A $\beta$ -Spaltstelle durch die Mutation Q25R tatsächlich gesteigert würde, könnte dies der Grund für die beobachtete Zunahme des gespaltenen Proteins sein. Ansonsten entsprachen die Expressionsmuster der Q25R-Mutante und des GFV-WT einander. Wie erwartet exprimierte die bereits untersuchte Mutante mit zerstörter NS2A $\alpha$ -Spaltstelle (K190S) (Kümmerer & Rice, 2002) das NS2A $\alpha$ -Protein nicht. Analog dazu wurde erwartet, dass nach EP der *in vitro* Transkripte von Mutanten mit zerstörter NS2A $\beta$ -Spaltstelle kein mutmaßliches NS2A $\beta$ -Protein exprimiert werden würde. Erstaunlicherweise wurden aber schwache Banden in der für das NS2A $\beta$ -Protein vermuteten Größe detektiert, nachdem die *in vitro* Transkripte der Mutanten **R22A-K23A-R24A** bzw. **K23A-R24A** in BHK-Zellen elektroporiert worden waren. Ebenso erstaunte die unerwartete Detektion eines Proteins, das für das Spaltungsprodukt NS2A $\alpha$ - $\beta$  gehalten wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob es sich bei den mutmaßlichen NS2A $\beta$ - bzw. NS2A $\alpha$ - $\beta$ -Banden wirklich um jene handelt. Leider konnte die Beobachtung des zuvor detektierten Größenshifts der NS2A-Bande und der zweiten, diesem Shift folgenden Bande nicht wiederholt werden, weshalb sich die NS2A $\beta$ -Bande nicht eindeutig identifizieren ließ. Die Ergebnisse lassen keine Schlussfolgerung zu, ob die mutmaßliche NS2A $\beta$ -Spaltstelle als solche erkannt und zur Prozessierung genutzt wird. Die gegenüber dem GFV-WT niedriger laufenden NS2A $\alpha$ -Banden der Mutanten R22A-K23A-R24A und K23A-R24A lassen sich möglicherweise durch den AS-Austausch und das dadurch veränderte Molekulargewicht des Proteins erklären. Die ausgetauschten AS Arginin (174,2 Da) und Lysin (146,18 Da) haben jeweils ein größeres Molekulargewicht als das für sie eingesetzte Alanin (89,09 Da). Aufgrund der schwächeren Proteinbanden, die im Vergleich zu GFV-Lysaten nachgewiesen werden konnten, stellt sich die Frage, ob die entsprechenden Proteine der Mutanten R22A-K23A-R24A und K23A-R24A eventuell instabiler als die des GFV-WT sein könnten. Nach Zerstörung beider NS2A-interner serinproteasetyptischen AS-Abfolgen durch die Einführung der Doppelmutation **R22A-K23A-R24A+K190S** konnten mittels "hyperimmune ascitic fluid" (HIAF), einem GFV spezifischen Antiserum, keine NS2A-spezifischen Banden detektiert werden. Die NS2A-Präzipitation



durch HIAF erfolgt wahrscheinlich über Interaktion mit anderen flaviviralen Proteinen. Eventuell könnte diese Interaktion durch die eingeführte Doppelmutante unterbunden sein, wodurch das Fehlen der NS2A-spezifischen Banden erklärt werden könnte.

Wie die Ergebnisse des "charged-to-alanine-scannings" gezeigt haben, ist die Prozessierung an den NS2A-internen Proteasespaltstellen für die Replikation nicht essentiell. Infektiöse Partikel können nach Zerstörung der GFV-NS2A $\alpha$ - bzw. der NS2A-2B-Spaltstelle oder nach Zerstörung beider Serinproteasespaltstellen nicht mehr gebildet werden (Nestorowicz et al., 1994). Dagegen blieb die Infektiosität nach Zerstörung der mutmaßlichen NS2A $\beta$ -Spaltstelle erhalten (K23A-R24A und R22A-R24A). Waren allerdings zusätzlich die AS an den Positionen P3 und P4 zu Alanin mutagenisiert (R22A-K23A-R24A), konnten keine infektiösen Partikel mehr gebildet werden.

#### **4.2 Untersuchung der Proteininteraktion zwischen NS2A und NS3**

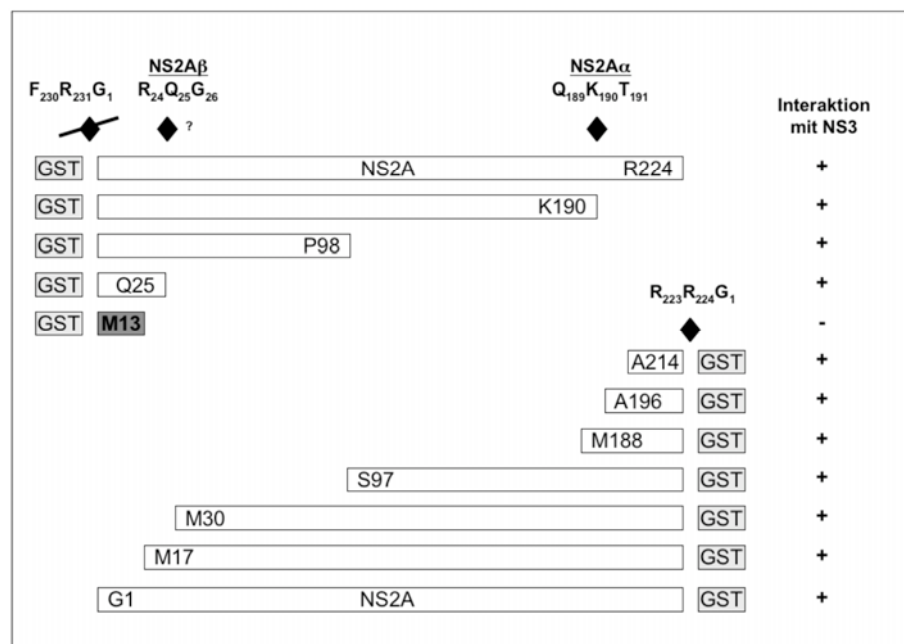
Nach EP der beiden replizierenden aber nicht infektiösen GFV-NS2A-Mutanten Q189S (Kümmerer & Rice, 2002) und R22A-K23A-R24A (siehe 3.1.6) konnte jeweils eine kompensierende "second site" Mutation an Position 343 im NS3 detektiert werden. Dies ließ eine Interaktion zwischen den Proteinen NS2A und NS3 vermuten, welche in dieser Arbeit mittels Koimmunpräzipitationsanalysen belegt werden konnte. Da die im NS3 entstandene "second site" Mutation D343G sowohl den Defekt der NS2A-Mutante R22A-K23A-R24A als auch den der NS2A-Mutante Q189S kompensieren konnte, wurde eine Korrelation zwischen der Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel und der NS2A-NS3-Interaktion vermutet. Demnach wurde erwartet, dass keine Interaktion zwischen WT-NS3 und NS2A mit den Mutationen R22A-K23A-R24A oder Q189S stattfinden kann. Im Gegensatz dazu wurde eine Interaktion zwischen den mutierten NS2A-Varianten und dem an Position D343 mutierten NS3 angenommen. Wäre eine Korrelation zwischen NS2A-NS3-Interaktion und Partikelbildung gefunden worden, wäre eine Hemmung der Bildung infektiöser Partikel in bezug auf eine antivirale Therapie mittels Peptidinhibitoren denkbar gewesen. Eine solche Korrelation konnte durch die Ergebnisse der Koimmunpräzipitationsanalysen allerdings nicht bestätigt werden. Da auch mutiertes NS2A mit WT-NS3 interagiert, ist die NS2A-NS3-Interaktion allein nicht hinreichend für die Bildung infektiöser Partikel. Daher stellte sich die Frage, worin der kompensierende Effekt der "second site" Mutation des NS3 bestehen könnte. Wie schon erwähnt, wird aufgrund von Interaktionsstudien zwischen KUN-NS2A und der 3'-NTR, dem NS3 und NS5 eine Helferrolle für das NS2A-Protein beim Replikationsprozess

angenommen (Mackenzie et al., 1998). Z.B. könnte NS2A durch Verankerung in der ER-Membran einerseits und Interaktion mit dem Replikationskomplex andererseits dafür verantwortlich sein, den Replikationsvorgang an der ER-Membran ablaufen zu lassen. Eventuell ist eine Rekrutierungsfunktion von NS2A durch die eingeführte Ursprungsmutante R22A-K23A-R24A oder Q189S gestört, sodass die Replikation zwar noch ablaufen kann, aber dies nicht mehr am ER erfolgt und daher das "Assembly" gestört sein könnte.

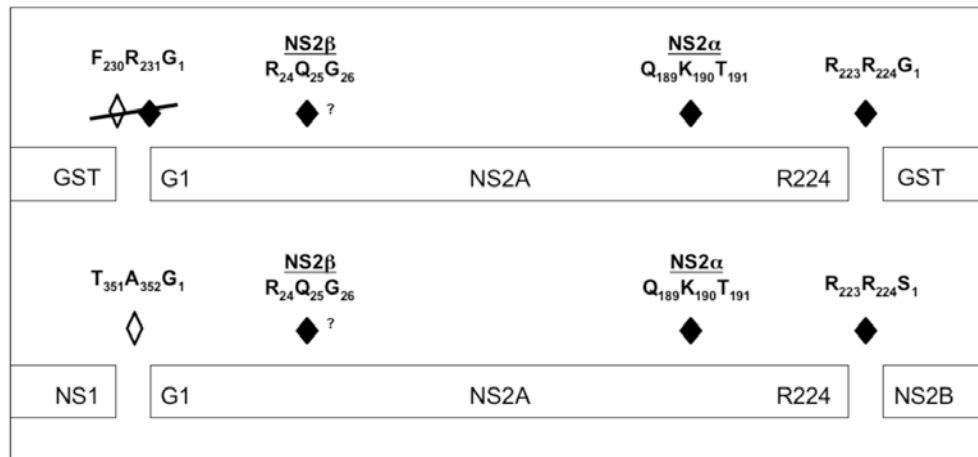
Wie Rinck et al. (2001) zeigen konnten, interagiert das NS2-Protein des bovinen viralen Diarrhoe-Virus (BVDV) mit einem zellulären J-Domänen-Protein, einem Mitglied der DnaJ-Chaperone Familie. Auch das GFV-NS2A interagiert mit diesem J-Domänen-Protein (mündliche Mitteilung Dr. N. Tautz). Daher könnte ebenso für GFV die Interaktion mit einem zellulären Chaperone bei der Bildung infektiöser Partikel eine Rolle spielen.

Wie bereits diskutiert, bestand keine Korrelation zwischen Bildung bzw. Freisetzung von infektiösen Partikeln und der NS2A-NS3-Interaktion. Waren beide für die Infektiosität essentiellen AS-Bereiche (R22A-K23A-R24A+Q189S) im NS2A mutiert, konnte keine Interaktion mit NS3 nachgewiesen werden. Daraus ergab sich die Vermutung, dass beide genannten NS2A-AS-Bereiche als Interaktionsorte agieren, wobei aber eine der beiden Stellen ausreichend ist, um diese Interaktion zu vermitteln. Dies wurde mit Hilfe von Koimmunpräzipitation von C- bzw. N-terminal verkürzten NS2A-Proteinen und dem NS3 überprüft. Sowohl die C-terminal als auch N-terminal verkürzten, mit GST fusionierten NS2A-Proteinvarianten interagierten mit NS3. Lediglich für ein Konstrukt konnte keine Interaktion nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich um das am N-terminalen Ende fusionierte, aus den NS2A-AS G1 bis M13 bestehende Verkürzungskonstrukt (siehe Abb. 33). Während in den AS-Abfolgen der anderen Konstrukte jeweils wenigstens eine Erkennungssequenz der Serinprotease [(R/K/Q)-(R/K) ↓ (G/S/A/T)] (Chambers et al., 1990a) enthalten war, fehlte eine solche in diesem, nicht interaktionsfähigem, verkürzten Protein. Das vorliegende Versuchsmodell kann auf die Situation des GFV-WT übertragen werden (siehe Abb. 34). Dem GFV-NS2A ist statt dem GST- das NS1-Protein vorangeschaltet. Weder NS1-NS2A noch GST-NS2A werden durch eine Serinproteaseerkennungssequenz getrennt. Dagegen wird durch das Anfügen der GST-Sequenz an den C-Terminus von NS2A eine AS-Abfolge erzeugt, die von der Serinprotease erkannt werden könnte (Abb. 34). Eine tatsächliche Abspaltung des GST-Anteils ist in der Koimmunpräzipitationsanalyse allerdings nicht gegeben, da der Kofaktor der Serinprotease (NS2B) im Versuchsansatz nicht mitexprimiert wurde. Im Fall von GFV-WT werden die aufeinander folgenden Proteine

NS2A und NS2B tatsächlich durch das flavivirale Enzym prozessiert (Nestorowicz et al., 1994). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die nachgewiesene Interaktion zwischen NS2A und NS3 über die Erkennungssequenzen der Serinprotease stattfindet, wobei allerdings eine einzige solche Stelle für den Interaktionsprozess ausreichend ist. Dies wird auch durch die Untersuchungsergebnisse der Spaltmutanten bestätigt (siehe 4.1.3). Ein Nachweis von NS2A-spezifischen Banden mit Hilfe von HIAF erfolgt wahrscheinlich über Kopräzipitation mit anderen Proteinen. Nach Zerstörung beider NS2A-interner Erkennungssequenzen der Serinprotease konnte aber keine NS2A-spezifische Bande nachgewiesen werden, während nach Zerstörung von nur einer der beiden Erkennungssequenzen ein Nachweis und damit wahrscheinlich eine Koimmunpräzipitation erfolgte.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der untersuchten NS2A-Verkürzungskonstrukte.** Im oberen Bildabschnitt sind NS2A und die vom C-Terminus her verkürzten NS2A-Proteine als Balken dargestellt, wobei die jeweils C-terminalen, endständigen AS aufgeführt sind. Diese Proteine sind am N-Terminus mit GST (grauer Balken) fusioniert. Im unteren Bildabschnitt sind dagegen NS2A und die vom N-Terminus her verkürzten NS2A-Proteine mit N-terminal endständiger AS abgebildet. Diese Proteine sind am C-Terminus mit GST fusioniert. Die beobachtete bzw. nicht beobachtete Interaktion zwischen den einzelnen Verkürzungskonstrukten und NS3 ist mit +/- angezeigt. Außerdem sind die NS2A-internen Erkennungssequenzen der Serinprotease gezeigt, wobei eine tatsächlich erfolgende Spaltung bisher lediglich für die sogenannte NS2A $\alpha$ -Spaltstelle (Nestorowicz et al., 1994; Kümmerer & Rice, 2002) gezeigt werden konnte. Zusätzlich sind die Übergangssequenzen zwischen NS2A und dem fusionierten GST beschrieben. Raute: Erkennungssequenz der Serinprotease; durchgestrichene Raute: Keine von der Serinprotease prozessierte Sequenz.



**Abbildung 34: Vergleich von Versuchmodell und authentischem GFV-Polyproteinabschnitt.** Im oberen Teil der Abbildung ist die Situation des Versuchmodells im unteren Bereich die des GFV-Polyproteinabschnitts gezeigt. Die jeweiligen Übergangssequenzen von GST-NS2A bzw. NS2A-GST und die AS-Abfolge zwischen NS1-NS2A bzw. NS2A-NS2B sind angezeigt. Ausgefüllte Raute: Erkennungssequenz der Serinprotease; unangefüllte Raute: Spaltstelle einer bisher unbekannt Protease, die im ER-Lumen agiert; durchgestrichene, ausgefüllte/unangefüllte Raute: Sequenz wird nicht prozessiert.

#### **4.3 Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation und Membrantopologie von NS2A**

Um die Eigenschaften des NS2A-Proteins näher charakterisieren zu können, wurde die Membrantopologie dieses Proteins untersucht. Das stark hydrophobe, kleine (22 kDa) NS2A ist wahrscheinlich membrandurchspannend (Lindenbach & Rice, 2001) und spielt offensichtlich bei der Bildung bzw. Freisetzung der infektiösen Partikel eine Rolle (Kümmerer & Rice, 2002; diese Arbeit). Da das "Partikelassembly" wahrscheinlich an der Membran des ER stattfindet, wurde vermutet, dass es sich bei dem an diesem Prozess beteiligten NS2A um ein ER ständiges Protein handeln könnte. Dies konnte mittels Kolokalisationsstudien bestätigt werden. Analog dazu wurde in IF-Studien des KUN-NS2A ebenfalls eine ER-Assoziation festgestellt (Mackenzie et al., 1998). Ebenso konnte dies für Flag fusioniertes HCV-NS2 gezeigt werden (Yamaga & Ou, 2002).

Um zunächst eine Vorstellung der Membrantopologie des NS2A-Proteins zu bekommen, wurden verschiedene Computerprogramme eingesetzt, die aufgrund der AS-Eigenschaften von Proteinen eine Vorhersage treffen, an welchen Stellen sich Transmembrandomänen (TMD) befinden könnten. Die Orientierung der ER bzw. zytoplasmaständigen Bereiche erfolgt in dem vorliegenden Fall durch das vorangeschaltete NS1, für das eine ER Lokalisation bekannt ist (Falgout & Markoff, 1995). Vier unterschiedliche Computerprogramme erwarteten sechs TMD innerhalb des NS2A-Proteins in mehr oder weniger übereinstimmenden Bereichen, lediglich einmal wurde ein Modell mit sieben TMD

berechnet (siehe Abb. 25, 3.3.4). Diese Membrantopologiemodelle sollten im Versuch zunächst durch Einfügen einer Glykosylierungsstelle in die NS2A-AS-Sequenz überprüft werden. Da eine Glykosylierung nur im ER-Lumen erfolgen kann, wurden auf Basis des GFV-Gesamtklons zwei verschiedene Positionen im NS2A ausgewählt, die laut Computervorhersage im ER liegen sollten. Diese Positionen wurden mutagenisiert, sodass dadurch jeweils Glykosylierungsstellen entstanden. Bei erfolgter Glykosylierung wurde gegenüber dem GFV-WT eine Zunahme des NS2A-Molekulargewichtes um ca. 2 kDa erwartet. Eine solche Zunahme konnte allerdings nicht beobachtet werden. Anders verhielt es sich bei Studien des HCV-NS2-Proteins. Nach Erzeugung von Glykosylierungsstellen und Deglykosylierungsstudien konnte in diesem Fall ein Membrantopologiemodell für das untersuchte Protein entwickelt werden (Yamaga & Ou, 2002). Die Glykosylierung wird aber wie auch in weiteren Studien (Santolini et al., 1995; Flint & McKeating, 1999) als ineffizient beschrieben, wofür aber keine Begründung gefunden wurde (Yamaga & Ou, 2002). Nilsson & Heijne (1993) fordern einen minimalen Abstand von mindestens 12-14 AS zwischen Membran und Glykosylierungsstelle, damit eine Glykosylierung erfolgen kann. Um diesen Abstand einzuhalten, fügten Lundin et al. (2003) zur Untersuchung der Membrantopologie des HCV-NS4B-Proteins einen aus 32 AS bestehenden Loop mit mittelständigem Glykosylierungsmotiv an verschiedenen Stellen des Proteins ein. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass im Fall von GFV-NS2A die in die AS-Sequenz direkt eingefügten Glykosylierungsstellen zu nah an der Membran liegen könnten, als dass eine Glykosylierung erfolgen kann. Daher wurde zur Untersuchung der GFV-NS2A-Membrantopologie der beschriebene und bereits verwendete Glykosylierungsloop (Lundin et al., 2003) an verschiedenen Stellen des NS2A-Proteins eingefügt.

Im Gegenteil zu den direkt und ohne Loop erzeugten Glykosylierungsstellen wurden die entsprechenden Proteine im folgenden Versuch außerdem transient überexprimiert. Der Beweis, dass der beobachtete Größenshift durch die Glykosylierung der Proteine hervorgerufen worden war, erfolgte auf zwei verschiedene Weisen. In einem Versuchsansatz wurden mittels PNGase F N-glykosydisch gebundene Seitenketten abgespalten. Gegenüber diesem Enzym sensitive Proteine sollten jeweils über eine Glykosylierungsstelle im ER verfügen. Analog dazu wurden die Expressionsmuster der Loopkonstrukte mit bzw. ohne Glykosylierungsstelle verglichen. Ergab sich hier ein Größenshift, war ebenfalls von einer erfolgten Glykosylierung und damit von einem ER ständigen Proteinabschnitt auszugehen.

Die Ergebnisse dieser beiden unterschiedlichen Versuchsansätze ergaben übereinstimmend, dass offensichtlich eine Glykosylierung an den im folgenden aufgezählten NS2A-Stellen erfolgt: F323(NS1), Q25(NS2A), F62(NS2A) und I148(NS2A). Dagegen konnte eine Glykosylierung nach Transfektion der Konstrukte pP98(Loop/NS2A), pF183(Loop/NS2A) und pR223(Loop/NS2A) nicht nachgewiesen werden. Für pP157(Loop/NS2A) konnten die Deglykosylierung und der Expressionsmustervergleich nicht ausgewertet werden. Nach PNGase F Behandlung der durch das Konstrukt pF183(Loop/NS2A) exprimierten Proteine fiel auf, dass das NS1-2A-Loop Protein gegenüber dem Enzym sensitiv war, das NS2A-Loop Protein aber nicht. Eventuell könnte sich an betreffenden Positionen ein topologischer "switch" abspielen, sodass eine kleine Teilmenge des entsprechenden Proteinbereichs in das ER-Lumen ragt und folglich glykosyliert werden kann. Der Hauptanteil des exprimierten Proteins könnte dagegen ins Zytoplasma transloziert werden. Der Vorteil von solchen gemischten Membrantopologien würde darin bestehen, dass ein und dasselbe Protein mehrere, verschiedene Funktionen erfüllen könnte. Durch multifunktionelle Proteine könnten Viren das Problem lösen, die Informationen möglichst vieler Aufgaben und Funktionen auf einem in Relation dazu kleinen Genom unterzubringen. Auch für das L-Envelope-Protein des Duck Hepatitis B-Virus (DHBV) wird ein solcher "Topologieswitch" angenommen, der eine wichtige Rolle bei der Freisetzung und Reifung dieser Viruspartikel zu spielen scheint (Grgacic, 2002). Das Verändern der Topologieverhältnisse wird in diesem Fall offensichtlich durch posttranslationale Translokation einer bestimmten Domäne des L-Proteins erreicht (Grgacic, 2002). Möglich wäre auch, dass eine Prozessierung topologische Veränderungen hervorruft, worauf das gesplattene Protein dann neue Funktionen erfüllen kann. Dies konnte für das HCV-Envelope-Protein gezeigt werden (Cocquerel et al., 2002).

Wie schon erwähnt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Glykosylierungsloops bereits zur Untersuchung der Membrantopologie des HCV-NS4B-Proteins genutzt (Lundin et al., 2003). Nach transienter Expression des NS4B-Proteins, in dessen Sequenz an verschiedenen Stellen die Loops eingefügt worden waren, wurden die unter An- bzw. Abwesenheit von mikrosomalen Membranen entstandenen Expressionsmuster verglichen. Auch hier wurden von den Computervorhersagen teilweise abweichende Ergebnisse erzielt. Auffällig war, dass die Glykosylierung des N-terminalen HCV-NS4B-Bereiches beobachtet wurde, obwohl die Prozessierung des Polyproteins zwischen NS3 und NS4B durch die virale Protease im Zytoplasma erfolgen muss. In diesem Zusammenhang fragen sich Lundin et al.

lediglich, ob die NS4B-Topologie unverändert bleibt, wenn das Protein alleine oder im Verband des Polyproteins exprimiert wird. Dass die NS4B-Topologie durch die Einfügung des doch recht großen Glykosylierungsloops verändert werden könnte, wird nicht diskutiert. Diese Möglichkeit sollte in Bezug auf das GFV-NS2A ausgeschlossen werden. Daher wurde neben den Glykosylierungsstudien noch ein weiterer, alternativer Versuchsansatz durchgeführt. Statt der 32 AS-großen Glykosylierungsloops wurden jeweils an den gleichen Positionen wesentlich kleinere Hemagglutinin- (HA-) Tags (9 AS) in die NS2A-Sequenz eingefügt. Nach Transfektion der entsprechenden Konstrukte in Zellen wurden letztere mittels Digitonin selektiv permeabilisiert, wodurch die äußere Zellmembran zerstört wird, die ER-Membran aber intakt bleibt. Eine IF mit  $\alpha$ -HA-Antikörper kann daher nur positiv sein, wenn die untersuchte Stelle im Zytoplasma liegt. Im Gegenteil zum Glykosylierungsassay erlaubte dieses Versuchsprinzip also eine Aussage über zytoplasmaständige Proteinbereiche zu treffen. Mit Hilfe von eingefügten HA-Tags und selektiver Permeabilisierung wurden bereits Membrantopologiemodelle für das HCV-Envelopeprotein (Cocquerel et al., 2002) sowie für das Lassa-Virus-Glykoprotein C (Eichler et al., 2004) erstellt. In dieser Arbeit konnten mittels dieses Assays die NS2A-Positionen Q25, F62, F183 und R223 als zytoplasmaständig analysiert werden. Dagegen wurden die AS-Bereiche der Positionen F323(NS1), P98(NS2A), I148(NS2A) und P157(NS2A) nicht im Zytoplasma vermutet. Auffällig war, dass die IF der mit Triton X 100 behandelten Kontrollzellen nach Transfektion des Konstruktes mit HA-Tag an Position 6 eine schwächere IF zeigte, als nach Transfektion der übrigen Konstrukte zu beobachten war. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Position eventuell in einer TMD lokalisiert und daher eine Bindung des  $\alpha$ -HA-Antikörpers selbst nach Tritonbehandlung beeinträchtigt sein könnte. Ob dies der Fall ist, bleibt aber ungeklärt, da ein Kontrollkonstrukt, bei dem sich das HA-Tag in einer TMD befindet, nicht untersucht wurde.

In Tabelle 30 sind die aus den beiden unterschiedlichen Assays gewonnenen Ergebnisse für die acht untersuchten NS1- bzw. NS2A-Positionen gegenübergestellt. Übereinstimmend sind die Resultate für die Positionen F323(NS1), I148(NS2A), P157(NS2A), F183(NS2A) und R223(NS2A). Während die AS-Bereiche F232(NS1), I148(NS2A) und P157(NS2A) mit großer Wahrscheinlichkeit im ER-Lumen lokalisiert sind, befinden sich die Positionen F183(NS2A) und R223(NS2A) offensichtlich im Zytoplasma. Widersprüchliche Ergebnisse wurden durch die alternativen Versuchsansätze für die NS2A-AS-Positionen Q25, F62 und P98 erzielt. Während die untersuchten Stellen Q25(NS2A) und F62(NS2A) sowohl

glykosyliert wurden als auch nach Digitoninbehandlung eine positive IF zeigten, fand an Position P98(NS2A) weder eine Glykosylierung statt noch ergab sich im selektiven Permeabilisierungsassay eine positive IF.

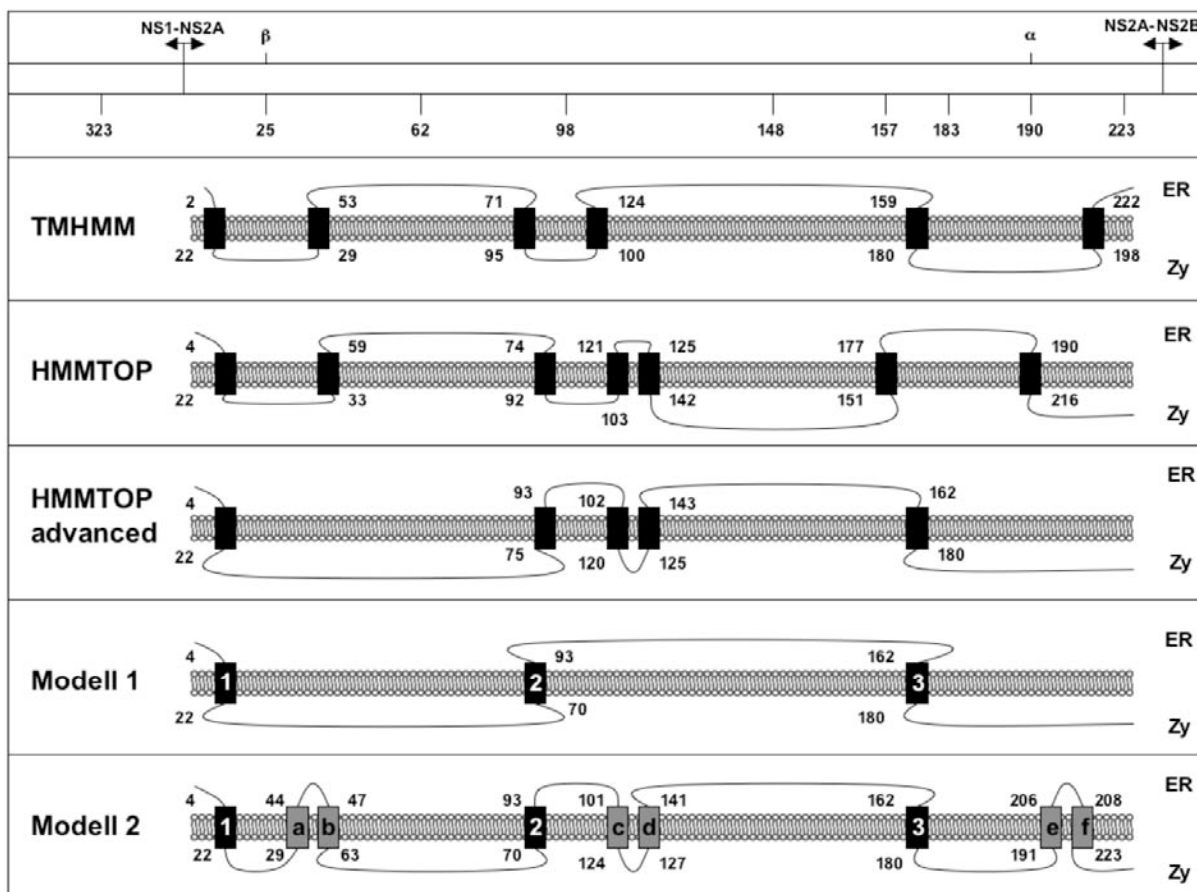
**Tabelle 30: Vergleich der Ergebnisse von Glykosylierungsassay und selektivem Permeabilisierungsassay.** Für die einzelnen NS2A-Positionen ist jeweils angegeben, ob eine Glykosylierung stattgefunden (+) bzw. nicht stattgefunden (-) hat. Bei erfolgter Glykosylierung ist davon auszugehen, dass der entsprechende AS-Bereich im ER-Lumen lokalisiert ist, was durch (ER) gekennzeichnet ist. Das Ergebnis des Glykosylierungsassays für Position 6 ist eingeklammert, da eine Glykosylierung lediglich auf dem Expressionsmuster basierend angenommen wird, nicht aber mittels Deglykosylierung oder im Vergleich zum Loopkonstrukt ohne Glykosylierungsstelle bewiesen werden konnte. War die IF nach Digitoninbehandlung der mit den Konstrukten transfizierten Zellen positiv (+), ist von einem zytoplasmatischen AS-Abschnitt (Zy) auszugehen. Negative IF ist durch (-) gekennzeichnet. Stimmen die Ergebnisse überein, ist die analysierte Lokalisation in der entsprechenden Spalte angegeben. Sich widersprechende Ergebnisse sind durch (> <) markiert.

Loop-/HA-Position	Glykosylierung	IF nach Digitoninbehandlung	Lokalisation
F323(NS1)	+ > ER	-	ER
Q25(NS2A)	+ > ER	+ > Zy	> <
F62(NS2A)	+ > ER	+ > Zy	> <
P98(NS2A)	-	-	> <
I148(NS2A)	+ > ER	-	ER
P157(NS2A)	(+ > ER)	-	(ER)
F183(NS2A)	-	+ > Zy	Zy
R223(NS2A)	-	+ > Zy	Zy

Aufgrund der bereits angedeuteten Zweifel, dass durch die Einfügung des relativ großen Glykosylierungsloops die Membrantopologie des GFV-NS2A beeinflusst werden könnte, wird im folgenden bei sich widersprechenden Resultaten von den Ergebnissen des selektiven Permeabilisierungsassays ausgehend auf die Membrantopologie des NS2A-Proteins geschlossen. Wie bereits erwähnt, werden die Proteine NS1 und NS2A von einer membranständigen Wirtszellprotease im ER prozessiert (Falgot & Markoff, 1995). Die im NS1 befindliche Position F323 wurde dementsprechend sowohl durch die Glykosylierungsversuche als auch durch den selektiven Permeabilisierungsassay im ER-Lumen lokalisiert. Weiterhin ist bekannt, dass der C-Terminus des NS2A zur Abspaltung vom NS2B-Protein im Zytoplasma liegen muss (Nestorowicz et al., 1994). Dies konnte ebenfalls durch die Versuche dieser Arbeit belegt werden. Daher liegt auf der Hand, dass NS2A die Membran mit einer ungeraden Anzahl von TMD durchspannen sollte. Die durch die Computerprogramme vorhergesagte erste TMD im Bereich der AS 1-21 (vgl. Abb. 35) scheint vorhanden zu sein, denn während Position F323(NS1) als ER-luminal bestimmt



wurde, liegt Position Q25(NS2A) den Ergebnissen der selektiven Permeabilisierung zufolge im Zytoplasma. Demzufolge würden auch die AS 24-26, die als Erkennungssequenz der flaviviralen Serinprotease dienen könnten, im Zytoplasma lokalisiert sein, was für einen möglicherweise ablaufenden Spaltungsprozess erforderlich ist. Sämtliche fünf Computermodelle sagen an mehr oder weniger übereinstimmenden Positionen im Bereich zwischen den AS 29 und 58 eine zweite TMD innerhalb des NS2A-Proteins vorher (Abb. 35). Entweder ist diese trotz der übereinstimmenden Vorhersagen nicht vorhanden, oder es liegen zwei sehr kurze TMD direkt hintereinandergeschaltet vor, denn die Position F62(NS2A) liegt laut Ergebnissen der selektiven Permeabilisierung im Zytoplasma. Da sich der AS-Bereich um die AS-Position 98 laut den Ergebnissen wieder im ER befinden sollte, muss zwischen den untersuchten AS-Positionen 62 und 98 eine TMD liegen. Diese wurde auch von sämtlichen Computerprogrammen vorhergesagt (AS 71-94), allerdings in umgekehrter Orientierung (Abb. 35). Da die AS 148 des NS2A ebenfalls im ER liegen sollte, bedeutet dies, dass entweder der komplette Bereich zwischen den AS 98 und 148 im ER lokalisiert ist oder, dass zwei TMD zwischengeschaltet sind. Letztere werden vom HMMTOP-Programm vorgeschlagen (104-120 und 126-141, siehe Abb. 35). Die Positionen I148 und P157 liegen sowohl nach den Glykosylierungsergebnissen als auch den Ergebnissen der selektiven Permeabilisierung zufolge im ER-Lumen. Da die darauf folgenden Positionen F183 und R223 laut den Versuchsergebnissen im Zytoplasma liegen, müsste sich zwischen den untersuchten Positionen P157 und F183 eine TMD befinden. Eine solche wird von den Programmen TMHMM und TMpred für die AS 160-189 vorausgesagt (Abb. 35). Die AS 189-191 kodieren für die Erkennungssequenz der Serinprotease, die an dieser NS2A-internen, sogenannten NS2A $\alpha$ -Spaltstelle das NS2A-Protein prozessiert. Dazu müssen diese AS im Zytoplasma liegen. Wie bereits erwähnt, findet eine solche Spaltung auch am C-Terminus des NS2A-Proteins statt, weshalb auch dieser im Zytoplasma lokalisiert sein sollte.



**Abbildung 35: Auf Computervorhersagen bzw. auf Versuchsergebnisse gestützte Membrantopologiemodelle des GFV-NS2A-Proteins.** In der oberen Reihe ist das C-terminale NS1-Ende, das darauf folgende vollständige NS2A und der N-Terminus des NS2B des GFV als Balken dargestellt. Die Positionen, an denen HA-Tags bzw. Glykosylierungssites eingefügt wurden sind markiert. Weiterhin ist die NS2A $\alpha$ - und die mutmaßliche NS2A $\beta$ -Serinproteasespaltstelle gekennzeichnet. In den darunter liegenden Reihen folgen beispielhaft für das 6-TMD-Computermodell die Topologievorhersage des Programms TMHMM und das ebenfalls bereits in Abb. 25 (3.3.4) gezeigte HMMTOP-Modell mit 7 vorhergesagten TMD. Die Topologievorhersage HMMTOP advanced ist unter Einbeziehung der Versuchsergebnisse durch das entsprechende Computerprogramm errechnet worden. Basierend auf der HA-Tag-Analyse zeigt Modell 1 die Membrantopologie mit der minimal möglichen Anzahl von TMD, dagegen ist in Modell 2 die maximal mögliche Anzahl der TMD aufgeführt. Oberhalb der schematisch dargestellten ER-Membranen befindet sich jeweils das ER-Lumen (ER), darunter das Zytoplasma (Zy). Die per Computerprogramm vorhergesagten TMD sind als schwarze Kästen dargestellt. Die auf den Versuchsergebnissen basierenden TMD in Modell 1 und 2 sind als schwarze Kästen dargestellt, die weiß beziffert sind. Die grauen Kästen stellen mutmaßliche TMD dar, die allerdings nicht durch Versuche belegt sind. Weiterhin sind die Positionen der jeweils ersten und letzten NS2A-AS, die noch außerhalb der Membran liegen, gekennzeichnet.

Aus den vorangegangenen Versuchen und Überlegungen ergibt sich ein Membrantopologiemodell für das NS2A-Protein mit mindestens drei TMD, wie es in Abbildung 35 als Modell 1 gezeigt ist. Aufgrund der hydrophoben bzw. hydrophilen Eigenschaften der NS2A-AS-Sequenz könnten sich die in Modell 2 gezeigten TMD a-f zusätzlich in diesem Protein befinden. Diese sind allerdings rein hypothetisch und noch nicht durch Versuche bestätigt. Die in Abbildung 35 unter Modell 2 gezeigte hypothetische TMD b

ist aufgrund der "charged-to-alanine-scanning" Versuche eher unwahrscheinlich. Die Mutation der in dieser Region liegenden AS 50 und 53 zu Alanin hatte für das Virus letale Folgen. Die beiden betroffenen AS liegen in einem Proteinabschnitt, der zwar recht hydrophob ist, aber immer wieder durch hydrophile AS unterbrochen wird. Auch die Ergebnisse der selektiven Immunozytochemie lassen vermuten, dass dieser Bereich keine TMD darstellt. Werden nun aber die beiden hydrophilen AS Asparaginsäure und Lysin an den Positionen 50 und 53 jeweils gegen hydrophobes Alanin ausgetauscht, könnte der Abschnitt daraufhin in die Membran einlagert werden und NS2A seine Funktionalität verlieren. Eventuell könnte so der Replikationsstop der entsprechenden Virusmutante erklärt werden. Falls also die TMD b nicht existiert, sollte auch die in Abbildung 35 gezeigte, hypothetische TMD a nicht vorhanden sein, da sonst die Topologieverhältnisse umgekehrt würden. Das Vorhandensein der hypothetischen TMD c (Abb. 35, Modell 2) wird dagegen durch die Ergebnisse des "charged-to-alanine-scannings" gestützt. Die hydrophilen AS R99, E100 und R101 liegen direkt N-terminal von dieser TMD c. Falls letztere existieren sollte, so könnten die durch die "charged-to-alanine" Mutagenese zu hydrophobem Alanin umgewandelten AS 99, 100 und 101 eventuell mit in diese TMD einbezogen werden, sodass sie für eventuelle Interaktionspartner nicht mehr zugänglich sind. Die TMD e und f sind beide sehr kurz und sehr dicht aufeinanderfolgend und daher eher unwahrscheinlich. Trotzdem muss das Fehlen von TMD e und f durch Versuche untersucht werden. Demnach scheint ein NS2A-Membrantopologiemodell am wahrscheinlichsten, das dem in Abbildung 35 unter HMMTOP advanced gezeigt wird. Hier wurden die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit in die Berechnungen des Computerprogrammes HMMTOP einbezogen, woraus die abgebildete Membrantopologie resultierte. Allerdings müssen noch weitere Analysen für die erste Hälfte des NS2A-Proteins durchgeführt werden, da in diesem Abschnitt die Daten der Glykosylierungsstudien und der Untersuchung mittels HA-Tag Insertion keine übereinstimmenden Ergebnisse lieferten. Auch die bisher noch nicht belegten aber vermuteten TMD zwischen den AS-Positionen 103-119 und 126-142 müssen durch weitere Versuche untersucht werden.

Unter 4.1.1 wurden die nach Mutagenese entstandenen, offensichtlich auf Ladungswechseln beruhenden, kompensierenden "second site" Mutationen diskutiert. Der kompensierende Effekt der im NS2A liegenden "second site" Mutationen **M168K** bzw. **M168R**, die jeweils nach EP des *in vitro* Transkripts der Mutante E162A-R164A entstanden waren, könnte auf

membrantopologischen Veränderungen basieren und soll deshalb hier diskutiert werden. Durch den Austausch geladener, hydrophiler AS zu ungeladenem und hydrophoben Alanin könnten nämlich nicht nur Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst, sondern auch Membrantopologien verändert werden. Die beiden AS E162 und R164 liegen wahrscheinlich N-terminal direkt vor der mutmaßlichen TMD 3 (siehe Abb. 35). Nach Mutagenese dieser beiden hydrophilen AS zu hydrophobem Alanin könnten sie mit in die TMD 3 einbezogen werden und demzufolge für mutmaßliche Interaktionen mit anderen Proteinen nicht mehr zur Verfügung stehen. Durch die entstandenen "second site" Mutationen M168K bzw. M168R, bei denen jeweils eine hydrophobe in eine hydrophile AS umgewandelt wird, konnte der durch die ursprünglich eingefügte Mutation erzeugte Replikationsverlust kompensiert werden. Da die AS-Position 168 in Nachbarschaft zu den ursprünglich mutierten AS liegt, könnten die zunächst in die TMD mit einbezogenen AS 162 und 164 wieder dem ER-Lumen zur Verfügung stehen, sodass mutmaßliche Funktionen erfüllt werden könnten.

Abschließend ist zu sagen, dass in dieser Arbeit bestätigt werden konnte, dass NS2A eine wichtige Rolle in der Partikelbildung spielt. Mittels Mutagenesestudien konnten mehrere Bereiche im NS2A gefunden werden, die für die Partikelbildung wichtig sind. Eine im NS3 entstandene kompensierende "second site" Mutation ließ eine Interaktion von NS2A und NS3 vermuten, welche mittels Koimmunpräzipitationsanalyse bestätigt werden konnte. Allerdings verhinderten die Mutationen, die die Partikelbildung unterbanden, die NS2A-NS3-Interaktion nicht. Eine direkte Korrelation zwischen NS2A-NS3-Interaktion und Partikelbildung besteht daher nicht. Ungeklärt bleibt weiterhin die Frage, an welchem Schritt der Partikelbildung und/oder Freisetzung das NS2A-Protein eingreift. Weiterhin zeigen die Daten dieser Arbeit, dass NS2A ein membrandurchspannendes, ER ständiges Protein ist. Damit ist eine Lokalisation am Ort des "Virusassemblies" gegeben, wo es möglicherweise eine Rolle bei der Rekrutierung von RNA zur Verpackung und somit bei der Nukleokapsidbildung eine Rolle spielen könnte.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Das Gelbfieber-Virus (GFV) ist der Prototyp der Familie *Flaviviridae*. Bei dem GFV-Genom handelt es sich um ein einzelsträngiges RNA-Molekül (11 kb) positiver Polarität. Letztere kodiert für ein Polyprotein, das ko- und posttranslational durch zelluläre und virale Proteasen in drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteine prozessiert wird.

Über das flavivirale Nichtstrukturprotein NS2A ist bisher wenig bekannt. Neben einer Rolle bei der Hemmung der zellulären Interferonantwort scheint es an der Bildung und/oder Freisetzung infektiöser Partikel beteiligt zu sein. Dies konnte in dieser Arbeit durch ein NS2A "charged-to-alanine-scanning" bestätigt werden. Die eingefügten Alaninaustausche resultierten entweder in einem dem GFV-WT vergleichbaren Phänotyp, waren letal, oder blockierten selektiv die Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel, ohne die RNA-Replikation zu unterbinden. Letzteres war für die NS2A-Mutanten R22A-K23A-R24A und R99A-E100A-R101A zu beobachten, deren Defekt durch in *trans* zur Verfügung gestelltes GFV-WT-NS2A ausgeglichen werden konnte. Zudem entwickelte sich nach EP der von der Mutante R22A-K23A-R24A abgeleiteten RNA eine "second site" Mutation an Position D343 im NS3, die den Effekt der ursprünglich eingefügten Mutante kompensierte. Dies ließ eine Interaktion der beiden Proteine NS2A und NS3 vermuten, welche in dieser Arbeit mittels Koimmunpräzipitationsstudien belegt werden konnte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es sich bei den interaktionsvermittelnden AS-Bereiche um NS2A-interne Serinproteaseerkennungssequenzen handelt. Allerdings wurde die Vermutung, dass zwischen Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel und der NS2A-NS3-Interaktion eine direkte Korrelation besteht, widerlegt. Allein die NS2A-NS3-Interaktion ist demnach für die Bildung/Freisetzung infektiöser Partikel nicht hinreichend.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit mittels Kolokalisationsstudien das NS2A als ER ständiges Protein identifiziert. Zur Ermittlung der NS2A-Membrantopologie wurden Vorhersagen verschiedener Computerprogramme miteinander verglichen und durch zwei unterschiedliche Versuchsansätze überprüft. Erstens wurde die Lokalisation von an verschiedenen Positionen des NS2A eingefügten Glykosylierungsstellen untersucht; zweitens wurde die Lokalisation eingefügter HA-Tags mittels selektiver Immunocytochemie überprüft. Aus den Ergebnissen konnte ein GFV-NS2A-Membrantopologiemodell mit wenigstens drei membrandurchspannenden Domänen erstellt werden. Ein alternatives Modell mit fünf

Transmembrandomänen scheint allerdings wahrscheinlicher, wobei der Beweis der beiden zusätzlichen, mutmaßlichen Domänen durch weitere Versuche noch aussteht.

## **6. LITERATURVERZEICHNIS**

**Agapov, E.V., Frolov, I., Lindenbach, B.D., Prägai, B.M., Schlesinger, S., Rice, C.M. (1998)** Noncytopathic sindbis virus RNA vectors for heterologous gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 12989-12994.

**Alber, T. (1989)** Mutational effects on protein stability. *Annu. Rev. Biochem.* **58**:765-798

**Alexander, W.A., Moss, B., Fuerst, T.R. (1992)** Regulated expression of foreign genes in vaccinia virus under the control of bacteriophage T7 RNA polymerase and the *Escherichia coli lac* Repressor. *J. Virol.* **66**: 2934-2942

**Alvarez, D.E., Lodeiro, M.F., Luduena, S.J., Pietrasanta, L.I., Gamarnik, A.V. (2005)** Long-range RNA-RNA interactions circularize the dengue virus genome. *J. Virol.* **79**: 6631-6643

**Arias, C.F., Preugschat, F., Strauss, J.H. (1993)** Dengue 2 virus NS2B and NS3 form a stable complex that can cleave NS3 within the helicase domain. *Virology* **193**: 888-899

**Ball, A., L. (2001)** Replication strategies of RNA viruses, p. 105-118. *In*: Knipe, D.M. & Howley, P.M. (ed.). *Fields Virology*, fourth edition, Vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

**Barrett A.D. & Monath, T.P. (2003)** Epidemiology and ecology of Yellow fever virus. *Adv. Virus Res.* **61**: 291-315

**Bazan, J.F. & Fletterick, R.J. (1989)** Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses. *Virology* **171**: 637-639

**Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L. (2003)** *In*: Biochemie, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin

**Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

**Boege, U., Heinz, F.X., Wengler, G., Kunz, C. (1983)** Amino acid compositions and amino-terminal sequences of the structural proteins of a flavivirus, European tick-borne encephalitis virus. *Virology* **126**: 651-657

**Bredenbeek, P.J., Kooi, E.A., Lindenbach, B., Huijkman, N., Rice, C.M., Spaan, W.J.M. (2003)** A stable full-length Yellow fever virus cDNA clone and the role of conserved RNA elements in flavivirus replication. *J. Gen. Virol.* **84**: 1261-1268.

**Brinton, M.A., Fernandez, A.V., Amato, J. (1986)** The 3'-nucleotides of flavivirus genomic RNA form a conserved secondary structure. *Virology* **153**: 113-121

**Brinton, M.A., Dispoto, J.H. (1988)** Sequence and secondary structure analysis of the 5'-terminal region of flavivirus genome RNA. *Virology* **162**: 290-299

**Burke, D.S. & Monath, T.P. (2001)** Flaviviruses, p. 1043-1125. *In*: Knipe, D.M. & Howley, P.M. (ed.). *Fields Virology*, fourth edition, Vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.

- Cahour, A., Pletnev, A., Vazielle-Falcoz, M., Rosen, L., Lai, C.J. (1995)** Growth-restricted dengue virus mutants containing deletions in the 5' noncoding region of the RNA genome. *Virology* **207**: 68-76
- Cauchi, M.R., Henchal, E.A., Wright, P.J. (1991)** The sensitivity of cell-associated dengue virus proteins to trypsin and the detection of trypsin-resistant fragments of the nonstructural protein NS1. *Virology* **180**: 659-667
- Chambers, T.J., McCourt D.W., Rice, C.M. (1989)** Yellow fever virus proteins NS2A, NS2B and NS4B: Identification and partial N-terminal amino acid sequence analysis. *Virology* **169**: 100-109
- Chambers, T.J., Hahn, C.S., Galler, R., Rice, C.M. (1990a)** Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**: 649-688
- Chambers, T.J., McCourt D.W., Rice, C.M. (1990b)** Production of Yellow fever virus proteins in infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera. *Virology* **177**: 159-174
- Chambers, T.J., Grakoui, A., Rice, C.M. (1991)** Processing of the Yellow fever virus nonstructural polyprotein: A catalytically active NS3 proteinase domain and NS2B are required for cleavages at dibasic sites. *J. Virol.* **65**: 6042-6050
- Chambers, T.J., Nestorowicz, A., Amberg, S.M., Rice, C.M. (1993)** Mutagenesis of the Yellow fever virus NS2B protein: Effects on the proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication. *J. Virol.* **67**: 6797-6807
- Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R.E., Fromm, J.R., Esko, J.D., Linhardt, R.J., Marks, R.M. (1997)** Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat. Med.* **3**: 866-871
- Chu, J.J & Ng, M.L. (2004)** Interaction of West Nile virus with  $\alpha_v\beta_3$  integrin mediates virus entry into cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 54533-54541
- Claros, M.G. & von Heijne, G. (1994)** TopPredII: An improved software for membrane protein structure predictions. *Cabios* **10**: 685-686
- Cocquerel, L., Op de Beek, A., Lambot, M., Roussel, J., Delgrange, D., Pillez, A., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J. (2002)** Topological changes in the transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *EMBO* **21**: 2893-2902
- Droll, D.A., Murthy, H.M.K., Chambers, T.J. (2000)** Yellow fever virus NS2B-NS3 protease: Charged-to-alanine mutagenesis and deletion analysis define regions important for protease complex formation and function. *Virology* **275**: 335-347
- Eichler, R., Lenz, O., Strecker, T., Eickmann, M., Klenk, H.D., Garten, W. (2004)** Lassa virus glycoprotein signal peptide displays a novel topology with an extended endoplasmic reticulum luminal region. *J. Biol. Chem.* **279**: 12293-12299
- Elroy-Stein, O., Fuerst, T.R., Moss, B. (1989)** Cap-independent translation of mRNA conferred by encephalomyocarditis virus 5' sequence improves the performance of the vaccinia virus/bacteriophage T7 hybrid expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 6126-6130



- Falgout, B., Bray, M., Schlesinger, J.J., Lai, C.J. (1990)** Immunization of mice with recombinant vaccinia virus expressing authentic dengue virus nonstructural protein NS1 protects against lethal dengue virus encephalitis. *J. Virol.* **64**: 4356-4363
- Falgout, B., Miller, R.H., Lai, C.J. (1993)** Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: Identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *J. Virol.* **67**: 2034-2042
- Falgout, B. & Markoff, L. (1995)** Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J. Virol.* **69**: 7232-7243
- Finlay, C. (1881)** El mosquito hipotéticamente considerado como agente de transmisión de la fiebre amarilla. *An. r. Acad. de cien.méd. de la Habana* **18**: 147-169
- Flint, M. & McKeating, J.A. (1999)** The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *J. Gen. Virol.* **80**: 1943-1947
- Forwood, J.K, Brooks, A. Briggs, L.J.,Xiao, C.Y., Jans, D.A., Vasudevan, S.G. (1999)** The 37-amino-acid interdomain of dengue virus NS5 protein contains a functional NLS and inhibitory CK2 site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**: 731-737
- Fuerst, T.R., Niles, E.G., Studier, F.W., Moss, B. (1986)** Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8122-8126
- Gorbalenya, A.E., Donchenko, A.P., Koonin, E.V., Blinov, V.M. (1989a)** N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases. *Nucleic Acids Res.* **17**: 3889-3897
- Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V., Donchenko, A.P., Blinov, V.M. (1989b)** Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* **17**: 4713-4729
- Grgacic, E. (2002)** Identification of structural determinants of the first transmembrane domain of the small envelope protein of duck hepatitis B virus essential for particle morphogenesis. *J. Gen. Virol.* **83**: 1635-1644
- Guirakhoo, F., Bolin, R.A., Roehrig, J.T. (1992)** The Murray Valley encephalitis virus prM protein confers acid resistance to virus particles and alters the expression of epitopes within the R2 domain of E glycoprotein. *Virology* **191**: 921-931
- Hahn, C.S., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Lee, E., Dalgarno, L., Strauss, E.G., Strauss, J.H. (1987)** Conserved elements in the 3' untranslated region of flavivirus RNAs and potential cyclization sequences. *J. Mol. Biol.* **198**: 33-41
- Halstead, S.B. & O'Rourke, E.J. (1977)** Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J. Exp. Med.* **146**: 201-217
- Heinz, F.X., Stiasny, K., Puschner-Auer, G., Holzmann, H., Allison, S.L., Mandl, C.W., Kunz, C. (1994)** Structural changes and functional control of the tick-borne encephalitis virus glycoprotein E by the heterodimeric association with protein prM. *Virology* **198**: 109-117

- Heinz, F.X. & Allison, S.L. (2001)** The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 450-455
- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. (1998)** SOSUI: Classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* **14**: 378-379
- Hoffmann, K. & Stoffel, W. (1993)**  
TMbase- A database of membrane spanning proteins segments.  
*Biol. Chem.* **374** 166
- Holzmann, H. & Heinz, F.X. (2002)** Flaviviren, p. 226-239. *In*: Doerr, H.W. & Gerlich, W.H. (ed.). *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Hung, S.L., Lee, P.L., Chen, H.W., Chen, L.K., Kao, C.L., King, C.C. (1999)** Analysis of the steps involved in dengue virus entry into host cells. *Virology* **257**: 156-167
- Jacobs, S.C., Stephenson, J.R., Wilkinson, G.W. (1992)** High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: Protection elicited in a murine model. *J. Virol.* **66**: 2086-2095
- Kadare, G. & Haenni, A.L. (1997)** Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* **71**: 2583-2590
- Kapoor, M., Zhang, L., Ramachandra, M., Kusukawa, J., Ebner, K.E., Padmanabhan, R. (1995)** Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5. *J. Biol. Chem.* **270**: 19100-19106
- Kaufmann, B.M., Summers, P.L., Dubois, D.R., Cohen, W.H., Gentry, M.K., Timchak, R.L., Burke D.S., Eckels, K.H. (1989)** Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**: 576-580
- Khromykh, A.A. & Westaway, E.G. (1997)** Subgenomic replicons of the flavivirus Kunjin: Construction and applications. *J. Virol.* **71**: 1497-1505
- Khromykh, A.A., Sedlak, P.L., Guyatt, K.J., Hall, R.A., Westaway, E.G. (1999)** Efficient *trans*-complementation of the flavivirus Kunjin NS5 protein but not of the NS1 protein requires its coexpression with other components of the viral replicase. *J. Virol.* **73**: 10272-10280
- Khromykh, A.A., Varnavski, A.N., Sedlak, P.L., Westaway, E.G. (2001)** Coupling between replication and packaging of flavivirus RNA: Evidence derived from the use of DNA-base full-length cDNA clones of Kunjin virus. *J. Virol.* **75**: 4633-4640
- Koonin, E.V. (1993)** Computer-assisted identification of a putative methyltransferase domain in NS5 protein of flaviviruses and lambda 2 protein of reovirus. *J. Gen. Virol.* **74**: 733-740
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L.L. (2001)** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **305**: 567-580
- Kümmerer, B.M. & Rice, C.M. (2001)** Flaviviruses, 1299-1303. *In*: Creighton, T. (ed.). *Encyclopedia of Molecular Medicine*, Vol. 2. John Wiley and Sons, Inc., New York, NY.

- Kümmerer, B.M. & Rice, C.M. (2002)** Mutations in the Yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J. Virol.* **76**: 4773-4784
- Lange, Y. (1991)** Disposition of intracellular cholesterol in human fibroblasts. *J. Lipid. Res.* **32**: 329-339
- Lee, J.M., Crooks A.J. Stephenson, J.R. (1989)** The synthesis and maturation of a non-structural extracellular antigen from tick-borne encephalitis virus and its relationship to the intracellular NS1 protein. *J. Gen. Virol.* **70**: 335-343
- Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J., Rice, C.M. (1993)** Cleavage at a novel site in the NS4A region by the Yellow-fever-virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *J. Virol.* **67**: 2327-2335
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (1997)** Trans-Complementation of Yellow fever virus NS1 reveals a role in early RNA replication. *J. Virol.* **71**: 9608-9617
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (1999)** Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J. Virol.* **73**: 4611-4621
- Lindenbach, B.D. & Rice, C.M. (2001)** *Flaviviridae*: The viruses and their replication, p. 991-1041. In: Knipe, D.M. & Howley, P.M. (ed.). *Fields Virology*, fourth edition, Vol. 1. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
- Liu, W.J., Chen, H.B., Wang, X.J., Huang, H., Khromykh, A.A. (2004)** Analysis of adaptive mutations in Kunjin virus replicon RNA reveals a novel role for the flavivirus nonstructural protein NS2A in inhibition of beta interferon promoter-driven transcription. *J. Virol.* **79**: 1934-1942
- Liu, W.J., Xiang, J.W., Clark, D.C., Lobigs, M., Hall, R.A., Khromykh, A.A. (2006)** A single amino acid substitution in the West Nile virus nonstructural protein NS2A disables its ability to inhibit alpha/beta interferon induction and attenuates virus virulence in mice. *J. Virol.* **80**: 2396-2404
- Lundin, M., Monné, M., Widell, A., Von Heijne, G., Persson, M. (2003)** Topology of the membrane-associated hepatitis C virus Protein NS4B *J. Virol.* **77**: 5428-5438
- Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A., Jones, M.K., Westaway, E.G. (1998)** Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A. *Virology* **245**: 203-215
- Mackenzie, J.M., Jones, M.K., Westaway, E.G. (1999)** Markers for trans-Golgi membranes and the intermediate compartment localize to induced membranes with distinct replication functions in flavivirus-infected cells. *J. Virol.* **73**: 9555-9567
- Markoff, L., Falgout, B., Chang, A. (1997)** A conserved internal hydrophobic domain mediates the stable membrane integration of the dengue virus capsid protein. *Virology* **233**: 105-117
- Mason, P.W. (1989)** Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells. *Virology* **169**: 354-364

- Mathis, C., Sellards, A.W. & Laigret, J. (1928)** Sensibilité du *Macacus rhesus* au virus de la fièvre jaune. *Compt. rend. Acad. sc.* **186**: 604-606
- Miller, S., Sparacio, S., Bartenschlager, R. (2006)** Subcellular localization and membrane topology of the dengue virus type 2 non-structural protein 4B. *J. Biol.Chem.* in press.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997)** Flaviviren, p. 142-163. In: Molekulare Virologie, 1. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin - Oxford
- Morozova, O.V., Tsekhanovskaya, N.A., Maksimova, T.G., Bachvalova, V.N., Matveeva, V.A., Kit, Y.Y. (1997)** Phosphorylation of tick-borne encephalitis virus NS5 protein. *Virus Res.* **49**: 9-15
- Murray, J.M., Aaskov, J.G., Wright, P.J. (1993)** Processing of the dengue virus type 2 proteins prM and C-prM. *J. Gen. Virol.* **74**: 175-182
- Nestorowicz, A., Chambers, T.J., Rice, C.M. (1994)** Mutagenesis of the Yellow fever virus NS2A/2B cleavage site: Effects on proteolytic processing, viral replication and evidence for alternative processing of the NS2A protein. *Virology* **199**: 114-123
- Nicolle, C. & Laigret, J. (1935)** La vaccination contre la fièvre jaune par le virus amaril vivant, desséché, et enrobé. *Compt. rend. Acad. sc.* **201**: 312-314
- Nilsson, I. & Von Heijne, G. (1993)** Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmatic reticulum membrane. *J. Biol. Chem.* **268**: 5798-5801
- Nowak, T., Färber, P.M., Wengler, G., Wengler, G. (1989)** Analysis of the terminal sequences of West Nile virus structural proteins and of the *in vitro* translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis. *Virology* **169**: 365-376
- Peiris, J.S. & Porterfield, J.S. (1979)** Antibody-mediated enhancement of Flavivirus replication in makrophage-like cell lines. *Nature* **282**: 509-511
- Phillpotts, R.J., Stephenson, J.R. Porterfield, J.S. (1985)** Antibody-dependent enhancement of tick-borne encephalitis virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **66**: 1831-1837
- Post, P.R., Carvalho, R., Galler, R. (1991)** Glycosylation and secretion of Yellow fever virus nonstructural protein NS1. *Virus Res.* **18**: 291-302
- Preugschat, F., Strauss, J.H. (1991)** Processing of nonstructural proteins NS4A and NS4B of dengue 2 virus *in vitro* and *in vivo*. *Virology* **185**: 689-697
- Proutski, V. Gould, E.A., Holmes, E.C. (1997)** Secondary structure of the 3' untranslated region of flaviviruses: Similarities and differences. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1194-1202
- Pugachev, K.V., Guirakhoo, F., Ocran, S.W., Mitchell, F., Parsons, M., Penal, C., Girakhoo, S., Pougatcheva, S.O., Arroyo, J., Trent, D.W., Monath, T.P. (2004)** High fidelity of Yellow fever virus RNA polymerase. *J. Virol.* **78**: 1032-1038
- Reed, W. (1901)** Propagation of Yellow fever; observations based on recent researchers. *Med. Record* **60**: 201-209

- Reed, K.E., Gorbalenya, A.E., Rice, C.M. (1998)** The NS5A/NS5 proteins of viruses from three genera of the family *Flaviviridae* are phosphorylated by associated serine/threonine kinases. *J. Virol.* **72**: 6199-6206
- Rey, F., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., Harrison, S.C. (1995)** The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* **375**: 291-298
- Rice, C.M., Lenches, E.M., Eddy, S.R., Shin, S.J., Sheets, R.L., Strauss, J.H. (1985)** Nucleotide sequence of Yellow fever virus: Implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science* **229**: 726-733
- Rinck, G., Birghan, C. Harada, T., Meyers, G., Thiel, H.J., Tautz, N. (2001)** A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.* **75**: 9470-9482
- Roggendorf, M. (2002)** Hepatitis C Virus, p. 216-225. In: Doerr, H.W. & Gerlich, W.H. (ed.). *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik und Therapie*, 1. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York
- Rothman, A.L. & Ennis, F.A. (1999)** Immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever. *Virology* **257**: 1-6
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning: a laboratory manual*, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., Monica, N. (1995)** The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J. Virol.* **69**: 7461-7471
- Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X. (1996)** Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J. Virol.* **70**: 4549-4557
- Schlesinger, J.J. & Brandriss, M.W. (1983)** 17D Yellow fever virus infection of P388D1 cells mediated by monoclonal antibodies: Properties of the macrophage Fc receptor. *J. Gen. Virol.* **64**: 1255-1262
- Schlesinger, J.J., Brandriss, M.W., Cropp, C.B., Monath, T.P. (1986)** Protection against Yellow fever in monkeys by immunization with Yellow fever virus nonstructural protein NS1. *J. Virol.* **60**: 1153-1155
- Smith, G.W. & Wright, P.J. (1985)** Synthesis of proteins and glycoproteins in dengue type 2 virus-infected Vero and *Aedes albopictus* cells. *J. Gen. Virol.* **66**: 559-571
- Sonnhammer, E.L.L., von Heijne, G., Krogh, A. (1998)** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, p. 175-182. In: Glasgow, J., Littlejohn, T., Major, F., Lathrop, R., Sankoff, D., Sensen, C. (ed.). *Proceedings of the sixth international conference on intelligent systems for molecular biology*. AAAI Press, Menlo Park, CA.

- Stadler, K., Allison, S.L., Schalich, J., Heinz, F.X. (1997)** Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J. Virol.* **71**: 8475-8481
- Steffen, R. & Connor, B.A. (2005)** Vaccines in travel health: From risk assessment to priorities. *J. Travel Med.* **12**: 26-35
- Stevens, T.M. & Schlesinger, R.W. (1965)** Studies on the nature of dengue viruses. I. Correlation of particle density, infectivity, and RNA content of type 2 virus. *Virology* **27**: 103-112
- Stokes, A., Bauer, J.H. & Hudson, N-P. (1928)** Transmission of Yellow fever to *Macacus rhesus*, preliminary note. *J.A.M.A.* **90**: 253-254
- Sutter, G., Ohlmann, M, Erfle, V. (1995)** Non-replicating vaccinia vector efficiently express bacteriophage T7 RNA polymerase. *FEBS Lett.* **37**:1 9-12
- Tanner, M.J., Martin, P.G., High, S. (1988)** The complete amino acid sequence of the human erythrocyte membrane anion-transport protein deduced from the cDNA sequence. *Biochem. J.* **15**: 703-712
- Theiler, M. & Smith HH. (1937)** Use of Yellow fever virus modified by *in vitro* cultivation for human immunization. *J. Exp. Med.* **65**: 787-800.
- Trent, D.W. & Naeve, C.W. (1980)** Biochemistry and replication, p. 159-199. *In*: Monath, T. (ed.). St. Louis Encephalitis. American Public Health Association, Washington DC
- Tusnády, G.E. & Simon, I. (1998)** Principles governing amino acid composition of integral membrane proteins: Applications to topology prediction. *J. Mol. Biol.* **283**: 489-506
- Tusnády, G.E. & Simon, I. (2001)** The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* **17**: 849-850
- Vogelstein, B. & Gillespie, D. (1979)** Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619.
- Wengler, G. & Castle, E. (1986)** Analysis of structural properties which possibly are characteristics for the 3'-terminal sequences of the genome RNA of flaviviruses. *J. Gen. Virol.* **67**: 1183-1188
- Wengler, G. & Wengler, G. (1989)** Cell-associated West Nile flavivirus is covered with E+pre-M protein heterodimers which are destroyed and reorganized by proteolytic cleavage during virus release. *J. Virol.* **63**: 2521-2526
- Wengler, G., Wengler, G., Nowak T., Castle, E. (1990)** Description of a procedure which allows isolation of viral nonstructural proteins from BHK vertebrate cells infected with West Nile flavivirus in a state which allows their direct chemical characterization. *Virology* **177**: 795-801
- Wengler, G. & Wengler, G. (1993)** The NS3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity. *Virology* **89**: 423-437
- Wertman, K.F., Drubin, D.G., Botstein, D. (1992)** Systematic mutational analysis of the yeast ACT1 gene. *Genetics* **132**: 337-350

**Westaway E.G., Khromykh, A.A., Kenney, M.T., Mackenzie, J.M., Jones, M.K. (1997)** Proteins C and NS4B of the flavivirus Kunjin translocate independently into the nucleus. *Virology* **234**: 31-41

**Winkler, G., Randolph, V.B., Cleaves, G.R., Ryan, T.E., Stollar, V. (1988)** Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer. *Virology* **162**: 187-196

**WHO, unbekannter Autor (2001)** Yellow fever, Fact sheet No 100. [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/en/) (18.08.2005 im Netz)

**Wu, J., Bera, A.K., Kuhn, R.J., Smith, J.L. (2005)** Structure of the flavivirus helicase: Implications for catalytic activity, protein interactions, and proteolytic processing. *J. Virol.* **79**: 10268-10277

**Yamaga, A.K. & Ou, J. (2002)** Membrane topology of the Hepatitis C virus NS2 protein. *J. Biol. Chem.* **277**: 33228-33234

## **7. ANHANG**

### **7.1 Sequenzierte GFV-Genomabschnitte**

Entwickelte sich nach der EP von zunächst nicht infektiösen GFV-NS2A-Mutanten später noch ein ZPE, wurde RNA aus reinfizierten Zellen isoliert. Nach RT-PCR wurde die cDNA sequenziert. Die durch Sequenzierung abgedeckten GFV-Genomabschnitte sind in folgender Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 31: Durch Sequenzierung abgedeckte Nukleotidbereiche des GFV-Genoms.**

Die gefundenen "second site" Mutationen lagen im \*<sup>1</sup>: NS2A; \*<sup>2</sup>: NS2B; \*<sup>3</sup>: NS3; \*<sup>4</sup>: 3'-NTR.

\*<sup>5</sup>: Die in der Spalte der sequenzierten GFV-Genomabschnitte gezeigten Zahlen beziehen sich auf die Nukleotidabfolge des GFV-Genoms.

<b>Ursprungsmutation</b>	<b>"2nd-site" Mutation</b>	<b>Sequenzierter GFV-Genomabschnitt*<sup>5</sup></b>
<b>R22A+K23A+R24A</b>	M39L* <sup>2</sup>	3490-4730 und 5070-6905
<b>R22A+K23A+R24A</b>	D3G* <sup>3</sup>	3500-4180 und 4200-4850 und 4880-6905
<b>R22A+K23A+R24A</b>	D343G* <sup>3</sup>	3240-4590 und 5070-6070
<b>R22A+K23A+R24A</b>	E347A* <sup>3</sup>	3120-3850 und 5485-5900
<b>D70A</b>	A70D* <sup>1</sup>	3130-4190
<b>D70A</b>	A70D* <sup>1</sup>	3530-4080
<b>D70A</b>	A70D* <sup>1</sup>	3500-3960
<b>R99A+E100A+R101A</b>	V118E* <sup>1</sup>	3165-4220
<b>R99A+E100A+R101A</b>	K124E* <sup>1</sup>	3260-4590 und 5750-6900
<b>R99A+E100A+R101A</b>	K124E* <sup>1</sup>	3480-4190
<b>R99A+E100A+R101A</b>	K124E* <sup>1</sup>	3470-4170
<b>R99A+E100A+R101A</b>	c10837g* <sup>4</sup> +t10844a* <sup>4</sup>	1-10862
<b>E162A+R164A</b>	M169K* <sup>1</sup>	3400-4420
<b>E162A+R164A</b>	M169K* <sup>1</sup>	3500-4210
<b>E162A+R164A</b>	M169R* <sup>1</sup>	3160-4200



## **DANKSAGUNG**

Als erstes möchte ich mich ganz besonders bei Frau Dr. Beate Kümmerer für die Überlassung des interessanten Themas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre wertvollen, praktischen Tips bedanken.

Herrn Professor Dr. Herbert Schmitz danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für seine Bereitschaft, meine Arbeit auch nach seinem Emeritieren noch zu begutachten.

Auch Herrn Professor Dr. Günter Adam danke ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Ein großes und herzliches Dankeschön geht an die vielen, lieben Labormitstreiter, die im Kampf gegen widerspenstige Klone, bösartige Sequenzierungen und hinterlistige SDS-Gele mitgeholfen und -gelitten haben: Steffi, Annette, Flo, Matze, Romy, Christina und Heike.

Für das supernette Arbeitsklima in der ganzen Abteilung, die große Hilfsbereitschaft untereinander und die lustigen, (feucht-) fröhlichen Ausflüge an die Elbe und in St. Paulis Kneipen möchte ich mich besonders bedanken bei Meike, Britta, Markus, Heiko, Martin, Susanne, Klaus, Maike, Marcus, Stefanie, Stefan und Corina.

Meinen Eltern und meiner Omi danke ich für die vielen platten Daumen, die menthale und finanzielle Unterstützung.

Last but not least - Markus! Vielen, vielen Dank, daß Du es nicht leid geworden bist, mich in den frustreichen Phasen immer wieder aufzubauen und aufzumuntern!