Aus dem Biomedizinischen Forschungszentrum (BMFZ)
Marburg
Institut für Virologie
Direktor: Prof. Dr. S. Becker
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Charakterisierung funktioneller Domänen des vektoriell exprimierten Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit

Inaugural-Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)

dem Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Melanie Skill

aus Reiskirchen

Marburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 17.12.2008

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Prof. Dr. Matthias Rothmund
Referent:	Prof. Dr. Wolfgang Garten
1. Korreferent:	Prof. Dr. Hans-Peter Elsässer

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG……..…1

1.1 Die Bornasche Krankheit 1

1.1.1 Historischer Überblick 1

1.1.2 Epidemiologie 1

1.1.3 Klinik 4

1.1.4 Pathogenese 5

1.2 Das Virus der Bornaschen Krankheit 6

1.2.1 Taxonomie 6

1.2.2 Partikelaufbau und Morphogenese 7

1.2.3 Genomorganisation 9

1.3 Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit 10

2. PROBLEMSTELLUNG……...13

3. MATERIAL…….…..14

3.1 Chemikalien 14

3.2 Geräte 16

3.3 Kits 17

3.4 Verbrauchsmaterial 17

3.5 Enzyme 19

3.6 Restriktionsendonukleasen 19

3.7 Oligonukleotide 19

3.8 Vektoren 20

3.8.1 Vektor pCAGGS-dIntron-M-GP 20

3.8.2 Vektor pIG 21

3.9 Antikörper 21

3.10 Bakterien 22
3.11 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur 22
3.12 Eukaryotische Zellen 22
3.13 Medien und Zusätze für die Zellkultur 23
3.14 Puffer für Zellkultur 23
3.15 Puffer für Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 25
3.16 Puffer für die Übertragung von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose 25
3.17 Puffer für Agarosegelelektrophorese 26

4. METHODEN……27

4.1 Molekularbiologische Methoden 27
4.1.1 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien 27
4.1.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung im kleinen Maßstab 27
4.1.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung im großen Maßstab 28
4.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen 29
4.1.3 Herstellung von Plasmid-DNA-Konstrukten 29
4.1.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion 29
4.1.3.2 Rekombinante PCR (nach Higuchi et al. 1988) 30
4.1.3.3 Mutagenese von Plasmid-DNA in vitro 35
4.1.3.4 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktions-endonukleasen 36
4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren 37
4.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen 37
4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-Ligase 38

4.1.7 Enzymatische Sequenzierung von DNA 39

4.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien 39
4.1.8.1 Methode zur Herstellung kompetenter Zellen 39
4.1.8.2 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA 40

4.2 Zellbiologische Methoden……..……..41
4.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen 41
4.2.2 Passagieren von eukaryontischen Zellen 41
4.2.3 Einfrieren von eukaryontischen Zellen 41
4.2.4 Auftauen von eukaryontischen Zellen 42
4.2.5 Lyse von eukaryontischen Zellen 42
4.2.6 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen 43
4.2.6.1 Transfektion der Zellen mit Lipofektamin 2000 43
4.2.7 Etablierung einer stabilen Zelllinie 44
4.2.8 Infektion von eukaryontischen Zellen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit 44
4.2.9 Fusionstest 45

4.3 Immunologische und biochemische Methoden……45
4.3.1 Endoglykosidase-Behandlung 45
4.3.2 Oberflächenbiotinylierung 46
4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 47
4.3.3.1 Nicht-denaturierende Gele 48
4.3.4 Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran 49
4.3.5 Immunofärbung von Proteinen auf Nitrozellulose 49
4.3.6 Der Chemoluminiszenz-Nachweis 50
4.3.7 Der Nachweis mittels Odyssey® -Infrarot -Imaging System 50
4.3.8 Nachweis von exprimierten Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz 51

5. ERGEBNISSE…… 53

5.1 Das verwendete Konstrukt 53
5.2 Stabile Expression des BDV GP in Vero Zellen 56

5.3	Vergleichende Studien zwischen BDV infizierten Zellen und stabil BDV GP exprimierenden Zellen	59
5.3.1	Untersuchung der Glykosylierung	59
5.3.2	Transport des GP zur Zelloberfläche	63
5.3.3	Intrazelluläre Verteilung des BDV GP	65
5.3.4	Expressionskinetik	67
5.4	Oligomerisierung des BDV GP	69
5.5	Etablierung eines Fusionstests für BDV	71
5.5.1	Quantifizierung der Fusion	73
5.6	Substitution der potentiellen Spaltstelle	74
5.6.1	Expression des substituierten Moleküls	75
5.6.2	Lokalisation des substituierten Moleküls	76
5.6.2.1	Immunfluoreszenzstudien	76
5.6.2.2	Oberflächenbiotinylierung des substituierten Moleküls	79
5.6.3	Fusionstest nach Substitution der Spaltstelle	80
5.7	Inhibition der Zellfusion	83
5.8	Charakterisierung des Fusionspeptides	86
6.	**DISKUSSION……92**	
6.1	Expression eines funktionellen BDV-Glykoproteins	92
6.1.1	Vergleichende Studien zwischen infizierten Zellen und stabil BDV exprimierenden Zellen	93
6.2	Oligomerisierung	95
6.3	Fusionsvermittelnde Eigenschaften des BDV-Glykoprotein	96
6.4	Inhibition der Fusion	97
6.5	Charakterisierung des Fusionspeptides	98
6.6	Resümee	101
7.	**ZUSAMMENFASSUNG……102**	
7.1	Zusammenfassung	102
7.2.	Summary	103

8. LITERATURVERZEICHNIS……104

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS……...…112

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS……..……..115

10.1 Abbildungen 115
10.2 Grafiken 117
10.3 Tabellen 117

11. ANHANG……....118

Sequenz pCAGGS-ΔIntronI-GP 118

Aminosäuresequenz des Matrixproteins von BDV 126

Aminosäuresequenz des Glykoproteins von BDV 126

Präsentation der Arbeit auf Tagungen und Kongressen 127

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt 128

Lebenslauf 129

Verzeichnis der Akademischen Lehrer 130

Danksagung 131

Ehrenwörtliche Erklärung 132

1. EINLEITUNG

1.1 Die Bornasche Krankheit

1.1.1 Historischer Überblick

Die Bornasche Krankheit ist eine schon lange bekannte Erkrankung bei Tieren. Sie wurde von Johann Babtist von Sind 1767 in seinem Buch „Der im Feld und auf der Reise geschwind heilende Pferdearzt“ als „Kopfkrankheit der Pferde“ beschrieben. Die Krankheit wurde in der Vergangenheit unter vielen Namen wie Hirnwuth, epidemische Genickstarre beschrieben. Der heute gebräuchliche Name leitet sich von der Stadt Borna in Sachsen ab, wo 1894 und 1896 eine Enzephalomyelitis epidemisch unter Kavalleriepferden auftrat. 1909 entdeckten Joest und Degen die nach ihnen benannten charakteristischen Einschlusskörperchen in infizierten Zellen. Wilhelm Zwick beschrieb 1926 erstmals den Erreger der Bornaschen Krankheit als ultrafiltrierbares Agents, wodurch die Erkrankung einem Virus zugeschrieben werden konnte. In den siebziger Jahren gelang die Anzucht des Virus in Zellkultur (Mayr und Danner, 1972; Ludwig *et al*. 1973, Herzog und Rott, 1980). 1994 wurde das Genom vollständig sequenziert (Briese *et al*., 1994; Cubitt *et al*., 1994a).

1.1.2 Epidemiologie

Die bedeutendste natürliche Wirtsspezies für das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV, *Borna Disease Virus*) ist das Pferd. In betroffenen Beständen kommt es dabei regelmäßig zur Erkrankung nur einzelner Pferde. Auffallend ist die relativ enge geographische Begrenzung des Auftretens von klinischen Erkrankungen auf den mittel- und süddeutschen Raum sowie die Schweiz und Österreich. Die Zahl der klinisch auffälligen Fälle von BDV-Infektionen ist sehr niedrig. Es wird von weniger als 100

Neuerkrankungen pro Jahr ausgegangen (Schwemmle, 1999a), es spricht allerdings vieles dafür, dass die Rate seropositiver Tiere weitaus höher ist (Grabner *et al.*, 1991). In Deutschland waren von 9.000 untersuchten gesunden Pferden 11,5 % seropositiv gegenüber BDV-spezifischen Antigenen. Weiterhin konnten Antikörper gegen BDV bei Pferden in nahezu ganz Europa sowie Nordamerika, Asien und Afrika nachgewiesen werden, was auf eine weite Verbreitung des Erregers schließen lässt. Es liegen jedoch keine Berichte von klinischen Erkrankungen in diesen Gebieten vor.

An zweiter Stelle der Tierarten, die sich natürlicherweise mit BDV infizieren und auch erkranken, steht das Schaf, wenngleich bei dieser Tierart das Vorkommen von BDV selten ist. Allerdings kann bei Schafen BDV zu seuchenhaften Verlaufsformen führen. Darüber hinaus gibt es Berichte über natürliche Infektionen mit Ausbildung klinischer Symptome bei Kaninchen, Katzen (*staggering disease*), Rindern, Ziegen, Lamas, Alpakas, Straußen und bei Hirschen. Experimentell lassen sich eine Reihe von weiteren Tierarten nach Verabreichung des Virus mit BDV infizieren (Lundgren *et al.,* 1993; Rott *et al.* 1985, 1991). Das Spektrum reicht von Hühnern bis hin zu Primaten.

In neueren Untersuchungen konnte das Vorkommen von BDV im Gehirn von Spitzmäusen *(Crocidura leucodon)* nachgewiesen werden. Diese Tiere weisen jedoch keine klinischen Symptome auf. Das erhöhtes Vorkommen von Spitzmäusen im Frühjahr und Sommer korreliert mit einer erhöhten Inzidenz der Bornaschen Krankheit in diesen Jahreszeiten *(Grabner und Fischer, 1991)*. Ihr Verbreitungsgebiet in Zentraleuropa deckt sich mit dem von endemisch auftretenden Fällen der Bornaschen Krankheit. Da Spitzmäuse im Erdreich von Wiesen und Feldern leben, stehen sie in engem Kontakt zu Pferden und Schafen. Sie werden derzeit als natürliches Wirtsreservoir von BDV postuliert (Hilbe *et al.,* 2006). In vorausgegangenen Studien konnten hohe Virustiter im Urin von Ratten nachgewiesen werden (Sauder und Staehli, 2003), was für einen fäkal-oralen Übertragungsweg von Spitzmäusen auf Pferde sprechen könnte.

Abb.1: Die Spitzmaus *(Crocidura leucodon)* wird zurzeit als natürliches Wirtsreservoir für BDV postuliert.

Neben dem Nachweis des BDV bei einer Vielzahl von Tierspezies, konnte in einigen Studien das Virus auch bei Menschen nachgewiesen werden. Bei Patienten mit neuropsychiatrischen Störungen wurde ein Anstieg von BDV-spezifischen Antikörpern im Serum beobachtet (Rott *et al.*, 1985; Yamaguchi *et al.*, 1999). Außerdem wurden virale Antigene und virale RNA bei akut an Depressionen erkrankten Patienten gefunden. Diese Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass BDV mit psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen einhergehen und als Kofaktor bei der Entwicklung dieser Krankheiten fungieren könnte. Durch Stress ausgelöste Immunsuppression induziert die Aktivierung persistierender Viren im Limbischen System, was zu einer Entzündung in der genannten Region führt (Dietrich *et al.*, 1998). Andere Studien gehen in Bezug auf die Proben von Patienten mit psychiatrischen Störungen jedoch von einer „Laborkontamination“ aus, da die verschiedenen Laboratorien den jeweils verwendeten Laborstamm auch in den Patientenproben nachwiesen (Schwemmle *et al.*, 1999b). Der kausale Zusammenhang zwischen einer BDV-Infektion beim Menschen und der Genese psychiatrischer Erkrankungen, wie Schizophrenie und multiphasische Depressionen, wird bis dato kontrovers diskutiert. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist anzunehmen, dass eine humane BDV-Infektion inapparent verläuft, wenn sie überhaupt auftritt.

1.1.3 Klinik

In ihrem klinischen Verlauf gehört die Bornasche Krankheit zu den langsam fortschreitenden Viruserkrankungen. Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt vier Wochen, variiert aber zwischen wenige Tagen bis hin zu mehreren Monaten (Ludwig *et al.*, 1973 und 1985). Die klinische Manifestation der Infektion geht mit einem breiten Spektrum an variablen Symptomen, wie Müdigkeit, Koliken und Husten einher. Es folgen sehr bald erste Symptome, die aus der Zerstörung des ZNS resultieren. Diese äußern sich als untypische Verhaltensweisen, deutliche Beeinträchtigungen in der Koordination motorischer Funktionen und in Zwangsbewegungen. Pferde beispielsweise stellen beim Fressen plötzlich das Kauen oder Schlucken ein. Weiterhin lassen sich Verhaltensstörungen (Depressionen, Erregungszustände) sowie weitere sensorische und motorische Beeinträchtigungen beobachten. Die Tiere erkennen keine Hindernisse mehr, der Gang wird tappend oder schwankend und sie stolpern häufig. Es kommt zu Lähmungen im Kopfbereich (z.B. Zungenlähmung) und der Hinterbeine und später dann auch der vorderen Extremitäten.

Abb.2: Typische Symptome für ein an BDV erkranktes Pferd sind, wie bei dem Pferd auf der Abbildung, Störungen der normalen Körperhaltung und der Bewegung.

Im Verlauf der Krankheit nehmen die Lähmungserscheinungen zu. Nachdem meist die Futter- und Wasseraufnahme völlig eingestellt wurde kommt es zu einer allgemeinen Schwäche. Die Tiere sind unfähig aufzustehen und liegen oft auf der Seite. Der Krankheitsverlauf dauert drei bis zwanzig Tage und endet in der Regel tödlich. Die Tiere sterben an Entkräftung, Aspirationspneumonien oder einer durch *Dekubitus* verursachte *Sepsis*. Überlebende Pferde zeigen häufig sensorische und motorische Folgeschäden (Becht und Richt, 1996). Eine Therapie für die Bornasche Krankheit gibt es bislang nicht.

1.1.4 Pathogenese

BDV ist strikt neurotrop und verursacht eine Meningoenzephalomyelitis. Histologisch sind Infiltrationen mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Plasmazellen) in perivaskulären und parenchymalen Bereichen des Gehirns sichtbar. Das Virus gelangt über die Nasen- oder Rachenschleimhäute in die offenen Nervenendigungen des Nervus olfactorius und des Nervus trigeminus. Die primäre Virusvermehrung findet wahrscheinlich im Epithel des Nasen-Rachenraums statt. Es wird von einer rezeptorvermittelten Endozytose über das Glykoprotein mit anschließender Membranverschmelzung im Endosom ausgegangen. (Gonzales-Dunia *et al.*, 1998). Der zelluläre Rezeptor ist bisher unbekannt.

Da es sich um ein neurotropes Virus handelt, erfolgt im Riechepithel die Infektion der offenen Nervenenden des *Nervus olfactorius* und des *Nervus trigeminus.* Von dort gelangt der Erreger per intra-axonalem Transport von Zelle zu Zelle (Clemente *et al.*, 2007; Bajramovic *et al.*, 2003) in das Zentrale Nervensystem (ZNS). Dort breiten sie sich ebenfalls intra-axonal sowie möglicherweise über die Zerebrospinalflüssigkeit aus. Dabei werden bevorzugt bestimmte Hirnareale infiziert, wie das Limbische System, die *Substantia grisea*, *Bulbus olfactorius*, *Hippocampus*, *Nukleus caudatus* und *Nukleus niger* (Gosztonyi und Ludwig, 1984).

Im ZNS findet nur eine geringe Virusfreisetzung statt. Die Pathogenese des BDV wurde im Tiermodell sowohl anhand von Lewis Ratten (Bautista *et al.*, 1995) als auch an Mäusen (Hausmann *et al.*, 2001) näher untersucht. Es stellte sich heraus, dass nicht die BDV-Replikation die Symptomatik der Krankheit verursacht, vielmehr ist die Pathogenese auf eine T-zell-vermittelte immunpathologische Reaktion zurückzuführen (Narayan *et al.*, 1983; Stitz *et al.*, 1993; Richt *et al.*, 1992a und 1992b). BDV-spezifische $CD8^+$-Zellen zerstören die BDV-infizierten Gehirnzellen. Untermauert wird dies durch die Tatsache, dass immunsupprimierte Ratten oder neugeborene Ratten mit BDV infiziert werden können, in Folge aber keine klinische Manifestation der Bornaschen Krankheit ausgebildet wird (Herzog *et al.*, 1985).

1.2 Das Virus der Bornaschen Krankheit

1.2.1 Taxonomie

Aufgrund des nicht-segmentierten RNA-Genoms in Negativ-Strang-Orientierung gehört die Familie der *Bornaviridae* zusammen mit den *Rabdoviridae*, den *Paramyxoviridae* und den *Filoviridae* in die Ordnung der *Mononegavirales* (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994a; de la Torre, 1994). Die Klassifizierung in eine eigene Familie wird dadurch gerechtfertigt, dass die *Bornaviridae* ihr Genom als einziger Vertreter der Mononegavirales im Kern der infizierten Zelle replizieren und transkribieren (Briese *et al.*, 1992; Cubitt *et al.*, 1994b, 1994c).

1.2.2 Partikelaufbau und Morphogenese

Elektronenmikroskopische Bilder von Bornaviren zeigen ca. 90-130nm große, von einer Lipidmembran umhüllte Viruspartikel.

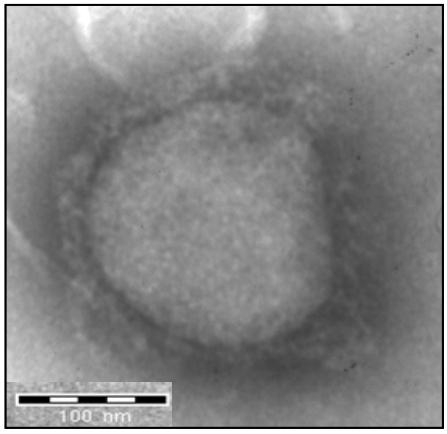


Abb.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines freien, pleomorphen Partikels des Virus der Bornaschen Krankheit. Zur Verfügung gestellt von Nina Stock, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg. Die Viruspartikel wurden aus permanent DBV infizierten MDCK-II-Zelen gewonnen und mittels eines Optipräpkissens aufgereinigt. Zur Darstellung im Elektronenmikroskop wurden eine Negativkontrastierung durchgeführt.

Der Aufbau des Borna Virus gestaltet sich von außen nach innen wie folgt. Das in der Membran verankerte Glykoprotein bildet auf der Oberfläche ca. 7nm lange Spikes. Die Innenseite der Membran wird durch das Matrixprotein ausgekleidet, welches Tetramere bildet und vermutlich mit der C-terminalen Domäne des Glykoproteins interagiert (Kraus *et al.*, 2005). Im Inneren des Viruspartikels befindet sich ein Ribonukleoproteinkomplex aus viraler RNA und den viralen Proteinen N (Nukleoprotein), L (Polymerase) und P (Phosphoprotein). Der Komplex aus den Proteinen N,P und L ist für Replikation und Transkription zuständig, wobei eine genau Zusammensetzung und Funktion noch nicht geklärt ist. Ein weiteres Protein, welches mit diesem Komplex assoziiert ist, ist das Protein (X) (Malik et al., 2000; Wehner et al., 1997; Wolff et al., 2000).

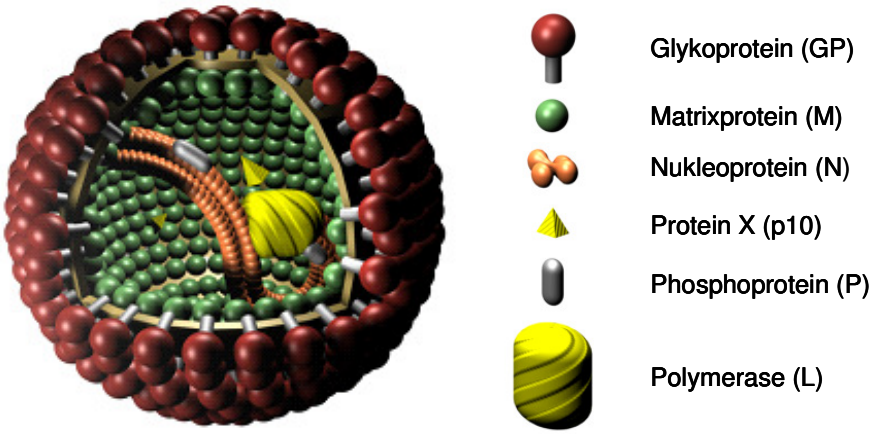


Abb. 4: 3D-Modell eines Viruspartikels des Virus der Bornaschen Krankheit. Der Virus-Partikel setzt sich aus einer Hüllmembran mit integriertem Glykoprotein und assoziiertem Matrixprotein und dem Nukleokapsid zusammen, in dem sich das RNA-Genom, umgeben vom Nukleoprotein und assoziiert mit Phosphoprotein, Protein X und Polymerase, befindet.

Die Morphogenese, der Transport der viralen Bestandteile und der Ort des Zusammenbaus von BDV sind noch weitgehend unbekannt. Relativ gesichert ist jedoch die Bildung der Lipidhülle durch Abschnürung von der Plasmamembran an der Zelloberfläche (Kohono *et al*., 1999). Eine sehr geringe Syntheserate von Membranproteinen ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* nur geringe Mengen neuer Virus-Partikel freigesetzt werden (Richt *et al*., 1998; Schneider *et al*., 1997a; Schneider *et al*., 1997b).

1.2.3 Genomorganisation

Das Genom des Virus der Bornaschen Krankheit besteht aus einer 8,9 kB langen RNA in Negativstrangorientierung (de la Torre *et al.*, 1990), welches sechs offene, teilweise überlappende Leserahmen (ORF=*open reading frame*) enthält (Abb. 4).

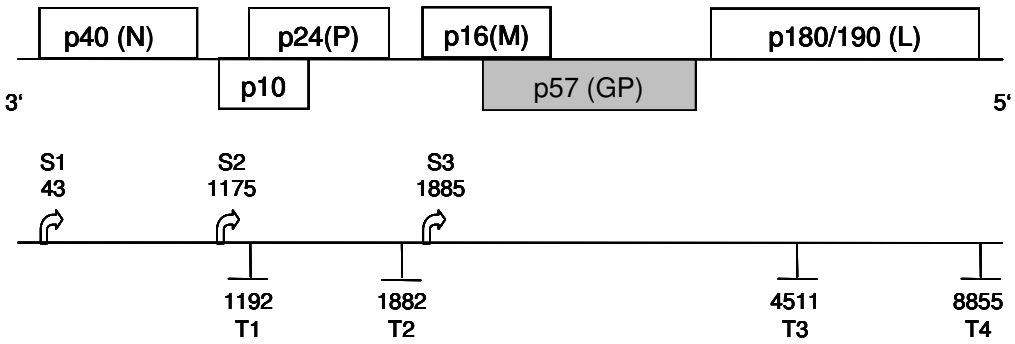


Abb. 5: Genomorganisation des BDV-Virus. Das 8,9 kB lange Genom in negativer Orientierung enthält sechs teilweise überlappende offene Leserahmen, drei Transkriptions-Startstellen (S1–S3) und vier Terminationsstellen (T1–T4).

ORF I kodiert für das Nukleoprotein p40 (NP), ORF II kodiert für das Phosphoprotein p24 (P), ORF III kodiert für das Matrixprotein p16 (M) (Briese *et al.*, 1994, Kraus et al. 2001). Der ORF IV kodiert für p57 (GP) (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1997a und 1997b), ORF V kodiert für p180/190, die phosphorylierte Polymerase (L) (Walker *et al.*, 2000) und ORF VI kodiert für ein Protein p10 (X), welches mit den viralen Phospho- und Nukleoproteinen assoziiert ist (Cubitt *et al.*, 2001; Malik *et al.*, 2000; Schwemmle *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 2000).

Der Vergleich der Nukleotid- und deren abgeleitete Aminosäuresequenzen verschiedener BDV-Stämme zeigt eine Übereinstimmung der Aminosäuren von 84 bis 95,5 % unter allen Genprodukten (Schwemmle *et al.*, 1999; Nowotny *et al.*, 2000; Staeheli *et al.*, 2000).

Das Genom wird von einer 3´-„leader"- und einer 5`-„trailer"- Region flankiert, die nicht transkribiert werden. Mit 8,9 kB ist es verglichen mit anderen Vertretern der *Mononegavirales* sehr klein (Rhabdoviren: 12 kB;

Filoviren: etwa 19 kB, Paramyxoviren: 18 kB). Das Virus hat daher eine Strategie entwickelt, den kurzen kodierenden Bereich optimal zu nutzen. Das Genom enthält nur drei Transkriptionsstartstellen und vier Terminationsstellen (Schneemann *et al.*, 1994). Durch Überlesen von Terminationsstellen produziert das Virus unterschiedliche polycistronische Primärtranskripte. Für die anschließende Prozessierung nutzt es die zellulären Spleißosomen (Cubitt *et al.*, 1994b; Schneider *et al.*, 1997b). Die Proteine werden nach den Spleißprozessen von den polycistronischen Primärtranskripten translatiert. Lediglich das Nukleoprotein (p40) wird als monocistronische mRNA transkribiert. Die Transkripte sind am 5´-Ende mit einer „Cap-Struktur" ausgestattet und besitzen am 3´-Ende eine Polyadenylsequenz (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994c).

1.3 Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit

Der vierte offene Leserahmen des BDV-Genoms kodiert für ein Protein mit einem errechneten Molekulargewicht von etwa 57kDa (503 Aminosäuren). Die Translation des p57 entsteht durch „leaky ribosomal scanning" des polycistronischen Primärtranskripts, das für p16 und p57 kodiert und drei Introns enthält. Das erste Translationsstartkodon des p16 wird überlesen und das um ein Nukleotid verschobene Basentriplett AUG des p57 genutzt. Die Translationseffizienz des zweiten Leserahmens kann durch das Spleißen des ersten Introns im Bereich des p16 erhöht werden (Schneider *et al.*, 1997b). Das glykosylierte GP wird als gp94, als gp84 oder als G-Protein bezeichnet (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997a; Kiermayer *et al*, 2002).

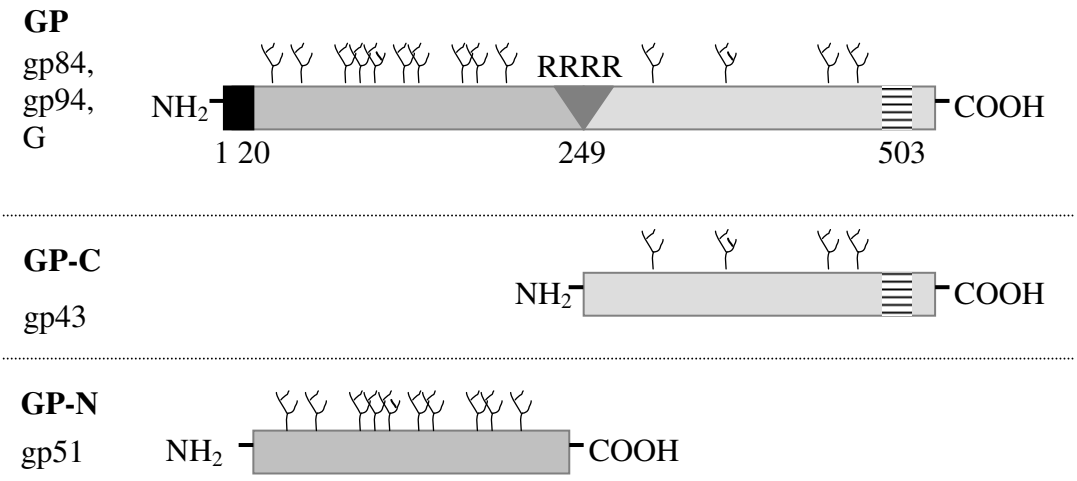


Abb.6: Schematischer Überblick zum BDV-Glykoprotein und seinen Spaltprodukten (Sequenz in der Anlage). Dargestellt sind das Vorläufermolekül GP mit 94 kDa (auch als G, gp94 oder gp84 bezeichnet), das C-terminale Spaltprodukt GP-C mit 43 kDa (gp43) und das N-terminale Spaltfragment GP-N mit einer errechneten molekularen Masse von 51 kDa (gp51). Die schwarz gefüllte Fläche stellt das N-terminale Signalpeptid dar, schwarz-weiß gestreifte Flächen symbolisieren die Transmembrandomäne zur Membranverankerung, „Bäumchen“ zeigen die Verteilung der potenziellen N-Glykosylierungsstellen. Das dunkelgraue Dreieck stellt die Spaltstelle mit basischem Tetrapeptid (R=Arginin) dar. Die Ziffern entsprechen den Aminosäurepositionen im Protein.

Das Glykoprotein gehört zu den Typ-I-Membranproteinen, d.h. es ist durch eine hydrophobe Transmembrandomäne in die Zellmembran inseriert, wobei der Carboxyterminus cytoplasmatisch lokalisiert ist. Der Aminoterminus ist zur extrazellulären Seite orientiert. Die Insertion in die ER-Membran erfolgt durch cotranslationale Translokation, bedingt durch ein N-terminales, hydrophobes Signalpeptid. Eine dritte hydrophobe Domäne an Aminosäureposition 274-345 stellt möglicherweise das Fusionspeptid dar.

Im ER wird das Glykoprotein kotranslational N-Glykosyliert und auf dem Transportweg zur Plasmamembran weiter modifiziert. Es sind 14 Sequenzmotive Asn-X-Ser/Thr innerhalb der Aminosäuresequenz des p57 vorhanden. Diese potenziellen N-Glykosylierungsstellen werden sehr

wahrscheinlich alle genutzt, da das Glykoprotein nach dieser Modifikation eine deutlich erhöhte molekulare Masse von 94 kDa erreicht. Das GP muss für seine biologische Funktion gespalten vorliegen (Richt *et al.*, 1998). Das Glykoprotein enthält drei potentielle, multibasische Spaltstellen für Subtilisin-ähnliche Proteasen an den Aminosäurepsitionen 249, 364 und 386. Aufgrund der Fragmentgrößen, kann davon ausgegangen werden, dass das tetrabasische Aminosäuremotiv (RRRR) an der Aminosäureposition 249 zur proteolytisch Aktivierung genutzt wird (Richt *et al.*, 1998). Dieser Vorgang ist essentiell für die Infektiosität des Virus. Sie resultiert in einem nachweisbaren C-terminalen, membranständigen Spaltfragment GP-C (43 kDa) und einem N-terminalen Spaltprodukt GP-N (51 kDa) (Abb. 6) (Kiermayer *et al.*; 2002). Über den intrazellulären Reifungsweg ist noch nicht sehr viel bekannt. Für die Spaltung konnte schon nachgewiesen werden, dass es sich um ein frühes zelluläres Kompartiment handelt. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Spaltung im Endoplasmatischen Reticulum oder im cis-Golgi stattfindet (Eickmann *et al.*, 2005). Für das C-terminale Spaltprodukt wird eine Beteiligung bei der pH-abhängigen Membranfusion nach der Internalisierung des BDV durch Endozytose vorgeschlagen (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1998). In Untersuchung an Pseudotypen des Vesikular Stomatitis Virus (VSV) mit inserierten Glykoprotein Chimären des GP-N mit dem VSV-Glykoprotein wird dem N-terminalen Anteil eine Funktion bei der Rezeptorbindung zugeschrieben (Perez *et al.*, 2001).

2. PROBLEMSTELLUNG

Das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit konnte bis dato nicht in funktioneller Form *in vitro* exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit soll ein System angewandt werden, welches es ermöglicht, das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit solitär in funktioneller Form zu exprimieren.

Nach erfolgter funktioneller Expression soll die tetrabasische Spaltstelle an Aminosäureposition 246-249 des BDV-Glykoproteins näher charakterisiert werden, um die Bedeutung der Spaltung auf die Zell-Zell - Fusion der BDV-Glykoprotein exprimierenden Zellen zu untersuchen. Anschließend sollen Experimente zeigen, ob es möglich ist, die Fusion durch verschiedene BDV-Glykoprotein-spezifische Antikörper oder Heparin zu inhibieren.

Als Fusionspeptid des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit wird ein hydrophober Bereich zwischen Aminosäure 274 und 315 vermutet. Im Rahmen dieser Arbeit soll dieser Bereich näher untersucht werden und Studien zur Lokalisation und Charakterisierung des Fusionspeptides von BDV durchgeführt werden. Dazu werden Substitutionen im Bereich der hydrophoben Domäne am N-Terminus der C-terminalen Untereinheit eingefügt, die als Fusionspeptid zur Disposition steht.

Der Oligomerisierungsgrad des BDV Glykoprotein, der einen Einfluss auf die Fusionseigenschaften viraler Fusionsproteine haben kann, ist bislang nicht bekannt. Der Oligomerisierungsgrad des BDV-GP soll in dieser Arbeit aufgeklärt werden.

3. MATERIAL

3.1 Chemikalien

2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumchlorid (NH_4Cl)	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Biorad, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid ($CaCl_2$)	Merck, Darmstadt
Complete	Roche, Mannheim
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2.]-octan)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindole, Dihydrochloride)	Molecular Probes, Leiden
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck, Darmstadt
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DOC (Desoxycholat, Na-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Geneticin	Gibco BRL, Eggenstein
Gentamicin (Refobacin)	Ratiopharm, Ulm
Giemsa	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N´-[2-ethansulfonsäure])	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Jodacetamid	Sigma-Aldrich, Steinheim

Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck, Darmstadt
Manganchlorid ($MnCl_2$)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN_3)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
N–Octylglucosid	Roche, Mannheim
NP–40	Calbiochem, Bad Soden
OptiPrep™ (60% Iodixanol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin G	Jenapharm, Jena
PFA (Paraformaldehyd)	Serva, Heidelberg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pyronin G	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
TEMED (N,N,N´,N´-Tetramethylethylendiamin)	Biorad, München
Trasylol® (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

3.2 Geräte

Agarosegelkammer	Harnischmacher Labor– und Kunststofftechnik, Kassel
Analysewaage excellence	Sartorius AG, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Drehrad neoLab–Rotator	neoLab, Heidelberg
Elektronenmikroskop EM109	Zeiss, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems, Darmstadt
Heizblock	Heidolph, Schwabach
Incubator Shaker Model G25	New Brunswick, Nürtingen
Lichtmikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
MegaBACE 500 CE DNA Sequenzierer	Amersham Biosciences, München
Microfuge 20	Hettich, Tuttlingen
Microfuge 22 R	Hettich, Tuttlingen
Microcentrifuge II	Chiron Scientific, Inc., Sylvania USA
Mikrowelle	Samsung, Schwalbach
Odyssey Infrared Imaging System	LI–COR Biosciences, Bad Homburg
pH–Meter	Inolab, Weilheim
Photometer Gene Quant Pro	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala
Photosystem Bio Rad 2000	BioRad, München
Rührer MR 3000	Heidolph, Schwabach
Electrophoresis Power Supply (EPS 301)	Amersham Biosciences, München
Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg

Thermostat 5320	Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallgerät Sonifier B–12	Branson, Danbury, USA
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach
Wasserbad GFL 1003	hilab.de, Düsseldorf
Zellzählkammer nach Neubauer	W. Schreck, Hofheim/ Ts.

3.3 Kits

E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	Peqlab, Erlangen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange Multi Site–Directed - Mutagenesis Kit	Stratagene Europe, Amsterdam
Quick Ligation Kit	NEB, Schwalbach
SuperSignal® West Dura Extended	Pierce, Bonn
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

3.4 Verbrauchsmaterial

Cryoröhrchen	Corning, Niederlande
Deckgläser	Menzel–Gläser, Braunschweig
DNA–Längenstandard (1kb, 100bp)	NEB, Schwalbach
DNA–Probenpuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon–Rot
Gewebekulturschalen 6cm	Greiner, Frickenhausen
Immersionsöl	Zeiss, Göttingen
Protran® Nitrozellulosemembran, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Menzel–Gläser,

	Braunschweig
PageRuler Prestained Protein Ladder	MBI Fermentas, St. Leon–Rot
Parafilm	Structure Probe Inc., München
PCR–Tubes	Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf
Pipetten (Plastik)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (35/10 mm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (60x15 mm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischale (94/16 mm)	Greiner, Frickenhausen
Polystyrolröhrchen TC–Tube	Greiner, Frickenhausen
PP–Test tubes (15 und 50ml)	Greiner, Frickenhausen
Prestained Protein Marker, Broad Range	NEB, Schwalbach
ProLong Gold antifade reagent with DAPI	Invitrogen, Karlsruhe
Quarzküvetten	Hellma, Rabenau–Londorf
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, Rochester, USA
Save–Lock–Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Spritzen	Braun, Melsungen
TipOne–Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg
Whatman 3MM–Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (25 cm^2)	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (75 cm^2) Costar®	Corning, Fischer Scientific GmbH, Schwerte–Geisecke
Zellkulturflaschen (162 cm^2) Costar®	Corning, Fischer Scientific GmbH, Schwerte–Geisecke
Zellkulturplatten mit 6,12 oder 24 Vertiefungen	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA

3.5 Enzyme

Endoglykosidase H (Endo H)	NEB, Schwalbach
Peptid *N*-Glykosidase F (PNGase F)	NEB, Schwalbach
PFU	NEB, Schwalbach
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Hilden
T4-DNA-Ligase	NEB, Schwalbach

3.6 Restriktionsendonukleasen

AflII	NEB, Schwalbach
EcoRV	NEB, Schwalbach
NheI	NEB, Schwalbach
NruI	NEB, Schwalbach
XbaI	NEB, Schwalbach

3.7 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Tib Molbiol Syntheselabor GmbH (Berlin) bezogen und sowohl für die Sequenzierreaktionen als auch für die Polymerasekettenreaktionen eingesetzt.

	Sequenz 5´-3´
gp94_aflII	AGGCCAGGGCTTAAGCGGGTCAT
GP_NheI_R	GGGAAAAAGATCTGCTAGCAGTTG TGGGCATG
GP_EcoRV_F	CAACCACCCTGATATCATCGGGTAT ATAG
Gp_BsrGI_F	GTCACGGTGGCTGTACAGACATTC CCACCG

	Sequenz 5´-3´
GP_ospa_F	CCAAGTTGAGAGCGGCGGCCGCG
	GATACTCAACAG
GP_ospa_F	CTGTTGAGTATCCGCGGCCGCCG
	CTCTCAACTTGG
GP_EcoRV_R	CTATATACCCGATGATATCAGGGT
BDV_GP_I304A	GGTTGAGCCAGC
	CTGGCTCAACCACCCTGATATCGC
BDV_GP_G305A	CGGGTATATAGTTAATGG
	CAACCACCCTGATATCATCGCGTA
BDV_GP_H300A	TATAGTTAATGGAGTTG
	AGGGGCTGGCTCAACGCCCCTGAT
BDV_GP_P301A	ATCATCGG
BDV_GP_G296A	GCTGGCTCAACCACGCTGATATCATCGGG
	GCAATTCTTGAGGGCCTGGCTCAACCACC

3.8 Vektoren

3.8.1 Vektor pCAGGS-dIntron-M-GP

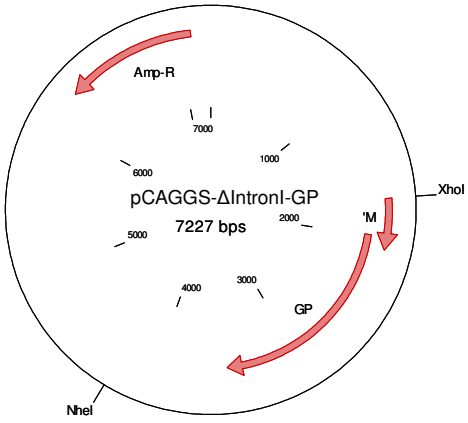


Abb.7: Der Vector pCAGGS (Niwa et al., 1991) enthält den offenen Leserahmen für das Matrix und das Glykoprotein ohne das erste Intron. Das Insert wurde über die Restriktionsschnittstellen XhoI und NheI einkloniert.

3.8.2 Vektor pIG

Der eukaryotische Expressionsvektor pIG enthält das Aminoglykosid-Phosphotransferase-3'-Gen, das eine Neomycinresistenz hervorruft und zur Selektion eukaryotischer Transformanten eingesetzt wird. Der Vektor wurde für Kotransfektionen mit Vektoren, die keinen eukaryotischen Selektionsmarker enthalten, verwendet.

3.9 Antikörper

Polyklonale Kaninchen-Antiseren

αM1	gerichtet gegen AS 2-16 BDV M	J.A. Richt, Gießen
αgpC	gerichtet gegen AS 288-302 BDV GP	J.A. Richt, Gießen
αgpN	gerichtet gegen AS 80-107 BDV GP	S.Kiermayer, Marburg

Zweitantikörper:

Fluorescein (FITC)– gekoppeltes Anti–Human–IgG von der Ziege	Dianova, Hamburg
Rhodamin (TRITC)– gekoppeltes Anti–Kaninchen–IgG von der Ziege	Dianova, Hamburg
Texas Red–gekoppeltes Anti–Kaninchen–IgG von der Ziege	Dianova, Hamburg
Alexa Fluor 488– gekoppeltes Anti–Kaninchen–IgG vom von der Ziege	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594– gekoppeltes Anti–Kaninchen–IgG von der Ziege	Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Anti–Human–IgG vom Kaninchen, IRDye 800	Rockland, Hamburg
Anti–Kaninchen–IgG vom Esel, IRDye 700	Rockland, Hamburg
Anti–Kaninchen–IgG von der Ziege, IRDye 800	Rockland, Hamburg
Anti–Maus–IgG vom Schaf, IRDye 700	Rockland, Hamburg
Anti–Maus–IgG vom Esel, IRDye 800	Rockland, Hamburg
Anti–Maus–IgG vom Kaninchen, HRP–gekoppelt	DAKO, Hamburg
Anti–Kaninchen–IgG von der Ziege, HRP–gekoppelt	Pierce, Bonn

3.10 Bakterien

E. coli, Stamm DH5α NEB, Schwalbach

F$^-$O$^-$ *rec*A1 *end*A1 *hsd*R17 (r_K-,m_K^+), Δ(*lac*ZYA-*arg*F)U169ϕ80d *lac*ZΔM15 *sup*E44 *thi*-1 *gyr*A96 *rel*A1

(Woodcock *et al*., 1989)

3.11 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Luria Bertani Medium (LB) (1 L): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

LB-Agarplatten (1 L): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, 15 g Bacto-Agar

Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt

3.12 Eukaryotische Zellen

Vero–E6–Zellen:	ATCC Nummer:	CCL–81, permanente Zelllinie
	Organismus:	Cercopithecus aethiops (Grüne Meerkatze)
	Gewebe:	Niere, normal
Vero–BDV–Zellen:	Organismus:	Cercopithecus aethiops (Grüne Meerkatze)
	Gewebe:	Niere, normal
	Bemerkung:	permanent BDV–infiziert

Die eukaryotischen Zellen befinden sich in der Stammhaltung des Instituts für Virologie, Marburg.

3.13 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Alfazyme (Accutase)	PAA, Pasching
BM–Cyclin 1/2	Roche, Mannheim
Dulbecco´s modified Eagle´s medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco BRL, Eggenstein
L–Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofektamin 2000	Invitrogen, Karlsruhe
Minimum Essential Medium (MEM)	Gibco BRL, Eggenstein
OptiMEM	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA–Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

3.14 Puffer für Zellkultur

PBS^{def} (Phosphate Buffered Saline deficient):	8 g NaCl
	0,2 g KCl
	1,15 g Na_2HPO_4
	0,2 g KH_2PO_4
	ad 1l dH_2O
PBS^{++} (Phosphate Buffered Saline):	PBS^{def} mit
	0,1 g $MgCl_2$
	0,13 g $CaCl_2$
	ad 1l dH_2O

RIPA-Puffer (pH 7,5):	10% Triton X-100	100ml
	10% DOC	100ml
	10% SDS	10ml
	1M Tris/HCl (pH 7,5)	20ml
	0,5M EDTA (pH 8,0)	20ml
	1:20 Trasylol	50ml
	10mM Jodacetamid	925mg
		ad 1l dH_2O
5X BEP-Puffer:	1M Tris/HCL (pH 8,0)	250ml
	3N NaCl	166ml
	1M $CaCl_2$	4ml
	1M $MgCl_2$	40ml
	10% Glycerin	100ml
	5% NP40	50ml
	Tween 20	25ml
	0,5%N-Octylglucosid	5g
	PMSF	60g
	Trasylol	1ml
		ad 1l dH_2O

3.15 Puffer für Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

10xSDS-Laufpuffer:	SDS	10g
	Tris/HCl	30g
	Glycin	144g
		ad 1l H_2O

4xSDS-Probenpuffer (pH 6,8):	0,5M Tris/HCl (pH 6,8)	400ml
	SDS	40g
	Glycerin	400ml
	2% Bromphenolblau	10ml
	ß-Mercaptoethanol	40ml
		ad 1l dH_2O

3.16 Puffer für die Übertragung von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose

Transferpuffer	Tris	5,8g
	Glycin	2,9g
	Ethanol	200ml
		ad 1l dH2O

3.17 Puffer für Agarosegelelektrophorese

10xTBE-Puffer (pH 8,3):	Tris/HCl (pH 8,3)	108g
	Borsäure	55g
	0,5M EDTA (pH 8,0)	40ml
		ad 1l dH_2O
50xTAE-Puffer	Tris	242 g/l
	EDTA 0,5M pH 8,0	100 ml/l
	Eisessig	57,1ml/l
6xProbenpuffer:	Glycerin	30% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)
	gelöst in aqua bidest.	

4. METHODEN

Soweit nicht anders angeben, entsprechen die in der Arbeit angewendeten molekularbiologischen Methoden den Standardverfahren nach Sambrook *et al.* (1989).

4.1 Molekularbiologische Methoden

4.1.1 Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien (Birnboim *et al.*, 1979) und der anschließenden Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silikamatrix (bei kleinen Präparationen) oder Anionenaustauschersäulen (für Präparationen im großen Maßstab) in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen (Vogelstein *et al.*, 1979). Die Elution der DNA erfolgt in Wasser.

4.1.1.1 Plasmid-DNA-Isolierung im kleinen Maßstab

Zur Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde das „E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit I“ (3.3.) der Fa. PEQLAB, Erlangen, samt der mitgelieferten Puffer verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Zentrifugationen für 1 min bei 13.000 UpM und 4°C in einer Microzentrifuge (3.2) durchgeführt.
Von Selektionsplatten wurden Übernachtkulturen (4.1.1) hergestellt (3-5ml LB-Medium). Diese wurden bei 4000UpM für 10min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Bakteriensediment in 250µl kaltem Lyse-Puffer (Lösung I mit RNAse A) resuspendiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 250µl des

zweiten Lyse-Puffers (Lösung II). Das Röhrchen wurde mehrmals invertiert und 5min bei RT inkubiert, bis ein klares Lysat entstand. Durch Zugabe der Lösung III wurde das Lysat neutralisiert, die Plasmid-DNA renaturiert und die genomische DNA sowie Proteine wurden gefällt. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch eine 10-minütige Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine HiBind®-Miniprep-Zentrifugensäule überführt. Während der anschließenden Zentrifugation konnte die DNA an die Silikamatrix binden. Die Säule wurde zur Beseitigung von Kontaminationen und Enzyminhibitoren einmal mit 500µl HB- und anschließend einmal mit 750µl DNA- Waschpuffer gewaschen. Es folgt eine einmalige Leerzentrifugation, um alle Pufferreste zu entfernen. Die Plasmid-DNA wurde in 50µl *Aqua bidest.* eluiert.

4.1.1.2 Plasmid-DNA-Isolierung im großen Maßstab

Zur Gewinnung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurde das „HiSpeed Plasmid Maxi Kit“ (3.3) der Firma Qiagen, Hilden samt der mitgelieferten Puffer verwendet.
Es wurden 150ml LB-Medium mit Ampicillin (100µg/ml) mit einer Übernachtkultur (4.1.1) transformierter Bakterien 1:1000 angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Herstellung der Zelllysate: Die Bakterien wurden auf Eis 20min abgekühlt, 15min bei 4000UpM und 4°C in der Minifuge abzentrifugiert und das Bakteriensediment in 10ml kaltem Puffer P1 (mit RNAse A) resuspendiert. Die alkalische Lyse erfolgte durch die Zugabe von 10ml Puffer P2. Der Ansatz wurde gemischt und 5min bei RT inkubiert. Anschließend wurden das Lysat durch Zugabe von 10ml Puffer P3 neutralisiert, mehrmals invertiert und 20min auf Eis inkubiert. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch einen folgenden Zentrifugationsschritt von 30 min bei 4000UpM/4°C in der Minifuge sedimentiert.

Säulchenchromatographie (Anionenaustauschersäulen): Das Lysat wurde auf eine mit 10ml QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip 500 Säule gegeben, die Säule daraufhin mit 60ml QC-Puffer gewaschen und anschließend die gebundene DNA mit 15ml QF-Puffer eluiert.

DNA-Fällung: Die eluierte DNA wurde mit dem 0,7-fachen Volumen (10,5ml) Isopropanol gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Das Präzipitat wurde durch das QIAprecipitator Modul gefiltert, wobei die DNA an die Matrix des Moduls binden konnte. Nachdem die DNA mit 2ml 70%igem Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet wurde, wurde sie in 1000µl *Aqua bidest.* eluiert und bei -20°C gelagert.

4.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, wobei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Hierbei gilt die einfache Beziehung OD260 = 1 entspricht 50 µg/mL doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

4.1.3 Herstellung von Plasmid-DNA-Konstrukten

4.1.3.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion

Für die Amplifikation wurde das „*Taq* PCR Core Kit“ (3.3) verwendet und der gewünschte DNA-Abschnitt in folgendem Reaktionsansatz in 0,2ml Reaktionsgefäßen im „Thermozycler“ (GeneAmp PCR System 2400) vervielfältigt.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	10x PCR-Puffer	10µl
	dNTP-Mix (10mM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP)	2µl
	Oligonukleotid 1	30pmol
	Oligonukleotid 2	30pmol
	Matrizen-DNA	200ng
	Ampli*Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5µl
	aqua bidest.	ad 100µl

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten
30	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	55°C	30 Sekunden
	Polymerisation	72°C	1 Minute
1	Polymerisation	72°C	5 Minuten
		4°C	∞

Das PCR-Amplifikat wurde zur Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.1.3.2 Rekombinante PCR (nach Higuchi et *al.* 1988)

Mit Hilfe der rekombinanten PCR kann man Deletionen, Insertionen sowie Substitutionen in Gene einführen oder Abschnitte verschiedener Gene miteinander fusionieren.

In dem ersten Schritt (Abb. 9) wurden durch eine PCR-Reaktion (4.3.1) zwei überlappende Fragmente synthetisiert. Das 5'-Ende des einen Fragments ist dabei komplementär zu dem 3'-Ende des zweiten Fragmentes. Diese beiden Einzelstränge wurden in der anschließenden Hybridisierungs- und Auffüllreaktion fusioniert und aufgefüllt. Die

Amplifikation des entstandenen Fusionsproduktes erfolgte in einer zweiten PCR-Reaktion.
Das so gewonnene PCR-Fragment wurde anschließend durch die entsprechenden Restriktionsendonukleasen (3.5) geschnitten und in den gewünschten Genabschnitt des Zielvektors ligiert.

Die einzelnen Reaktionsansätze setzen sich wie folgt zusammen:

1.PCR:

Reaktionsansatz I:	Komponenten	Volumen
	10x PCR-Puffer	5µl
	dNTP-Mix	1µl
	äußeres Oligonukleotid vorwärts (10 pmol/µl)	1,25µl
	inneres Oligonukleotid 2 rückwärts (10 pmol/µl)	1,25µl
	Matrizen-DNA	200ng
	Ampli*Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5µl
	aqua bidest.	ad 50µl

Reaktionsansatz II:	Komponenten	Volumen
	10x PCR-Puffer	5µl
	dNTP-Mix	1µl
	inneres Oligonukleotid vorwärts (10 pmol/µl)	1,25µl
	äußeres Oligonukleotid rückwärts (10 pmol/µl)	1,25µl
	Matrizen-DNA	200ng
	Ampli*Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,5µl
	aqua bidest.	ad 50µl

Die PCR wurde unter den nachfolgenden Bedingungen im GeneAmp PCR System 2700 (3.2) durchgeführt:

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten
30	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	55°C	30 Sekunden
	Polymerisation	72°C	1 Minute
1	Polymerisation	72°C	5 Minuten
		4°C	∞

Hybridisierung:

Reaktionsansatz	Komponenten	Volumen
	10x PCR-Puffer	10µl
	dNTP-Mix (je 10mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	2µl
	PCR-Fragment 1	2µl
	PCR-Fragment 2	2µl
	Ampli*Taq* DNA-Polymerase (5 U/µl)	1µl
	aqua bidest.	ad 100µl

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten
5	Denaturierung	95°C	1 Minute
	Hybridisierung	50°C	2 Minuten
	Polymerisation	72°C	1 Minute
1	Polymerisation	72°C	5 Minuten
		4°C	∞

2.PCR:

Reaktionsansatz :	Komponenten	Volumen
	Hybridisierungsansatz	100µl
	äußeres Oligonukleotid vorwärts	2,5µl
	äußeres Oligonukleotid rückwärts	2,5µl

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	5 Minuten
30	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	55°C	30 Sekunden
	Polymerisation	72°C	1 Minute
1	Polymerisation	72°C	5 Minuten
		4°C	∞

Zur Verdeutlichung des Prinzips der rekombinanten PCR folgt eine Schematische Darstellung der einzelnen Reaktionsschritte:

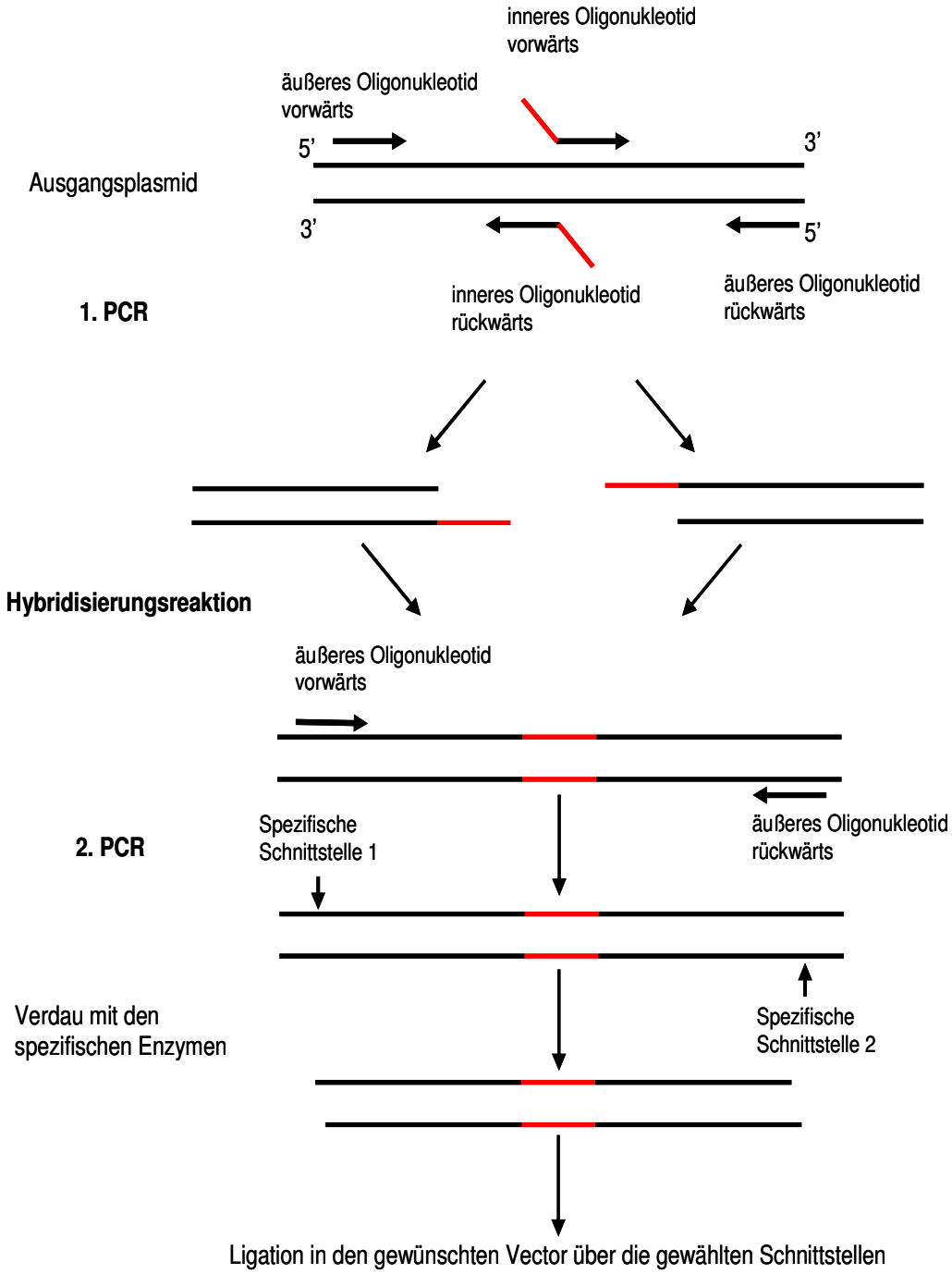


Abb.8: Schematische Darstellung der recombinanten PCR. Die eingefügte Mutation ist durch den roten Balken gekennzeichnet.

4.1.3.3 Mutagenese von Plasmid-DNA *in vitro*

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde das „QuikChange® Multi Site-Directed Mutagenesis Kit“ (3.3) der Firma Stratagene verwendet. Mit dieser Methode können gleichzeitig bis zu fünf verschiedene Mutationen an doppelsträngiger DNA gesetzt werden. Die Mutagenese erfolgt in drei Schritten. Der erste Schritt beinhaltet die Synthese der DNA. Für die Synthese wird der folgende Reaktionsansatz im „Thermozycler“ (GeneAmp PCR System 2700) gewählt:

Reaktionsansatz:	Komponenten	Menge
	Vektor	100ng
	10x QuickChange® Multi Reaktionspuffer*	2,5µl
	QuickSolution	0,75µl
	Mutagenese Primer (10 pmol/µl)	100ng
	dNTP mix*	1µl
	QuickChange® Multi PfuTurbo®	1µl
	aqua bidest.	ad 25µl

* Die Zusammensetzung ist patentrechtlich geschützt und wird vom Hersteller nicht veröffentlicht.

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	1 Minute
30	Denaturierung Hybridisierung Polymerisation	95°C 55°C 65°C	1 Minute 1 Minute 2 Minuten/ kb des Plasmids

Der Reaktionsansatz wird für zwei Minuten auf Eis gestellt und so auf 37°C abgekühlt. Der zweite Schritt beinhaltet nun den Verdau mit 1µl der Endonuklease DpnI. Diese ist spezifisch für den Abbau der parentalen DNA zuständig, welche aus *E. coli* Zellen isoliert und somit in den meisten Fällen dam methyliert ist.
Im dritten und letzten Schritt des Protokolls wird der Reaktionsansatz mit der einzelsträngigen DNA in XL10Gold® ultracompetente Zellen transformiert. In diesen Zellen wird die zirkuläre Einzelstrang DNA in doppelsträngige Plasmid DNA konvertiert.
Diese Methode eignet sich für das Einfügen von bis zu fünf Punktmutationen, kleinen Insertionen oder Deletionen gleichzeitig.

4.1.3.4 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktions-endonukleasen

Der Verdau mit Restriktionsendonukleasen wurde im Gesamtvolumen von 50µl angesetzt, für eine bis drei Stunden unter restriktionsenzymspezifischer Temperatur und Pufferbedingungen im Wasserbad inkubiert und anschließend in einer Agarosegel-Elektrophorese (4.3.3) kontrolliert.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	ds DNA	1-10µg
	10xRestriktionspuffer	5µl
	Restriktionsendonuklease	10-40µl
	Aqua bidest.	ad 50µl

Anschließend wurden die Restriktionsansätze mittels eines PCR-Reinigungskit der Fa. Qiagen gereinigt (3.3).

4.1.4 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung von mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Plasmiden, zur Kontrolle von PCR-Produkten, zur Bestimmung der DNA-Fragmentlänge und zur Überprüfung der Reinheit von DNA wurden 0,8-1,5% Agarosegele verwendet. Vor dem Auftragen der Proben wurde diese mit 6x konzentriertem Auftragspuffer (3.17) versetzt und gemischt. Für analytische Gele wurden 5µl DNA-Probe mit 1µl 6 x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Als Marker wurde der entsprechende Größenstandard verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel wurde unter einer Spannung von 5V/cm, bezogen auf den Abstand der Elektroden, vorgenommen. Die Laufzeit betrug, je nach Fragmentgröße, 45min bis 1,5 Stunden. Anschließend wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (10µg/ml 1xTAE) für 20min auf dem Schüttler gefärbt. Das Ergebnis wurde über ein Photosystem dokumentiert.

4.1.5 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (360nm) mit dem Skalpell ausgeschnitten und das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (3.3) verwendet. Die DNA wurde in 30µl *aqua bidest.* eluiert.

4.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten mit der T4-Ligase

Die enzymatische *in vitro* Rekombination von Plasmid- und Insert-DNA wurde durch Verwendung der T4-DNA-Ligase (NEB Schwalbach) katalysiert.

DNA-Konzentrationen von gespaltenem Plasmid bzw. Insert wurden nach Auftrennung im Agarosegel und Ethidiumbromidfärbung anhand der Bandenintensität im Vergleich zum verwendeten DNA-Längenstandard bestimmt.
Eine hohe Ligationseffizienz wurde dadurch gewährleistet, dass das molare Verhältnis von Vektor und dem zu klonierenden DNA-Fragment 1:3 bis 1:5 betrug. Zudem fördert ein kleines Reaktionsvolumen und eine hohe Konzentration an T4-Ligase die Effizienz der Verknüpfungsreaktion.

Reaktionsansatz:	Komponenten	Volumen
	Vektor	2µl
	DNA-Insert	8µl
	10 x Ligationspuffer (0,5 M Tris/HCl, pH 7,6 0,1 M $MgCl_2$, 50 mM DTT, 10 mM ATP)	2µl
	T4-DNA-Ligase (5U/µl)	1µl
	Aqua bidest.	ad 15µl

Die Ligationsreaktion wurde 16 Stunden im 16°C-Wasserbad inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wurde nur der linearisierte Vektor eingesetzt.
Für die folgende Transformation (4.4.2) in kompetente Bakterien wurde der gesamte Ligationsansatz verwendet.

4.1.7 Enzymatische Sequenzierung von DNA

Diese Methode basiert auf der enzymatischen Synthese von DNA und dem Kettenabbruch durch Didesoxynukleotide (Sanger *et al.*, 1977). Dabei wird eine PCR–Reaktion (4.1.1) mit nur einem Oligonukleotid durchgeführt. In dem Reaktionsansatz befinden sich neben den vier

Desoxynukleotiden (dNTPs) zu einem geringen Anteil mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte 2',3'–Didesoxynukleotide (ddNTPs), wobei jedes der verschiedenen ddNTPs mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Während der DNA–Synthese kommt es durch den Einbau der ddNTPs zu statistisch verteilten Kettenabbrüchen, da die ddNTPs nicht die notwendige 3'OH–Gruppe für die 5'–3'–Phosphodiesterbindung besitzen. Somit entstehen unterschiedlich lange DNA–Fragmente, die alle das gleiche 5'–Ende besitzen und deren letztes Nukleotid am 3'–Ende jeweils ein fluoreszenzmarkiertes ddNTP enthält. Die DNA–Fragmente werden dadurch, abhängig von dem Nukleotid, bei dem die Synthese abgebrochen ist, mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert. Nach der Aufreinigung werden die DNA–Fragmente elektrophoretisch der Länge nach aufgetrennt, wobei ein Laser die Fluoreszenz des jeweiligen Fragments detektiert. Die Auswertung der Sequenzierreaktion erfolgt mit Hilfe einer entsprechenden Software.
Für den Reaktionsansatz wurden 100 bis 200ng DNA und 1µl des jeweiligen Oligonukleotids (10pmol) eingesetzt. Das Endvolumen wurde mit *aqua bidest.* Auf 6µl aufgefüllt. Die Proben wurden mit dem MegaBACE 500 CE DNA Sequenzierer sequenziert und mittels Chromas–Software ausgewertet.

4.1.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

4.1.8.1 Methode zur Herstellung kompetenter Zellen

Es wurden 100ml LB-Medium mit 100µl einer Übernachtkultur des jeweiligen Bakterienstamms angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttlerinkubator (200UpM) inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600nm regelmäßig kontrolliert. Als Blindwert diente hierbei die OD_{600}-Messung von LB-Medium. Bei einer OD_{600} von 0,5-0,6 wurde die Bakterienkultur 20min auf Eis abgekühlt, bei 1200 UpM/4°C für

10min zentrifugiert und in 10ml TSS-Puffer resuspendiert. Es folgte eine weitere Inkubation für 10min auf Eis. Anschließend konnten die Bakterien für eine Transformation eingesetzt werden.

TSS-PUFFER: 10% (w/v) Polyethylenglycol 8000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl2 in LB-Medium, steril filtrieren, bei 4°C lagern

4.1.8.2 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Hierfür wurden 200µl der kompetenten Bakteriensuspension und 0,2µg Plasmidlösung in einem Eppendorfgefäß gemischt und für 20min auf Eis inkubiert, damit sich die DNA an die Bakterien anlagern konnte. Die Aufnahme der DNA in die kompetenten Bakterien erfolgt bei einer anschließenden Inkubation bei 42°C für 90 Sekunden. Nach Abkühlung auf Eis (2min) wurde dem Transformationsansatz 800µl LB-Medium zugesetzt. Durch Inkubation für weitere 60min bei Raumtemperatur konnte sich die plasmid kodierte Antibiotikaresistenz (β-Lactamase-Expression, Ampicillinresistenz) ausbilden. Es wurden jeweils 100µl (1/10) und das Restvolumen (9/10) nach Zentrifugation (1min, 13.000 UpM) und Resuspension in 100µl LB-Medium auf LB-Agarplatten mit Ampicillin (100µg/ml) ausplattiert. Unter diesen Selektionsbedingungen wachsen während einer Inkubation von 16 Stunden bei 37°C nur die transformierten Bakterienklone.

Als Kontrolle dienten

a. kompetente Zellen ohne Vektor

b. kompetente Zellen mit Expressionsvektor ohne Insert.

Die bewachsenen Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

4.2 Zellbiologische Methoden

4.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in Brutschränken mit einer konstanten Temperatur von 37°C unter einer 5%igen CO_2-Atmosphäre und 80% Luftfeuchtigkei kultiviert. Als Kulturgefäße dienten 250ml-Plastikflaschen mit einer Fläche von 75cm^2.

4.2.2 Passagieren von eukaryontischen Zellen

Alle drei bis sieben Tage wurden die konfluent gewachsenen Zellen passagiert. Das Medium wurde abgenommen und der Zellrasen mit 5ml PBS $_{def.}$ gewaschen, so dass Zellreste und zweiwertige Kationen herausgewaschen wurden. Mit 5ml Trypsin/EDTA wurden die Zellen für etwa 2 bis 5min bei 37°C inkubiert und durch mehrfaches Aufziehen in eine Pipette vereinzelt. Überschüssiges Trypsin wurde durch Zugabe von 1x DMEM (3.12) mit 5-10% fötalem Kälberserum (FKS) inaktiviert. Die Zellen wurden in einem für jede Zellart spezifischen Verhältnis bezüglich der Fläche ausgesät.

4.2.3 Einfrieren von eukaryontischen Zellen

Für das längerfristige Aufbewahren von eukaryontischen Zellen wurden diese bei -196°C über flüssigem Stickstoff gelagert. Der Zellrasen einer dichtbewachsenen 250ml Kulturflasche wurde mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden nach Trypsinbehandlung und Vereinzelung in 10ml 1x DMEM mit 10% FKS aufgenommen und bei 4°C für 5min mit 500x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2ml 1x DMEM mit 10% FKS

und 10% DMSO aufgenommen und je 1ml in ein Einfrierröhrchen gegeben.
Um die Zellen langsam herunterzukühlen, wurden sie 24 Stunden in isopropanol-gefüllte Gefrierbehälter bei -80°C gelagert und anschließend über flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

4.2.4 Auftauen von eukaryontischen Zellen

Um gefrorene Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das Einfrierröhrchen aus dem Stickstofftank in ein 37°C Wasserbad überführt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurde der Inhalt in 10ml, ebenfalls auf 37°C vorgewärmtes 1x DMEM mit 10% FKS gegeben und bei RT und 500x g für 5min abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1x DMEM mit 10% FKS resuspendiert, in einer 250ml-Kulturflasche mit 20ml 1x DMEM mit 10% FKS gegeben und bei 37°C und unter 5% CO_2 inkubiert.

4.2.5 Lyse von eukaryontischen Zellen

Die Zellen wurden auf Eis zweimal mit eiskaltem PBS^{++} gewaschen. Anschließend wurde 1ml RIPA-Puffer/Complete auf die Zellen einer 60mm Kulturschale gegeben. Die Zellen werden 10min auf Eis lysiert und das Zell-Lysat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt (Harlow *et. al.,* 1988). Es folgte eine Ultraschallbehandlung bei 40 Watt (30x 1 Sekunde) und 4°C mit dem Sonifier 450 (Fa. Branson). Unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation für 15min bei 14000rpm und 4°C sedimentiert Der Überstand wurde bei -20°C gelagert.
In dem Fall des immunologischen Nachweises des exprimierten Proteins im Immunoblot wurde den Zellen 4 x Proben-Puffer mit β-Mercaptoethanol

zugesetzt, sie wurden für 5min bei 95°C aufgekocht, zentrifugiert und in der SDS-PAGE aufgetrennt.

RIPA-Puffer/ Complete: RIPA-Puffer (3.14),
1x Complete (Proteaseinhibitor)

4.2.6 Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontischen Zellen

4.2.6.1 Transfektion der Zellen mit Lipofektamin 2000

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen ($3x10^6$) wurden folgende Lösungen verwendet:

Lsg. 1	1 ml 1x Optimem + 25 µl Lipofektamin 2000
Lsg. 2	1 ml 1x Optimem + Plasmid 12,5µg

Die Lösungen 1 und 2 wurden separat in Polystyrolröhrchen angesetzt und jeweils 2min inkubiert, anschließend zusammengegeben und für 25min bei RT zur Komplexbildung inkubiert.
Der Zellrasen wurde zweimal mit 5ml 1x Optimem gewaschen. Danach wurde dieses Medium abgenommen und das Transfektionsmedium auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 8-24h. Danach wurde das Transfektionsmedium durch 1x DMEM mit 1% FKS ersetzt und die transfizierten Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert.

4.2.7 Etablierung einer stabilen Zelllinie

Da der Vektor pCAGGS keinen Selektionsmarker enthält, wurde eine Ko-Transfektion mit dem Vektor pIG (3.8) durchgeführt. Der Vektor pIG kodiert für das Aminoglykosidphosphotransferase-Gen und vermittelt daher eine Resistenz gegen Geneticin. Vero-Zellen wurden in einer 9cm-Schale ausgesät und mit Lipofektamin 2000 transfiziert. Hierzu wurde die zehnfache Menge des gewünschten Plasmids im Verhältnis zum Vektor pIG verwendet. Nach 48 Stunden wurde das Medium gewechselt und 1mg/ml Geneticin zu den Zellen gegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt, bis die nicht transfizierten Zellen abgestorben waren und Zellklone gewachsen sind. Die gewachsenen Zellklone wurden mit einer 100µl Pipette unter dem Mikroskop aufgezogen und in eine neue Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen überführt. Für die spätere Expressionskontrolle mittels Immunfluoreszenz wurde in jede Vertiefung ein Deckgläschen gegeben. Die Klone wurden permanent mit 1mg/ml Geneticin kultiviert.

4.2.8 Infektion von eukaryontischen Zellen mit dem Virus der Bornaschen Krankheit

Die zu infizierenden Zellen wurden auf Zellkulturplatten kultiviert, die Deckgläschen enthielten. Sie wurden zweimal mit PBS_{def} und für vier Stunden mit 50µl Viruspräperation in 200 µl 1x DMEM ohne FKS auf einem Schüttler inkubiert. Dann wurde das Medium durch 1x DMEM mit 1% FKS ersetzt und für vier Tage auf den Zellen belassen. Es folgt die Kontrolle der Infektion in der indirekten Immunfluoreszenz.

4.2.9 Fusionstest

Zellen die das BDV GP auf ihrer Oberfläche exprimieren, können mit ihren Nachbarzellen fusionieren, wenn diese den Bindungspartner tragen. Diese Fusion führt zur Bildung von Riesenzellen, so genannten Synzytien.
Es wurde die Fusionsaktivität von infizierten Zellen, stabil exprimierenden Zellen und verschiedener substitutions- Mutanten mit und ohne Inhibitoren getestet. Hiefür wurden die Zellen auf Platten mit 6 Vertiefungen bis zu einer Zelldichte von 90-100% kultiviert. Da für das GP von BDV ein niedriger pH-Wert nötig ist, um eine Fusion auszulösen, wurden die Zellen 2x mit PBS def. gewaschen und mit DMEM, welches mit 10% -iger Essigsäure auf einen pH-Wert von 4,9 eingestellt wurde, inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 37°C. Danach wurden die Zellen 1x mit DMEM/ 1% FCS gewaschen und für weitere 3h in DMEM/ 1% FKS bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit Methanol für 10 min bei RT fixiert. Gefärbt wurden die Zellen anschließend für mindestens 30 min mit einer 1:20 in Wasser verdünnten Giemsa-Lösung. Die Zellen wurden mit einem Lichtmikroskop betrachtet und zur Dokumentation und Auswertung fotografiert.

4.3 Immunologische und biochemische Methoden

4.3.1 Endoglykosidase-Behandlung

Zu 27µl des Zelllysat wurden 3µl 10x Denaturierungspuffer, bestehend aus 5% SDS, 10% β-Mercaptoethanol (NEB), gegeben und für 10min bei 100°C erhitzt. Anschließend erfolgte die Behandlung mit Endoglykosidase H (Endo H) oder Peptid *N*-Glykosidase F (PNGase F). Für die EndoH-Behandlung wurden zu 30µL Probe 4µL 10x G5 Puffer (0,5 M Natrium Zitrat, pH 5,5) und 2µL Endo H (=1.000 U) gegeben und mit *aqua bidest.* aufgefüllt. Im Falle der PNGase F Behandlung wurden 4µL 10x G7 Puffer

(0,5 M Natrium Phosphat, pH 7,5), 4µL 10% (w/v) NP-40 und 2µL PNGase F (1.000 U) verwendet. Die Ansätze wurden für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit 10 µL 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96°C aufgekocht und durch SDS-PAGE aufgetrennt.

4.3.2 Oberflächenbiotinylierung

Zur Markierung von Oberflächenproteinen wurden Zellen mit Sulfo-NHS–Biotin biotinyliert. Dabei reagieren primäre Amine der Proteine in einer nucleophilen Addition mit dem N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS)-Ester unter Abspaltung von N- Hydroxysulfosuccinimid. Da Biotin zwar nicht kovalent, jedoch mit sehr hoher Affinität an Streptavidin bindet, können Biotin-markierte Molekühle auf diese Weise nachgewiesen oder gefällt werden.

Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C bzw. auf Eis durchgeführt, um weitere intrazelluläre Transportvorgänge zu verhindern. Der Zellrasen wurde zunächst 2x mit eiskaltem PBS^{++} /Trasylol/PMSF gewaschen. Es folgte eine zweimalige Inkubation für je 15 min mit dem Biotin-NHS-Reagenz, bei dem eine Reaktive Gruppe an Biotin kovalent gebunden ist. Hiezu wurde Biotin (1mg/ml) in PBS^{++} /Trasylol/PMSF gelöst und 2ml der Lösung für eine 6cm Schale eingesetzt. Anschließend wurden die Zellen in PBS^{++}/Trasylol/PMSF gewaschen und mit 2 ml 50mM Glycin in PBS^{++} für 10 min bei 4°C inkubiert, um ungebundene Biotin-NHS–Reste abzusättigen. Auf diese Weise wurde eine nachträgliche Biotinylierung von intrazellulären Proteinen während der anschließenden Zelllyse vermieden. Hinterher wurden die Zellen erneut 2x mit PBS^{++} /Trasylol/PMSF gewaschen. und in 1ml 1x BEP-Puffer mit Trasylol und PMSF lysiert, beschallt und anschließend für 30min zentrifugiert. Zum Nachweis wurden die Proteine mit Streptavidin-Agarose gefällt.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine aus Zellextrakten bzw. spezifisch immunpräzipitierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht werden SDS-Polyacrylamidgele verwendet (Laemmli, 1970). SDS (3.1) ist ein Detergenz, das fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde β-Mercaptoethanol zugesetzt.

Zunächst wurde ein 10%iges oder 15%iges Polyacrylamidgel (Trenngel, 6 ml) gegossen und mit einem 3,75%igem Polyacrylamidgel, das als Sammelgel dient, überschichtet (Gelgröße: 5x8cm, Dicke 0,75 mm). Ein Kamm formte die Probetaschen im Sammelgel.

Die Proteinproben wurden im einem entsprechenden Volumen 4x Probenpuffer mit β-Mercaptoethanol aufgenommen und 5min bei 96°C aufgekocht, anschließend kurz abzentrifugiert und in die Geltaschen aufgetragen. Als Marker zur Abschätzung des Molekulargewichts wurden entsprechende Marker verwendet. Die Proben wurden in SDS-Laufpuffer (3.15) bei 150V für ca. 1,3 Stunden aufgetrennt, bis die Bromphenolblau-Bande des Probenpuffers die untere Gelkante erreichte.

	Trenngel:		Sammelgel:
	10%	15%	3,75%
Acrylamidlösung Gel 30*	3,3ml	5ml	1,7ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5ml	2,5ml	_____
1 M Tris/HCl pH 6,8	_____	_____	3,4ml
10% (w/v) SDS	100µl	100µl	133µl
aqua bidest.	4,0ml	2,3ml	8,2ml
Pyronin G	_____	_____	53µl
10% (w/v) APS	100µl	100µl	53µl
TEMED	5µl	5µl	20µl

*Acrylamidlösung Gel 30: 30 % Acrylamid/Bisacrylamid im Mischungsverhältnis 37,5:1.

4.3.3.1 Nicht-denaturierende Gele

Zur Analyse der Proteinkonformation können nicht-denaturierende oder native Gele verwendet werden. Die elektrophoretische Mobilität wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wie Nettoladung, Größe und Form des Moleküls. Somit ist es möglich, Veränderungen der Mobilität aufgrund von kovalenten Modifikationen oder Konformationsänderungen zu interpretieren (Creighton, 1997).

In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der SDS-Gele modifiziert. Es wurden nicht die üblichen Puffer für native Gele verwendet. Das Protokoll für ein denaturierendes Polyacrylamidgel wurde dahingehend modifiziert, dass anstelle der 10%igen SDS-Lösung lediglich eine 0,1%ige SDS-Lösung verwendet wurde. Zur Analyse der Multimerisierung wurde ein 8%iges Polyacrylamidgel (Trenngel) mit einem 3,75%igen Polyacrylamidgel (Sammelgel) verwendet.

	Trenngel: 8%	Sammelgel: 3,75%
Acrylamidlösung Gel 30	2,7ml	1,7ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5ml	_____
1 M Tris/HCl pH 6,8	_____	3,4ml
0,1% (w/v) SDS	100µl	133µl
aqua bidest.	4,6ml	8,2ml
Pyronin G	_____	53µl
10% (w/v) APS	100µl	53µl
TEMED	5µl	20µl

Die Zellen wurden in 5x Probenpuffer aufgenommen der sich wie folgt zusammensetzt:

5X Probenpuffer: 50% (w/v) Glycerin, 0,2% (w/v) Methylgrün,

10mM Iodazetamid und 0,1% SDS

4.3.4 Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Für den Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schüll, Ref. Nr. 401180) wurde das Halbtrockenblot-Verfahren (modifiziert) nach Kyhse-Anderson (1984) mit folgendem Aufbau zwischen zwei Graphit-Plattenelektroden verwendet:

Kathode
4 Filterpapiere in Transferpuffer getränkt
GEL
Nitrozellulosemembran in Transferpuffer getränkt
4 Filterpapiere in Transferpuffer getränkt
Anode

Der Transfer erfolgte in 1,2 Stunden bei einer Stromstärke von 1mA/cm^2 Gel.
(Verwendete Puffer siehe 3.16)

4.3.5 Immunofärbung von Proteinen auf Nitrozellulose

Die auf der Nitrozellulose (NC) gebundenen Proteine wurden indirekt durch proteinspezifische Antikörper nachgewiesen. Um spezifische Proteine mit Antikörpern nachzuweisen, wurde der Blot zunächst eine Stunde in 3% BSA in PBS abgesättigt. Es folgte dreimaliges Waschen der NC-Membran in PBS unter Einsatz von 0,1% TWEEN®20 für je 10min. Der Blot wurde daraufhin mit dem spezifischen Erstantikörper, verdünnt 1:100-1:1000 in PBS mit 0,1% TWEEN®20, für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde die NC dreimal in PBS mit 0,1% TWEEN®20 gewaschen und daraufhin 1 Stunde mit dem erstantikörperspezifischen und horseradish peroxidase (HRP) gekoppeltem Zweitantikörper (1:2000

verdünnt in PBS mit 0,1% TWEEN®20) inkubiert. Die NC-Folie wurde weiter 3x 10min in PBS mit 0,1% TWEEN®20 und 1x 10min in PBS gewaschen. Der spezifische Nachweis erfolgte mittels Chemoluminiszenz-Nachweis.

4.3.6 Der Chemoluminiszenz-Nachweis

Die an die Zweitantikörper gekoppelte Peroxidase (HRP=*horseradish peroxidase*) wurde durch Chemoluminiszenz mit SuperSignal® West Pico nachgewiesen. Dabei wird dem Enzym als Substrat ein cyclisches Diacylhydrazid (Luminol) angeboten, das von HRP oxidiert wird und dessen Elektronen in einen angeregten Zustand überführt werden. Beim Übergang in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Licht emittiert. Dieses Licht wiederum schwärzt einen Röntgenfilm. Auf diese Weise lässt sich das Antikörper spezifisch-gebundene Protein auf dem Blot lokalisieren.

4.3.7 Der Nachweis mittels Odyssey® -Infrarot -Imaging System

Eine weiter Methode zum Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose ist das *Odyssey infrared imaging system* von LI-COR. Dieses Gerät verwendet zwei unabhängige Infrarot Fluoreszenz Kanäle zur Detektion von Fluoreszenzsignalen. Die Zweitantikörper tragen einen speziellen infrarot Farbstoff (IRDye = Infrared Dye).
Da die beiden unabhängigen Diodenlaser eine Anregung bei 680nm und 780nm ermöglichen, kann man gleichzeitig zwei unterschiedliche spezifische Zweitantikörper einsetzen und so zwei verschiedene Proteine gleichzeitig detektieren (Schutz-Geschwender *et al*. 2004).

4.3.8 Nachweis von exprimierten Proteinen durch indirekte Immunfluoreszenz

Die intrazelluläre Lokalisation des jeweiligen Proteins in den verschieden Zellkompartimenten sowie die Lokalisation auf der Zelloberfläche wurden über indirekte Immunfluoreszenz untersucht.

Fixierung mit Methanol-Aceton:

Die Zellen wurden bis zu einer Konfluidität von 80% auf Deckgläschen, die in Kulturschalen ausgelegt waren, kultiviert. Die Deckgläschen wurden in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen transferiert, zweimal mit eiskaltem PBS^{++} gewaschen und auf Eis 5min mit je 500µl Methanol:Aceton (1VT:1VT) fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Durch die Behandlung mit Methanol/Aceton findet neben der Fixierung auch eine Permeabilisierung der Zellen statt.

Fixierung mit Paraformaldehyd:

Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBS^{++} gewaschen und mit 250µl 2-4% Paraformaldehyd in DMEM (je Deckglas) 20min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und eventuell vorhandene Paraformaldehyreste während einer 15-minütigen Inkubation mit 50mM Ammoniumchlorid in PBS inaktiviert. Die Zellen wurden erneut dreimal mit PBS gewaschen. Für eine Darstellung der Oberflächenlokalisation eines exprimierten Proteins waren die Zellen jetzt vorbereitet.

Indirekter immunologischer Nachweis:

Es folgte die Inkubation mit einem spezifischen Erstantikörper für eine Stunde. Dieser wurde in Blockierungspuffer 1:100-1:200 Verdünnung und pro Glasplättchen 20µl dieser Lösung auf den Parafilm gegeben. Anschließend wurde das Glasplättchen dreimal mit PBS gewaschen und es folgte die Inkubation mit einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper, der

gegen die Fc-Ketten des spezifischen Erstantikörpers gerichtet war. Dieser FITC-Antikörper wurde 1:100 in Blockierungspuffer verdünnt und die mit dem Erstantikörper behandelten Zellen eine Stunde im Dunkeln inkubiert.
Anschließend wurden die Deckgläschen erst in PBS und dann in *aqua bidest.* Gespült und auf Filterpapier abgetropft. Es folgte das Eindeckeln der Deckgläschen auf Objektträgern in Mowiol (10µl). Nachdem die Eindeckflüssigkeit für etwa eine Stunde getrocknet wurde, sind die Präparate, dunkel und kühl gelagert, für Monate haltbar.

Herstellung des Eindeckmediums:
Es wurden 2,4g Mowiol 4-88 und 6g Glycerin in 6ml entionisiertem Wasser über Nacht gequollen. Anschließend wurden 12ml 0,2M Tris-Puffer (pH 8,5) dazugegeben und der Ansatz unter Rühren bei 50 bis 60°C erhitzt, bis sich alle Komponenten gelöst hatten. Es folgte die Zentrifugation bei 4000UpM für 15min und der klare Überstand wurde abgenommen und mit 10% (w/v) DABCO versetzt. Das fertige Eindeckmedium wurde aliquotiert bei –20°C gelagert.

5. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurde ein Expressionssystem zur Durchführung von Studien am Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit etabliert. Es wurde ein Expressionsystem verwendet, welches ein funktionelles Glykoprotein solitär in eukaryotischen Zellen exprimiert. Dieses System sollte dazu genutzt werden, die Spaltung, das Fusionsverhalten, das Fusionspeptid und die Oligomerisierung des Glykoproteins zu untersuchen.

5.1 Das verwendete Konstrukt

Zur Klonierung des verwendeten Konstruktes pCAGGS-ΔIntronI-GP (3.8.1) wurde virale RNA aus permanent BDV infizierten C6 Zellen isoliert. Zur Infektion der C6 Zellen wurde der BDV Stamm He/80/FR verwendet. Die isolierte RNA wurde mittels reverser Transkriptase PCR (RT PCR) in cDNA umgeschrieben und amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde in den pCR 2.1 TOPO *cloning vector* der Firma Invitrogenen zur Konservierung und Sequenzierung ligiert. Die Sequenzierung ergab, dass das Amplifikat von der mRNA stammt, in der das Intron I heraus gespleißt wurde. Der Vector pCAGGS-ΔIntronI-GP wurde durch Umklonierung des PCR-Produktes aus dem TOPO *cloning vector* in den eukaryotischen Expressionsvector pCAGGS (Niwa et al., 1991) hergestellt (Sequenz 11.1) Dazu wurden die Restriktionsendonukleasen XhoI und NheI verwendet.

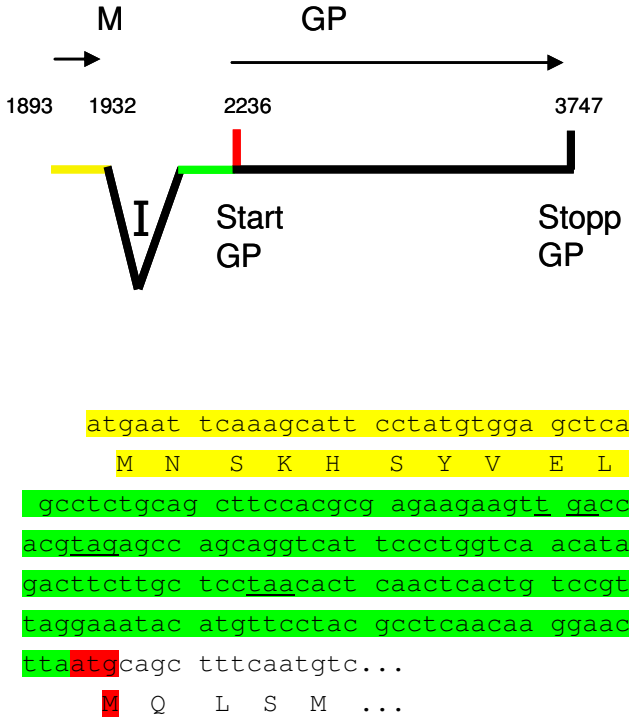


Abb.9: Schematische Darstellung des PCR-Fragmentes, welches in den Vektor pCAGGS kloniert wurde, und der dazugehörigen Sequenz. Es besteht aus den ersten 13 Aminosäuren des Matrixproteins (in gelb dargestellt), das Intron I wurde heraus gespleißt, es folgt ein nicht-kodierender Bereich (in grün dargestellt) bis zum Start des Glykoproteins (in rot dargestellt). Die Stopkodons sind unterstrichen. Das Gen des Glykoproteins ist komplett enthalten.

Das Produkt der PCR enthält 13 Aminosäuren des Matrixproteins, dem folgt eine intergenische nicht kodierende Region und dann das vollständige Gen für das Glykoprotein (Abb. 9).

Um zu zeigen, dass diese Sequenz als Grundlage für die effizientere Expression des BDV-Glykoproteins dient, wurde in dieser Arbeit eine stabilen Zelllinie (5.2) etabliert, welche das BDV GP aus dem oben beschriebenen Konstrukt permanent exprimiert. Zum Nachweis, dass es sich um die beschriebene Sequenz handelt, wurde aus der stabilen Zelllinie mRNA isoliert, mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend sequenziert.

Im Genom des Borna Virus kodieren zwei überlappende Leserahmen (1.2.3 Abb.5) für das Matrixprotein und das Glykoprotein. Durch alternatives Spleißen entsteht entweder ein Transkript, welches für das

Matrixprotein kodiert, oder es wird so gespleißt, dass das Glykoprotein exprimiert werden kann.

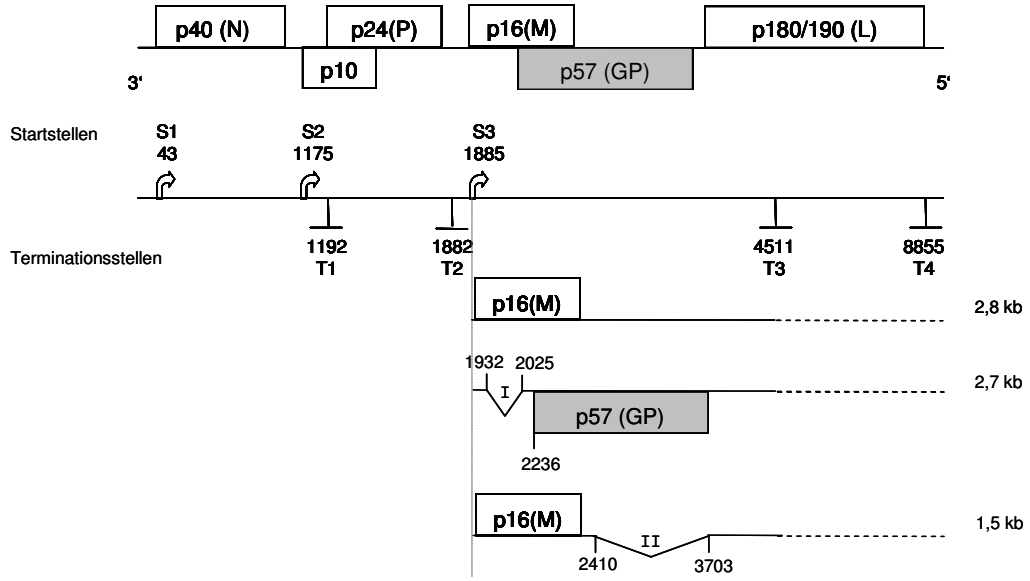


Abb. 10: Schematische Darstellung der möglichen Transkripte ohne Spleißen und durch Spleißen des Intron I bzw. Intron II.

In dem in dieser Arbeit entwickelten Konstrukt liegt die Sequenz für die ersten 13 Aminosäuren des Matrixproteins im selben Leserahmen wie die des Glykoproteins. Durch das Fehlen des Intron I ist nach den 13 Aminosäuren, also am Übergang der beiden Exons, ein Stoppkodon entstanden. Durch das Fehlen des Introns hat sich der Leserahmen so verschoben, dass bis zum Start des Glykoproteins ein nicht kodierender Bereich entstanden ist, der keine weiteren Startsignale enthält, allerdings befinden sich noch drei weitere Stoppsignale in diesem Bereich (Abb. 10)
Es ist davon auszugehen, dass im natürlichen System eben genau dieses Transkript als Grundlage für eine effiziente Expression des Glykoproteins dient.
Mit Hilfe von Immunoblots (4.3.5) war es nicht möglich, mit einem spezifischen Antikörper gegen die ersten Aminosäuren des Matrixproteins ein Produkt zu detektieren, welches den ersten 13 Aminosäuren oder einem anderen spezifischen Produkt entsprechen würde.

5.2 Stabile Expression des BDV GP in Vero Zellen

Das Konstrukt wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 in Vero-Zellen transfiziert (4.2.6). Für die spätere Selektion wurde ein zweites Plasmid, der Vektor pIG (3.8.2), kotransfiziert. Dieser kodiert für das Aminoglykosid–Phosphotransferase–Gen und vermittelt eine Resistenz gegen Geneticin. Die Vero-Zellen wurden in Zellkultur-Schalen bis zu einer Dichte von etwa 70% kultiviert und für 8 Stunden mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Nach 48 Stunden wurde Geneticin zur Selektion der transfizierten Zellen in das Medium gegeben. Neunzig der entstehenden Einzelzellklone wurden unter dem Mikroskop gepickt und anschließend einzeln weiter kultiviert. Die Expression des Borna-Glykoproteins wurde mittels Immunoblot (4.3.5) und Immunfluoreszenz (4.3.8) untersucht.

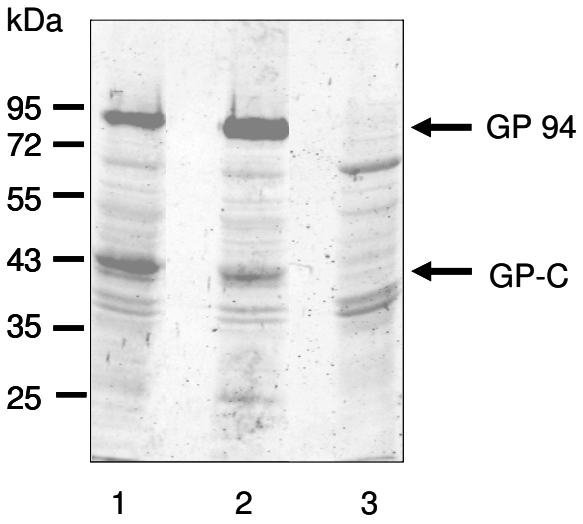


Abb.11: Dargestellt ist ein Immunoblot von Zelllysaten aus (1) BDV infizierter Vero Zellen, (2) stabil GP transfizierten Zellen und (3) Vero-Zellen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des Glykoproteins.

Im Immunoblot (Abb. 11) konnte erstmals ein gespaltenes Glykoprotein nach vektorieller Expression gezeigt werden. Detektiert wurde das Glykoprotein und seine Untereinheit mit dem Antikörper anti-GP-C (3.9) gegen die C-terminale Untereinheit des Glykoproteins. Es ist deutlich das ungespaltene GP bei 94 kDa sowie die C-terminale Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 43 kDa zu erkennen.

Bislang war es nicht möglich, die N-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins ohne Präzipitation mit Hilfe von Lektinen darzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die N-terminale Untereinheit im Immunoblot dargestellt werden (Abb. 12), ohne das Protein zu präzipitieren. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert und anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und im SDS-Gel (4.3.3) aufgetrennt. Die Darstellung erfolgte mit einem N-terminus spezifischen Antikörper (3.9).

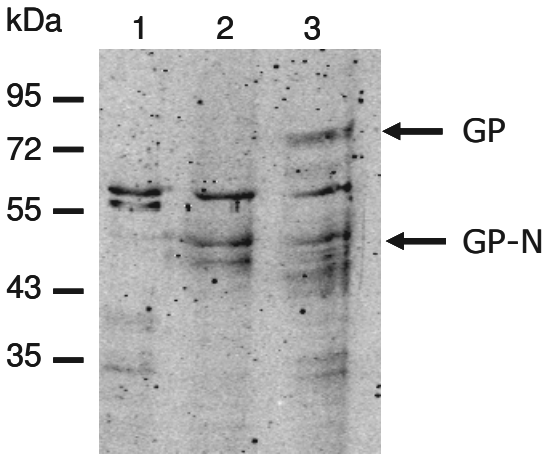


Abb.12: Immunoblot von Zelllysaten aus (3) stabil GP transfizierten Zellen, (2) BDV infizierter Vero Zellen und (1) Vero Zellen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP.

In dem Immunoblot (Abb. 12) konnte sowohl in den BDV infizierten Zellen als auch in der stabil BDV-GP exprimierenden Zelllinie eine deutliche Bande bei 51 kDa nachgewiesen werden. Aufgrund der hohen Verzuckerung erscheint diese Bande etwas diffus.

Für den Nachweis, dass es sich bei der stabilen Zelllinie nicht um einen Mischklon aus BDV exprimierenden Zellen und Vero Zellen, die nicht stabil transfiziert wurden, handelt, wurde eine Immunfluoreszenz-Untersuchung (4.3.8) durchgeführt. Die Zellen wurden dazu bei einer Konfluenz von etwa 70% in Methanol/ Aceton fixiert und permeabilisiert. Als erst Antikörper wurde das spezifisch Serum gegen die C-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins verwendet.

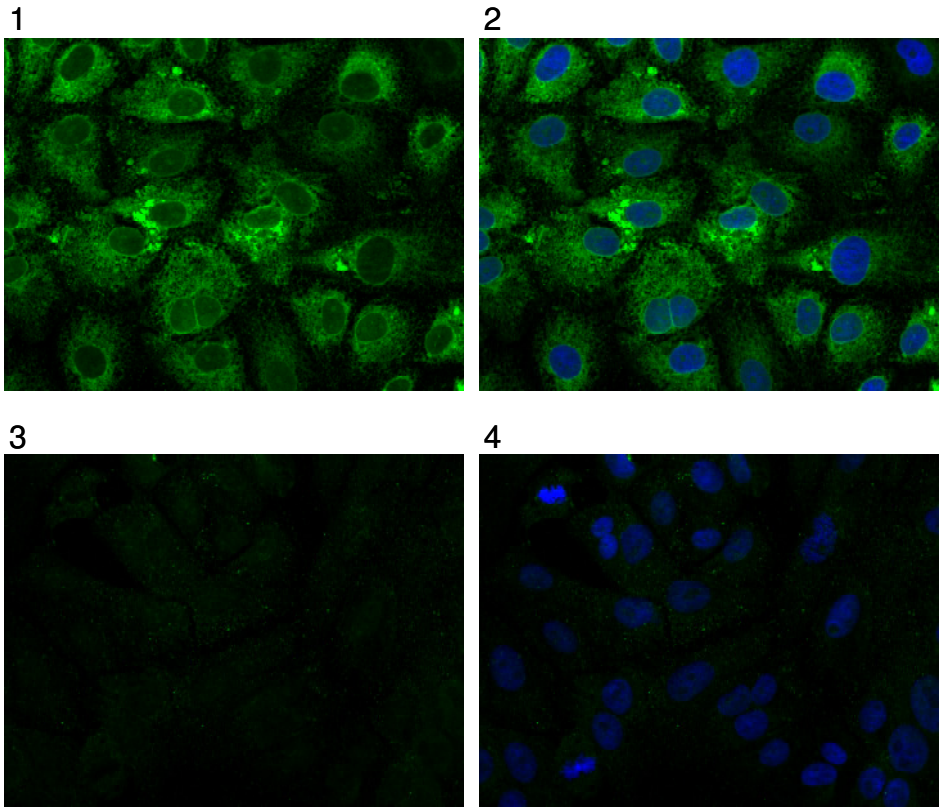


Abb. 13: Immunfluoreszenz der stabil GP transfizierten Zellen im Vergleich zu Vero-Zellen. Dargestellt sind im Bild (1) und (2) stabil GP transfizierte Zellen, sowie Vero-Zellen in Bild (3) und (4). Gefärbt wurden die Zellen mit dem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des BDV GP und DAPI, um die Zellkerne darzustellen.

Die Untersuchung der Zelllinien mittels Immunfluoreszenz konnte zeigen, dass es sich bei der Zelllinie, welche das BDV-Glykoprotein stabil exprimiert, um eine homogene Zelllinie handelt (Abb. 13). Alle vorhandenen Zellen der stabilen Zelllinie zeigen eine deutliche Grünfluoreszenz des Glykoproteins (Abb.13 Bild (1)). Dies wurde durch die Kernfärbung mit DAPI verdeutlicht, da es keine Zellen gibt, in welchen nur eine Kernfärbung zu sehen ist (Abb.13 Bild (2)). Zur Kontrolle wurden Vero- Zellen genauso behandelt wie die Zellen der stabilen Zelllinie. Es ist eine klare Kernfärbung zu erkennen, jedoch keinerlei spezifische oder unspezifische Fluoreszenz mit dem Antikörper gegen das Glykoprotein.

Es wurde ein perfektes Werkzeug generiert, um die funktionellen Domänen des BDV-Glykoproteins näher zu charakterisieren. Es besteht nun die Möglichkeit, an einem solitär exprimierten BDV-Glykoprotein, welches nicht von anderen viralen Proteinen beeinflusst werden kann, Untersuchungen durchzuführen. In dieser Arbeit wurde es für Vergleichsstudien mit dem Glykoprotein aus Virus infizierten Zellen eingesetzt, sowie für Untersuchung bezüglich der Spaltung, der Fusion und der Oligomerisierung. Des Weiteren kann man diese Zelllinie dafür einsetzen, Bindungsstudien für die Rezeptorsuche durchzuführen, auch für Versuche zur Untersuchung der Struktur könnte diese Zelllinie eingesetzt werden und viele weitere Versuche sind denkbar.

5.3 Vergleichende Studien zwischen BDV infizierten Zellen und stabil BDV GP exprimierenden Zellen

5.3.1 Untersuchung der Glykosylierung

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des vektoriell exprimierten Glykoproteins im Vergleich zu Glykoprotein aus permanent infizierten Zellen.

Da es sich bei dem Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit um ein stark verzuckertes Protein handelt (1.3), wurde als erstes die Verzuckerung und somit der korrekte Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat überprüft. Denn nur wenn das Protein den gleichen Grad der Verzuckerung erreicht wie der Wildtyp, kann davon ausgegangen werden, dass der Transport vom ER bis zum späten Golgi analog abläuft.

Hierzu wurden Zellen der stabil BDV-Glykoprotein exprimierenden Zelllinie und permanent infizierte Zellen in RIPA Puffer lysiert und anschließend mit EndoH oder PNGAseF (4.3.1) behandelt. EndoH entfernt die Mannose-reichen N-Glykane und PNGaseF die vom komplexen Typ. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel (4.3.3) aufgetragen und auf Nitrozellulose übertragen.

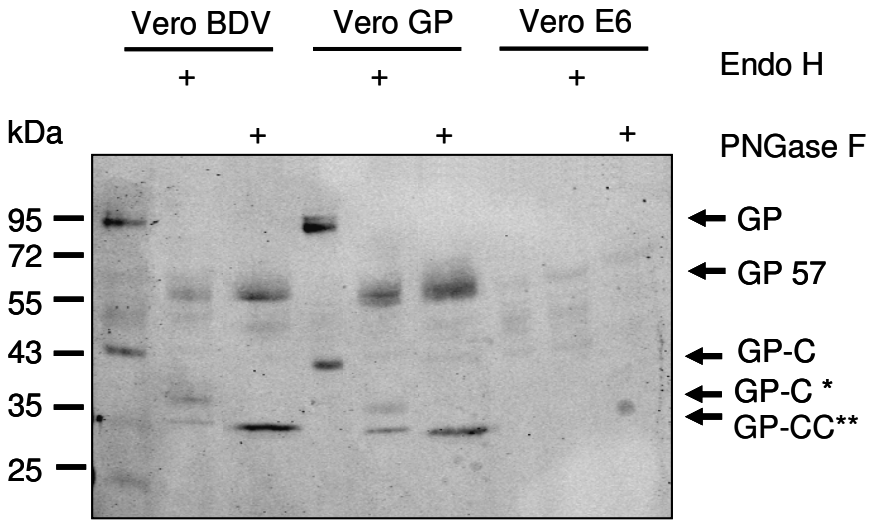


Abb.14: Darstellung eines Immunoblots von Zelllysaten aus BDV infizierter Vero-Zellen (Vero BDV), stabil GP transfizierten Zellen (Vero GP) und Vero-Zellen (Vero E6). Die Zelllysate wurden unbehandelt oder nach Verdau mit EndoH bzw. PNGaseF auf das 10%ige SDS Gel aufgetragen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des Glykoproteins.

Der Nachweis der Proteine erfolgt mittels eines polyklonalen Kaninchenserums gegen die C-terminale Untereinheit (Anti-GP-C) des BDV GP. In der permanent infizierten Zelllinie ist ebenso wie in der stabil BDV GP exprimierenden Zelllinie eine Bande für das ungespaltene Glykoprotein (GP) und die C-terminale Untereinheit (GP-C) zu erkennen, wenn die Zelllysate nicht behandelt wurden (Abb. 14). Nach EndoH-Behandlung wurde das ungespaltene Glykoprotein in seiner vollständig deglykosylierten Form von 57 kDa (GP 57) nachgewiesen, ebenso wie nach PNGase F Verdau. Dies zeigt, dass im ungespaltenen Glykoprotein alle oder annähernd alle N-Glykosylierungsstellen von Mannose-reichen Glykanen belegt sind. Die C-terminale Untereinheit hingegen konnte erst nach Behandlung mit PNGaseF vollständig unverzuckert bei einem Molekulargewicht von 30 kDa (GP-C**) nachgewiesen werden. Nach EndoH Behandlung wurde nur ein Teil der N-Glykane vom GP-C entfernt (GP-C*). Es konnte eine teilweise deglykosylierte Form mit einer molekularen Masse von 35 kDa nachgewiesen werden. Zwei der vier potentiellen N-Glykosylierungsstellen der C-terminalen Untereinheit sind von N-Gykanen des komplexen Typ belegt. Die anderen beiden sind mannosereiche Glykane (Kiermayer *et al.*; 2002)

Mit einem Antikörper spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit wurde der gleiche Versuchsansatz zur Untersuchung der Verzuckerung gewählt wie für die C-terminale Untereinheit.

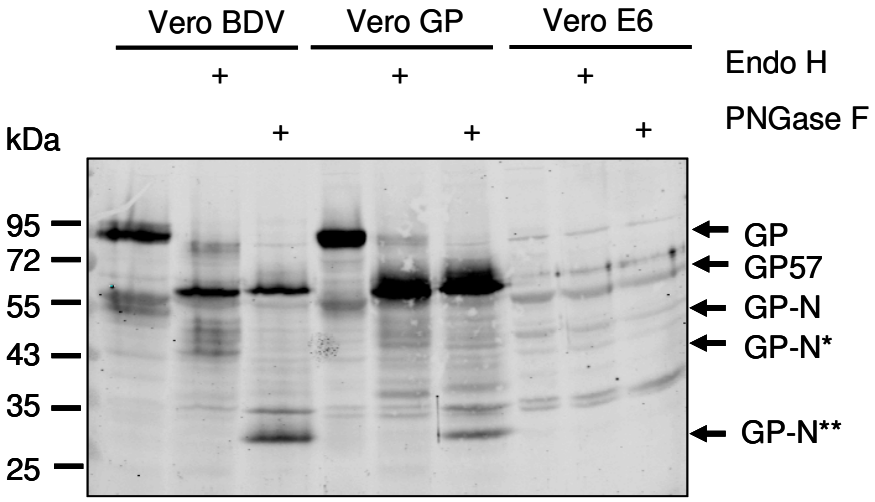


Abb.15: Darstellung eines Immunoblots von Zelllysaten aus (Vero BDV) BDV infizierter Vero-Zellen, (Vero GP) stabil GP transfizierten Zellen und Vero Zellen (Vero E6). Die Zelllysate wurden unbehandelt oder nach Verdau mit EndoH bzw. PNGaseF auf das 10%ige SDS Gel aufgetragen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP.

Das ungespaltene GP ist im Immunoblot beider Zelllysate deutlich mit einem Molekulargewicht von 94kDa (GP) zu detektieren. Die N-terminale Untereinheit kann aufgrund der hohen Verzuckerung als diffuse Bande bei 51 kDa dargestellt werden (Abb. 15).

Das ungespaltene GP liegt nach EndoH und PNGaseF-Behandlung vollständig unverzuckert bei 57 kDa vor (GP 57) und ist somit nicht komplex verzuckert. Das Spaltfragment GP-N wurde nach Behandlung mit PNGaseF in der vollständig deglykosylierten Form GP-N** bei 27 kDa sichtbar. Durch einen Verdau mit EndoH wurde lediglich eine partielle Deglykosylierung erreicht. Das GP-N weist EndoH resistente Zucker auf.

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Verzuckerung des vektoriell exprimierten Proteins der des Wildtypproteins entspricht und somit korrekt durch das ER und den Golgi-Apparat transportiert wird.

5.3.2 Transport des GP zur Zelloberfläche

Um den Transport des BDV-Glykoproteins in der stabilen Zelllinie vom Golgi-Apparat zur Oberfläche zu untersuchen, wurden Oberflächen-Biotinylierungen (4.3.2) und Oberflächenfluoreszenzen (4.3.8) durchgeführt. Als Vergleich für den korrekten Transport diente immer eine permanent infizierte Vero-Zelllinie.

Der korrekte Transport des Glykoproteins zur Zelloberfläche ist für die weiteren Untersuchungen bezüglich der Bedeutung des BDV-Glykoproteins bei der Zell-Zell-Fusion essentiell.

Für die Oberflächenbiotinylierung wurden konfluente Zellen mit Sulfo-NHS-Biotin behandelt und anschließend in BEP-Puffer lysiert. Die Lösung wurde mit Streptavidin-Agarose gefällt. Für den Nachweis der Proteine auf der Zelloberfläche wurden die gekoppelten Biotin / Protein-Komplexe mittels Immunoblot dargestellt.

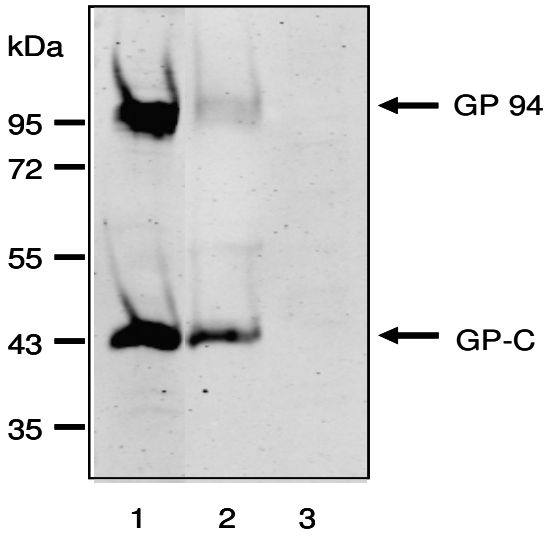


Abb.16: Darstellung der biotinylierten Zelllysate im Immunoblot. BDV infizierte Vero-Zellen (1), stabil BDV-GP exprimierende Vero-Zellen (2) und Vero-Zellen (3) wurden mit Sulfo-NHS-Biotin behandelt, anschließend lysiert und mit Streptavidin-Agarose präzipitiert. Dieser Komplex wurde in Probenpuffer aufgekocht und die biotinylierten Proteine im Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP dargestellt.

Zum spezifischen Nachweis der Proteine wurde das Kaninchenserum gegen die C-terminale Untereinheit verwendet. Sowohl das ungespaltene Glykoprotein als auch die C-terminale Untereinheit konnten in den Lysaten der infizierten Zellen und der stabil GP-exprimierenden Zellen nach biotinylierung und Immunoblot nachgewiesen werden (Abb. 16). Die Menge an Glykoprotein in der stabil transfizierten Zelllinie lag deutlich höher als die Menge an Protein an der Zelloberfläche von infizierten Zellen. Daraus konnte geschlossen werden, dass die höhere Expressionsrate zu einem erhöhten Transport des Glykoproteins an die Zelloberfläche führt.

Eine zweite Möglichkeit Proteine auf der Zelloberfläche darzustellen ist die Oberflächen-Immunfluoreszenz. Hierzu wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät, bei einer Dichte von 60-70% wurden sie 1% Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

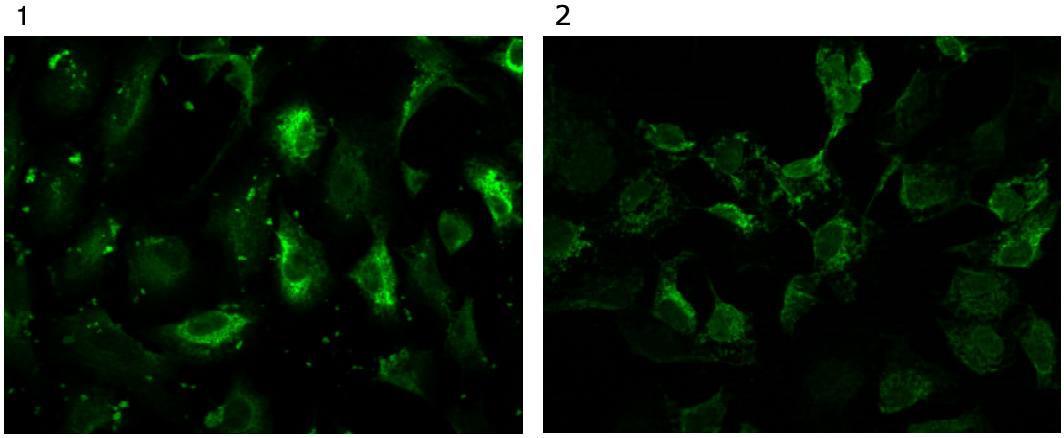


Abb.17: Oberflächen-Immunfluoreszenzen nach Fixierung in 1%PFA. Die Zellen wurden mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP inkubiert und als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter Antikörper verwendet. Dargestellt ist die Oberfläche von (1) BDV infizierten Vero-Zellen, (2) stabil GP exprimierenden Vero-Zellen.

Nach der Fixierung mit PFA wurden die Zellen mit dem Kaninchen Serum gegen die N-terminale Untereinheit des BDV GP inkubiert. Der Antikörper wurde 1:50 verdünnt eingesetzt. Als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Darstellung der Zellen erfolgt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.
Sowohl bei den BDV infizierten Zellen als auch bei den stabil GP exprimierenden Zellen ist über die gesamte Zelle eine deutliche Grün-Färbung zu sehen (Abb. 17), teilweise sind die Umrisse des Zellkerns zu sehen, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen teilweise permeabilisiert wurden. Die Zellausläufer sind deutlich zu erkennen. Die unterschiedlich starken Fluoreszenzsignale weisen darauf hin, dass nicht alle Zellen die gleichen Mengen an Glykoprotein exprimieren. Sowohl in der infizierten als auch in der stabil transfizierten Zelllinie wird das BDV GP an die Oberfläche transportiert. Man kann in diesem Versuch nicht zwischen gespaltenem und ungespaltenem Glykoprotein unterscheiden. Es kann aber festgestellt werden, dass der N-terminale Anteil des Glykoproteins auf der Zelloberfläche nachzuweisen ist.

5.3.3 Intrazelluläre Verteilung des BDV GP

Zur Untersuchung der intrazellulären Verteilung des GP wurden die Zellen bis zu einer Dichte von 80-90% auf Deckgläschen kultiviert und anschließend in Methanol/Aceton fixiert. Bei dieser Art der Fixierung wurden die Zellen permeabilisiert und somit können Antikörper in die Zelle gelangen. Nach dem Fixieren wurden die Deckgläschen mit PBS gewaschen und anschließend getrocknet. Zur Rehydrierung und zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Deckgläschen mit 3% Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin = BSA) behandelt.

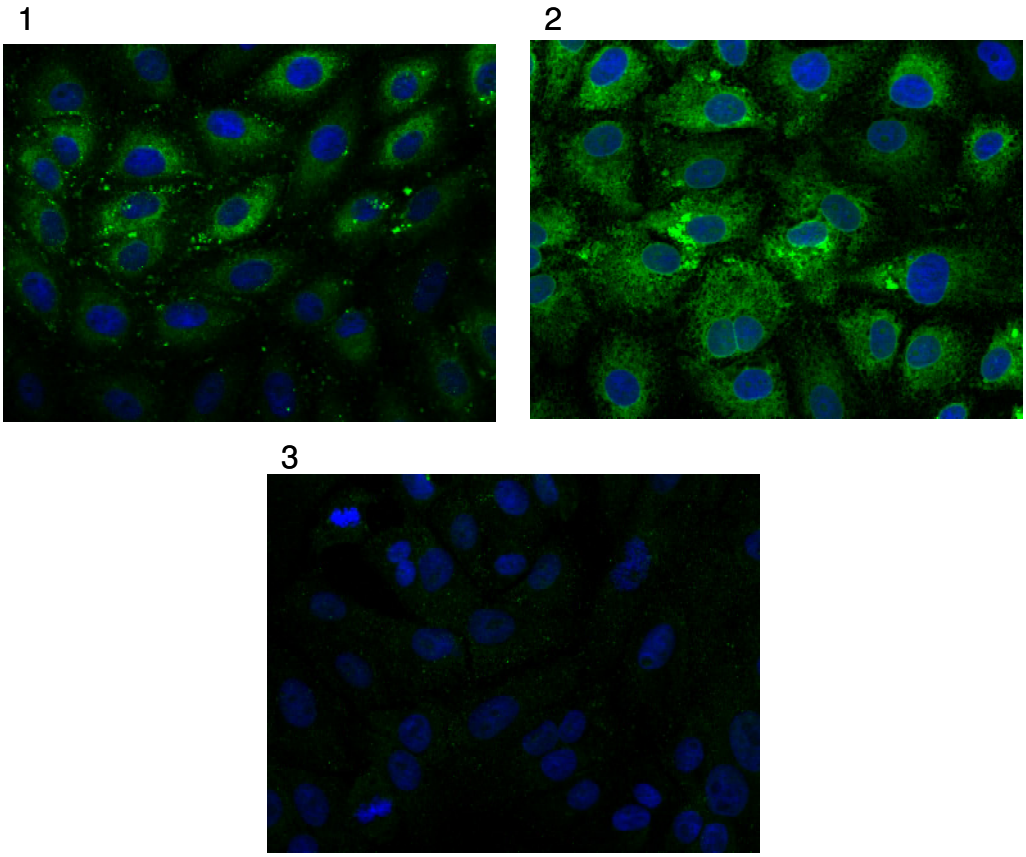


Abb.18: Immunfluoreszenzen nach Fixierung in Methanol/Aceton. Die Zellen wurden mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP inkubiert und als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter Antikörper verwendet. Zur Darstellung der Zellkerne wurde zusätzlich eine DAPI-Färbung durchgeführt. Dargestellt ist die intrazelluläre Verteilung des BDV GP in (1) BDV infizierten Vero-Zellen, (2) stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und (3) Vero-Zellen.

Für den immunologischen Nachweis der Proteine wurde das Kaninchen-Serum gegen die C-terminale Untereinheit des BDV GP verwendet. Der Zweitantikörper ist ein FITC gekoppelter Kaninchen-Antikörper.

Intrazellulär ist das Glykoprotein homogen in der Zelle verteilt, wobei der Zellkern ausgespart ist (Abb.18). Die Lokalisation des vektoriell exprimierten Glykoprotein entspricht der des Wildtyp-Proteins in infizierten Zellen. Deutlich zu erkennen ist ebenfalls, dass die Zelllinie, welche das GP stabil exprimiert, eine stärkere grüne Fluoreszenz aufweist und es sich um eine homogene Zelllinie handelt, in der alle Zellen das Glykoprotein in großer Menge exprimieren. Im Gegensatz dazu zeigt in den BDV

infizierten Vero- Zellen nicht jede Zelle eine BDV-GP Expression zum Zeitpunkt der Fixierung.
Damit steht erstmals ein vektorielles System zur Verfügung, welches ein BDV-Glykoprotein exprimiert, dass bezüglich der Spaltung, der Glykosylierung und der Lokalisation dem viralen Glykoprotein entspricht. Mit diesem solitär exprimierten Glykoprotein ist es nun möglich, die Funktion und die funktionellen Domänen des BDV GP zu untersuchen.

5.3.4 Expressionskinetik

In den vorangegangenen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Menge an GP stark variiert. Um eine zeitliche Aussage zur Expression treffen zu können, wurde die Expressionsmenge in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.
Hierzu wurden BDV infizierte Zellen und stabil GP exprimierende Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen ausgesät und nach 3, 4, 5, 6 und 7 Tagen nach Passage geerntet und auf ein 10% SDS-Gel (4.3.3) aufgetragen, auf Nitrozellulose übertragen(4.3.4). Die Darstellung erfolgte mittels des Kaninchen-Serums gegen die C-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins. Zur Kontrolle der Proteinmenge wurde zusätzlich ein Antikörper gegen ß-Actin verwendet.

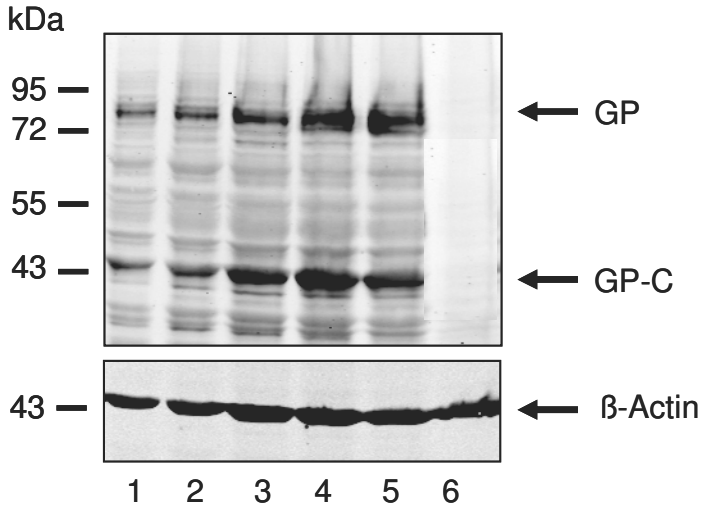


Abb.19: Expressionskinetik über sieben Tagen von BDV infizierten Vero-Zellen. Als negativ Kontrolle wurden Vero-Zellen (6) aufgetragen. Die Spuren 1-5 stellen die Tage 3-7 nach Passage der infizierten Zellen dar. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP. Im unteren Teil der Abbildung ist die Ladungskontrolle mit einer Färbung gegen ß-Actin dargestellt.

In der Kinetik der infizierten Zellen ist zu erkennen, dass in den ersten Tagen nach Passage nur wenig Protein exprimiert wird und auch nur geringe Mengen an Spaltprodukt zu detektieren sind. Erst am sechsten Tag nach Passage ist die maximale Expressionsmenge an GP erreicht (Abb. 19). Für weitere Experimente wurden BDV infizierte Zellen am Tag 6 nach Passage verwendet.

Diese Untersuchung wurde auch für die stabil GP exprimierende Zelllinie durchgeführt (Abb. 20). Hier war am dritten Tag nach Passage schon eine sehr große Menge an ungespaltenem Glykoprotein vorhanden. Die enorm hohe Menge an GP-C konnte erst am Tag 6 nach Passage nachgewiesen werden.

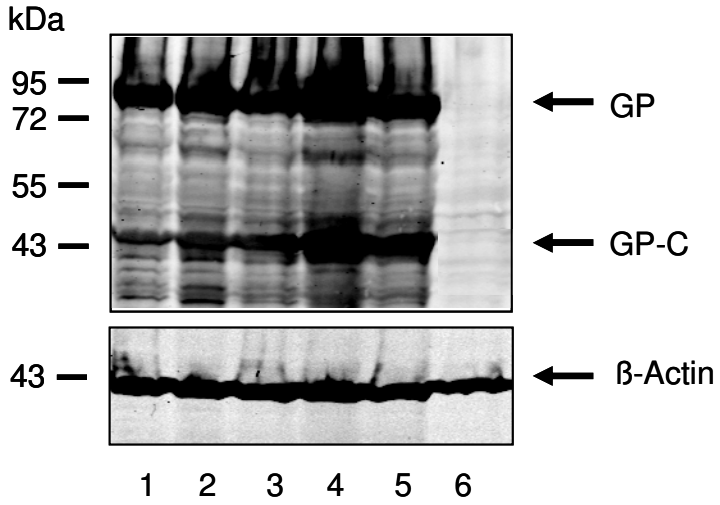


Abb.20: Expressionskinetik sieben Tagen von stabil BDV GP exprimierenden Vero-Zellen. Als negativ Kontrolle wurden nicht transfizierte Vero-Zellen (6) aufgetragen. Die Spuren 1-6 stellen die Tage 3-7 nach Passage der infizierten Zellen dar. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP. Zur Kontrolle der Ladungsmengen wurde eine Färbung gegen ß-Actin durchgeführt.

5.4 Oligomerisierung des BDV GP

Für das Verständnis des Fusionsprozesses spielt die dreidimensionale Struktur eine große Rolle. Ein typisches Merkmal der meisten viralen fusionsaktiven Proteine scheint die Notwendigkeit einer Spaltung des Proteins zur Freilegung des Fusionspeptides sowie das Vorliegen als Oligomer zu sein. In einem ersten Versuch sollte für das BDV GP überprüft werden, ob auch dieses Protein in oligomeren Formen vorliegt.

Dazu wurden stabil GP exprimierende Zellen, BDV infizierte Zellen und Vero-Zellen in einem Probenpuffer für native Gele ohne Merkaptoethanol (4.3.3.1) aufgenommen. Der Probenpuffer besteht aus Glycerol und Methylgrün, zusätzlich wurde er noch mit 10mM Iodazetamid und 0,1% SDS versetzt. Die Zelllysate wurden auf ein 8%iges SDS-Gel (4.3.3) aufgetragen.

Es folgt eine Übertragung auf Nitrozellulose (4.3.4) und der Nachweis mit dem spezifischen Kaninchen-Serum gegen die C-terminale Untereinheit des BDV GP. Die bildliche Darstellung erfolgte mit Hilfe des *Odysee infrared imaging Systems* (4.3.7).

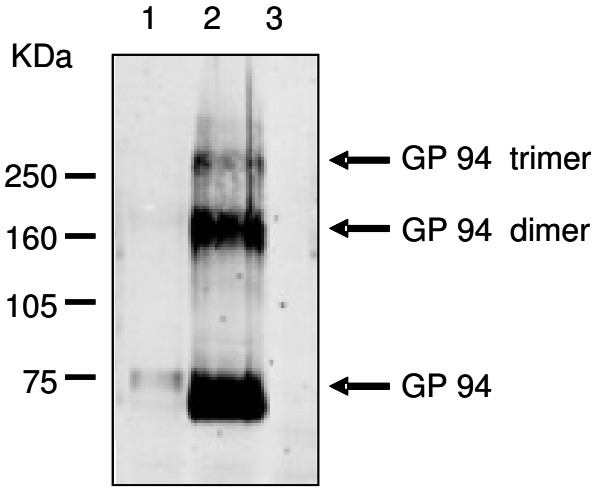


Abb.21: Darstellung der oligomeren Formen des BDV GP in einem Immunoblot unter nicht denaturierenden Bedingungen. In der ersten Spur (1) sind infizierte Zellen aufgetragen, (2) entspricht den stabil GP exprimierenden Zellen und als Kontrolle wurden Vero-Zellen mit aufgetragen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP.

In dem Immunoblot der Zellen unter nicht reduzierenden Bedingungen konnte eindeutig gezeigt werden, dass das BDV-Glykoproteins in der stabil das Glykoprotein exprimierenden Zelllinie neben dem monomeren Protein bei 94 kDa noch höher molekulare Formen zeigt (Abb. 21). Dabei handelt es sich möglicherweise um eine dimere Form bei ca. 190 kDa und eine trimere Form bei etwa 280 kDa. Die Menge an Protein aus den BDV infizierten Zellen reichte nicht aus, um neben einer schwachen Bande des Vorläufers bei 94 kDa weitere Formen des GP zu detektieren.

5.5 Etablierung eines Fusionstests für BDV

Zum Nachweis der Funktionalität des vektoriellen GP wurde ein Fusionstest (4.2.9) für dieses Expressionssystem optimiert. Mit diesem Test wurde der Vorgang der Fusion im Endosom nach der rezeptorvermittelten Endozytose simuliert.

Für die Untersuchung wurden Zellen in 6 cm Schalen bis zu einer Dichte von 80-90% kultiviert und anschließend einer pH-Erniedrigung mit einem auf pH 4,9 eingestellten Medium unterzogen. Die Inkubation bei pH 4,9 erfolgt für 10 min bei 37°C.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene pH-Werte und verschiedene Zeiten getestet. Die Kombination aus pH 4,9 für 10 min hat sich als beste mögliche Kombination dargestellt. Die Behandlung mit geringeren pH-Werten führte zum Absterben der Zellen und ein höherer pH-Wert konnte keine Synzythien-Bildung initiieren. Auch wurden verschiedene Zeiten ausgetestet. Eine Dauer von fünf Minuten pH 4,9 reichte schon aus, um Synzythien detektieren zu können, die Ergebnisse nach 10 min pH-Erniedrigung waren allerdings deutlicher. Wird die Zeit der Behandlung mit dem niedrigen pH-Wert auf 15 Minuten verlängert, sterben die Zellen, sie lösen sich von der Zellkulturschale und es war keine Auswertung mehr möglich. Zur Darstellung der Zellen wurden diese mit Giemsa gefärbt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops.

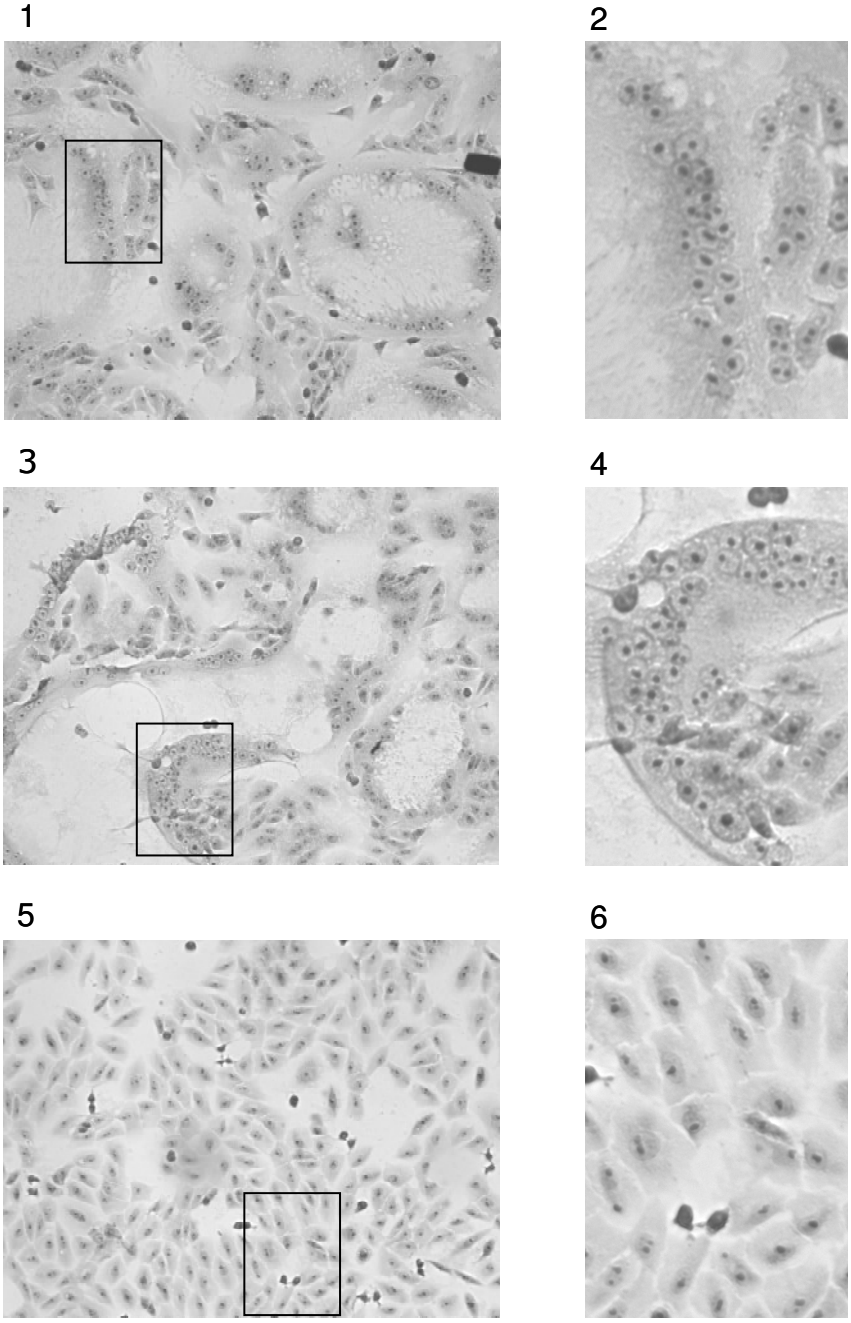
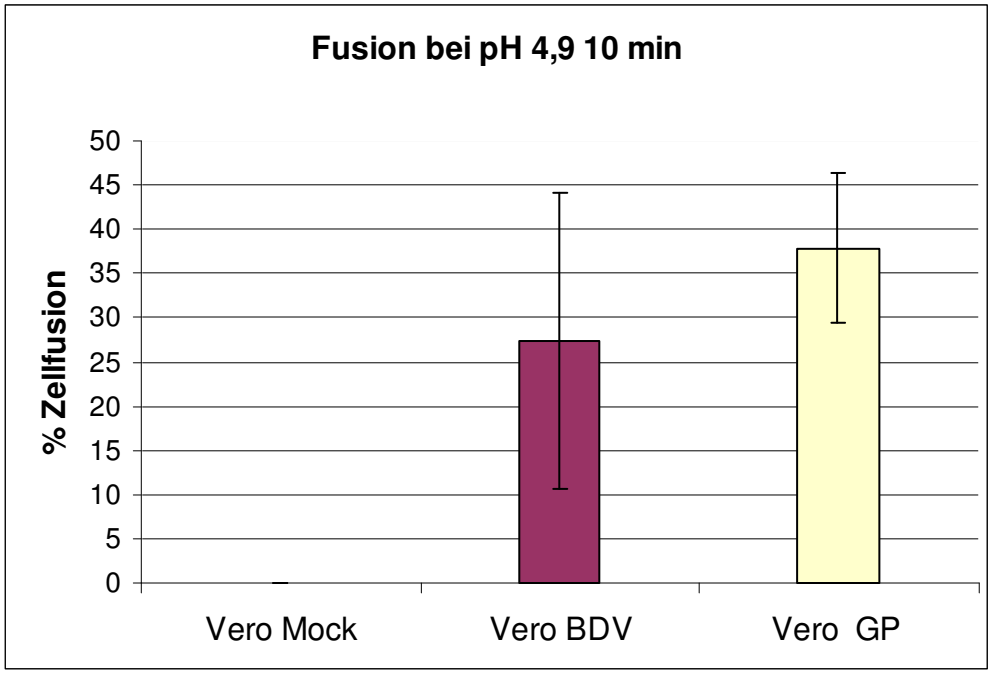


Abb. 22: Gezeigt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt wurden. (5; 6) Vero -Zellen zeigen nach der pH Erniedrigung keine Synzythien-Bildung. In (3; 4) BDV infizierten Vero-Zellen und (1; 2) stabil GP exprimierende Zellen sind deutlich Synzytien zu erkennen. Zur Verdeutlichung wurden die mit dem Rechteck markierten Ausschnitte auf der rechten Seite vergrößert dargestellt.

Bei den infizierten Vero-Zellen und den stabil mit BDV GP transfizieten Zellen war eine deutliche Bildung von Synzytien zu erkennen (Abb. 22). Die Zellkerne haben sich deutlich zusammengelagert.

5.5.1 Quantifizierung der Fusion

Zur Quantifizierung der Fusion wurden die Zellen von je fünf Bildausschnitten einer Zellart in Doppelbestimmung ausgezählt. Gezählt wurden alle Zellkerne auf dem Bildausschnitt sowie die Zellkerne in einem Polykarion. Diese Zahlen wurden gemittelt und das Verhältnis der Kerne in Synzythien zur gesamten Anzahl an Zellkernen ermittelt. Dargestellt wurde der prozentuale Anteil an Kernen in Synzythien.
Als Synzythium wurden alle Zellen mit mehr als drei Kernen definiert.



Grafik 1: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl.

Es ist deutlich zu erkennen, dass ist den Vero-Zellen keine Synzythien gebildet werden. In den infizierten Zellen sind 27% aller Zellen in Synzytien und bei der stabilen GP Zelllinie sind es fast 40% (Grafik 1).

5.6 Substitution der potentiellen Spaltstelle

Die proteolytische Spaltung des BDV GP ist für die biologische Aktivität des Virus sehr wichtig. Unter anderem spielt die Spaltung wahrscheinlich eine essentielle Rolle bei der Zell-Zell-Fusion. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Spaltstelle durchgeführt. Dazu wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem die Aminosäuren an der potentiellen Spaltstelle durch Alanin substituiert wurden. Die Spaltstelle befindet sich an Aminosäureposition 246-249 und es handelt sich um ein tetrabasisches Motiv aus vier Argininen.

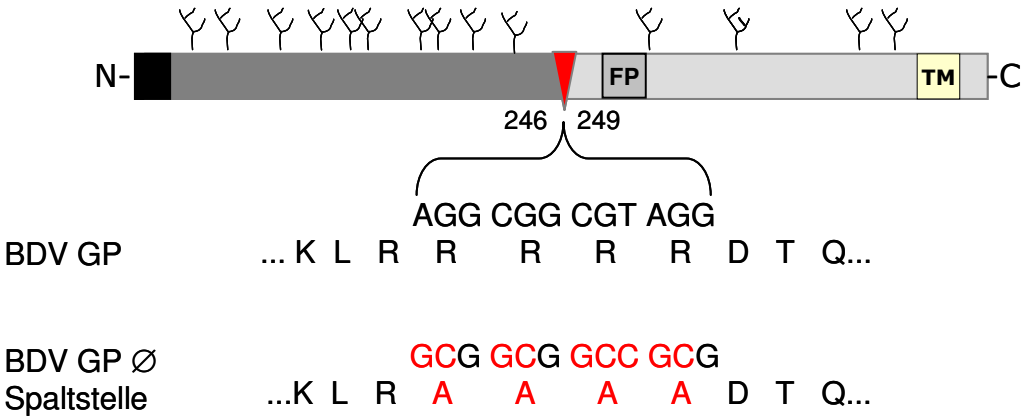


Abb.23: Schematische Darstellung des Aminosäureaustausches an der potentiellen Spaltstelle.

Zur Herstellung dieser Substitutionsmutante wurde der Vektor pCAGGS-ΔIntronI-GP als Ausgangsvektor für die rekombinante PCR verwendet. Für die erste PCR wurden folgende Oligonukleotide kombiniert 1. BSRGI_F und GP_ospa_R, sowie 2. GP_ospa_F und EcoRV_R. Nach der Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente wurden diese in einer

zweiten PCR hybridisiert und anschließend mit den beiden äußeren Oligonukleotiden BSRGI_F und EcoRV_R amplifiziert. Über die Restriktionsschnittstellen für BSRGI und EcoRV wurde das hergestellte Fragment in den Vector pCAGGS-ΔIntronI-GP ligiert. Daraus entstanden ist das neue Plasmid pCAGGS-GPØSpa.

5.6.1 Expression des substituierten Moleküls

Das Plasmid pCAGGS-GPØSpa wurde mit dem Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 in Vero-Zellen transfiziert (4.2.6). Für die spätere Selektion wurde ein zweites Plasmid, der Vektor pIG, kotransfiziert. Die Vero-Zellen wurden in 9cm Zellkulturschalen bis zu einer Dichte von etwa 70% kultiviert und für 8 Stunden mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Nach 48 Stunden wurde Geneticin zur Selektion der transfizierten Zellen in das Medium gegeben. Die entstehenden Einzelzellklone wurden kultiviert und die Expression des veränderten Borna Virus Glykoproteins getestet.

Für den spezifischen Nachweis des Glykoproteins wurden die Zellen in RIPA Puffer lysiert. Das Zelllysat wurde mit SDS Probenpuffer versetzt und 5 Minuten aufgekocht. Anschließend wurden die Proben in einem 10% SDS Gel (4.3.3) aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen (4.3.4) und anschließend zum spezifischen Nachweis der Proteine mit dem Kaninchenserum gegen die C-terminale Untereinheit gefärbt.

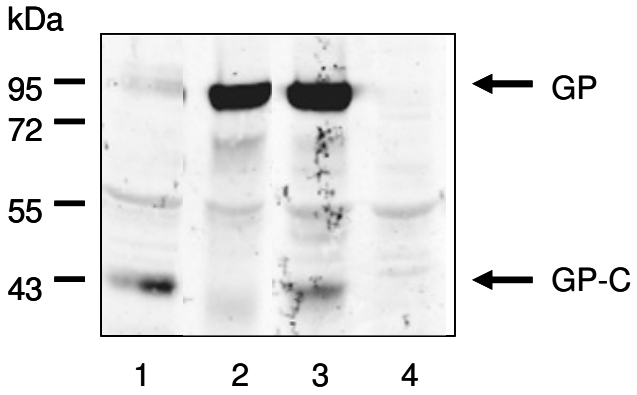


Abb.24: Dargestellt ist ein Immunoblot von Zelllysaten aus (1) BDV infizierter Vero-Zellen, (2) stabil GPØSpa transfizierten Zellen, (3) Vero GP stabilen Zellen und (4) Vero-Zellen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP.

In dem Immunoblot konnte gezeigt werden, dass sowohl im Zelllysat der infizierten Zellen als auch bei der stabilen BDV GP-Zelllinie neben der Bande des Vorläufer-Glykoproteins bei 94 kDa eine deutliche Bande bei 43kDa zu detektieren ist, welche der C-terminalen Untereinheit entspricht. Im Gegensatz dazu ist in der stabilen Zelllinie, welche das Glykoprotein mit der substituierten Spaltstelle enthält, nur das Vorläufer-Glykoprotein bei 94 kDa zu detektieren (Abb. 24). Es kann daher eindeutig gesagt werden, dass das BDV-Glykoprotein an der Aminosäure-Position 246-249 proteolytisch gespalten wird.

5.6.2 Lokalisation des substituierten Moleküls

5.6.2.1 Immunfluoreszenzstudien

Zur Darstellung der intrazellulären Verteilung des ungespaltenen BDV-Glykoproteins wurden die Zellen bei einer Konfluenz von etwa 70% in Methanol/ Aceton fixiert und permeabilisiert. Als Erstantikörper wurde das spezifisch Serum gegen die C-terminale Untereinheit des BDV-Glykoproteins verwendet.

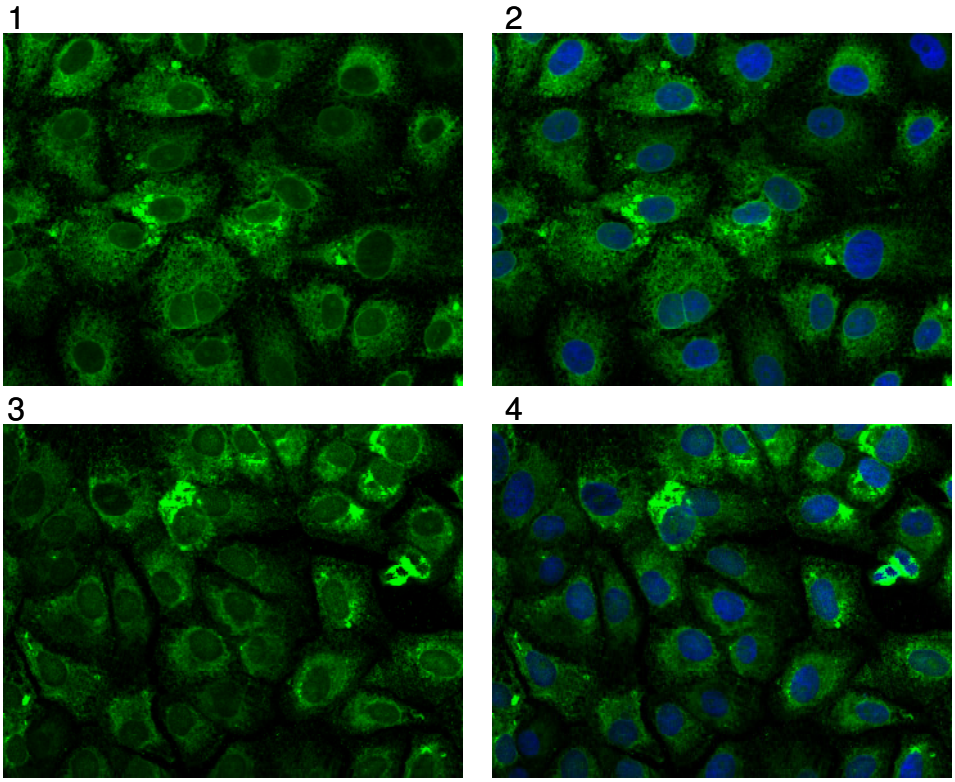


Abb.25: Immunfluoreszenzen nach Fixierung in Methanol/Aceton. Die Zellen wurden mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP inkubiert und als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter Antikörper verwendet. Zur Darstellung der Zellkerne wurde zusätzlich eine DAPI Färbung durchgeführt. Dargestellt ist die intrazelluläre Verteilung des BDV GP in (1 und 2) BDV stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und (3 und 4) stabil GPØSpa transfizierten Zellen.

Die intrazelluläre Lokalisation des Glykoproteins ist in der stabilen Zelllinie, welche die Substitutionsmutante der Spaltstelle des Glykoproteins exprimiert, genauso wie in der Zelllinie welche das wildtyp BDV-Glykoprotein exprimiert (Abb. 25). Sowohl das gespaltene Glykoprotein als auch das ungespaltene verteilt sich in der gesamten Zelle, wobei der Zellkern ausgespart bleibt. Des Weiteren kann auch für die stabile Ziellinie mit dem ungespaltenen Glykoprotein gesagt werden, dass es sich um eine homogene Zelllinie handelt in der alle Zellen das BDV-Glykoprtein exprimieren.

Der Transport des ungespaltenen Glykoproteins zur Oberfläche wurde ebenfalls mittels Immunfluoreszenzen (4.3.8) untersucht. Zum Vergleich dient auch hier die stabile Zelllinie die das BDV-Glykoprotein exprimiert. Hierzu wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät, bei einer Dichte von 60-70% wurden sie in 1%PFA fixiert.

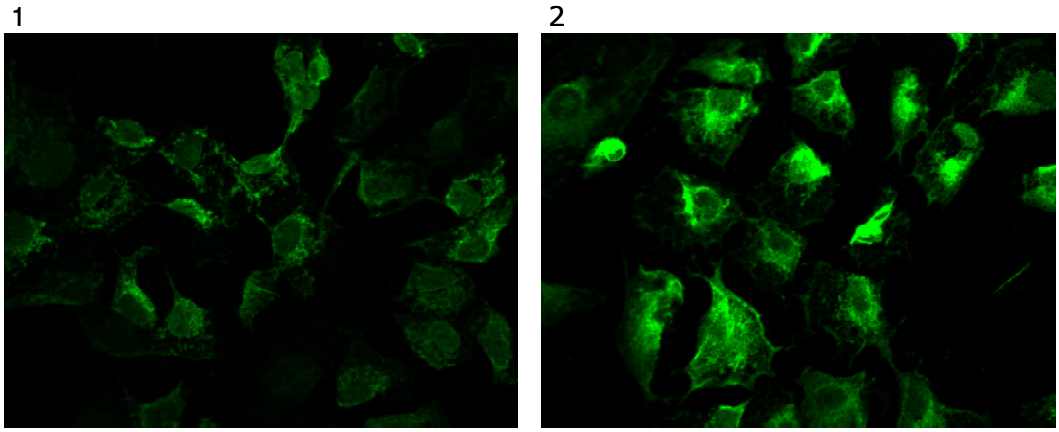


Abb.26: Oberflächen Immunfluoreszenzen nach Fixierung in 1%PFA. Die Zellen wurden mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP inkubiert und als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter Antikörper verwendet. Dargestellt ist die Oberfläche von (1) stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und (2) stabil GPØSpa transfizierten Zellen.

Nach der Fixierung mit PFA wurden die Zellen mit dem Kaninchen-Serum gegen die N-terminale Untereinheit des BDV GP inkubiert. Als Zweitantikörper wurde ein FITC gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Darstellung der Zellen erfolgt mittels Immunfluoreszenzmikroskopie.

Auf beiden Zelllinien ist über die gesamte Zelle eine Grün-Färbung zu erkennen, teilweise sind die Umrisse des Zellkerns zu sehen, daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen teilweise permeabilisiert wurden (Abb. 26). Die Zellausläufer sind deutlich zu erkennen. Nach dieser Untersuchung kann festgehalten werden, dass auch das ungespaltene Glykoprotein genau wie das gespaltene zur Oberfläche transportiert wird. Dieses Ergebnis wird durch die Oberflächenbiotinylierung (5.6.2.2) bestätigt.

5.6.2.2 Oberflächenbiotinylierung des substituierten Moleküls

Um für das Glykoprotein ohne Spaltstelle eine Aussage über die Funktionalität in Bezug auf die Zellfusion treffen zu können, wurde zuerst der korrekte Transport zur Oberfläche untersucht. Für die Oberflächen-Biotinylierung (4.3.2) wurden Zellen in 6cm Schalen ausgesät und bis zur Konfluenz kultiviert, die Zellen wurden in PBS gewaschen und zweimal für mit Sulfo-NHS Biotin behandelt. Nach der Inkubation mit dem Biotinylierungsreagenz wurden die Zellen in PBS gewaschen und in BEP Puffer lysiert. Die Lösung wurde mit Streptavidin-Agarose über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Für den Nachweis der Proteine auf der Zelloberfläche wurden die Agarosekügelchen mit dem gekoppelten Biotin/Protein Komplex in PBS gewaschen und anschließend in Probenpuffer mit Mercaptoethanol aufgenommen, für 10 min bei 95 °C aufgekocht und auf ein10%iges SDS Gel aufgetragen.
Zur Darstellung des BDV-Glykoproteins und seiner Untereinheiten wurde erneut das Kaninchen-Serum gegen die C-terminale Untereinheit verwendet.

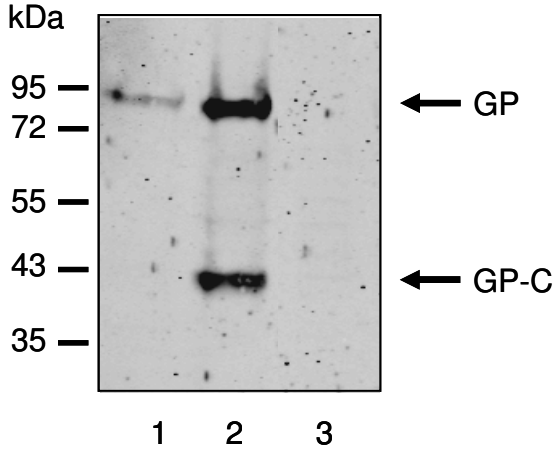


Abb.27: Dargestellt ist ein Immunoblot von Zelllysaten biotinylierter Zelllinien (1) stabil GPØSpa transfizierten Zellen, (2) stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und (3) Vero -Zellen. Gefärbt wurde der Immunoblot mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP.

Das ungespaltene Glykoprotein konnte nach der Oberflächenbiotinylierung auf der Zelloberfläche detektiert werden. Als Kontrolle wurde die stabil transfizierte Zelllinie, welche das BDV GP exprimiert, verwendet. Es ist somit gezeigt worden, dass das ungespaltene GP zur Oberfläche transportiert wird (Abb. 27).

5.6.3 Fusionstest nach Substitution der Spaltstelle

Um eine Aussage treffen zu können, ob das BDV-Glykoprotein nur in gespaltener Form fusionsaktiv ist, wurde die stabile Zelllinie Vero GPØSpa in den im Rahmen dieser Arbeit etablierten Fusionstest (4.2.9) eingesetzt. Dazu wurden die verschiedene Zelllinien Vero stabil GPØSpa, Vero GP stabil, Vero BDV infiziert und Vero-Zellen bis zu einer Dichte von 80-90% kultiviert und mit DMEM pH 4,9 für 10 min inkubiert. Nach den 10 min bei niedrigem pH wurden die Zellen für weitere drei Stunden in DMEM 1% FKS kultiviert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen in Methanol und zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese mit Giemsa gefärbt. Zur Dokumentation wurden Lichtmikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

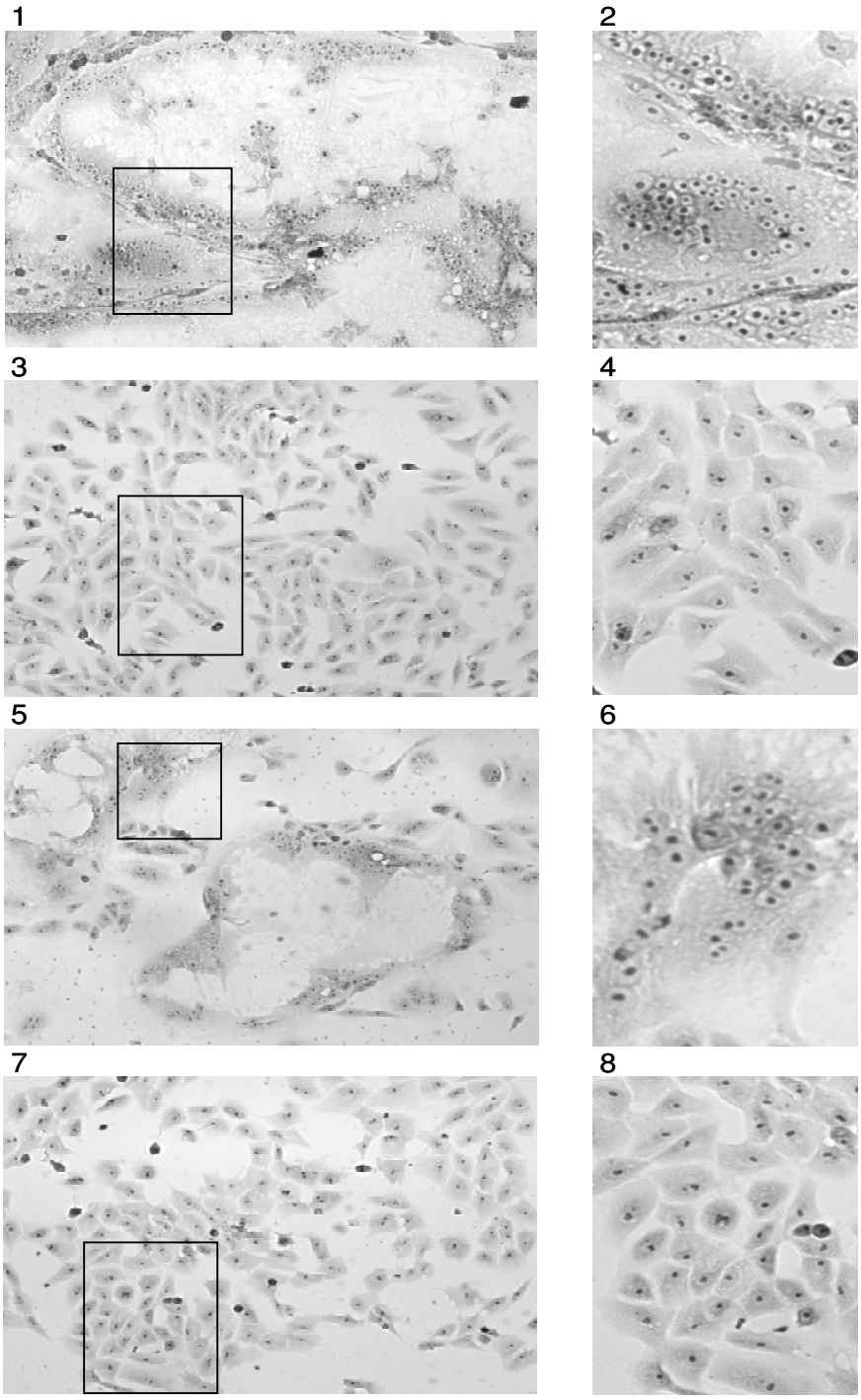
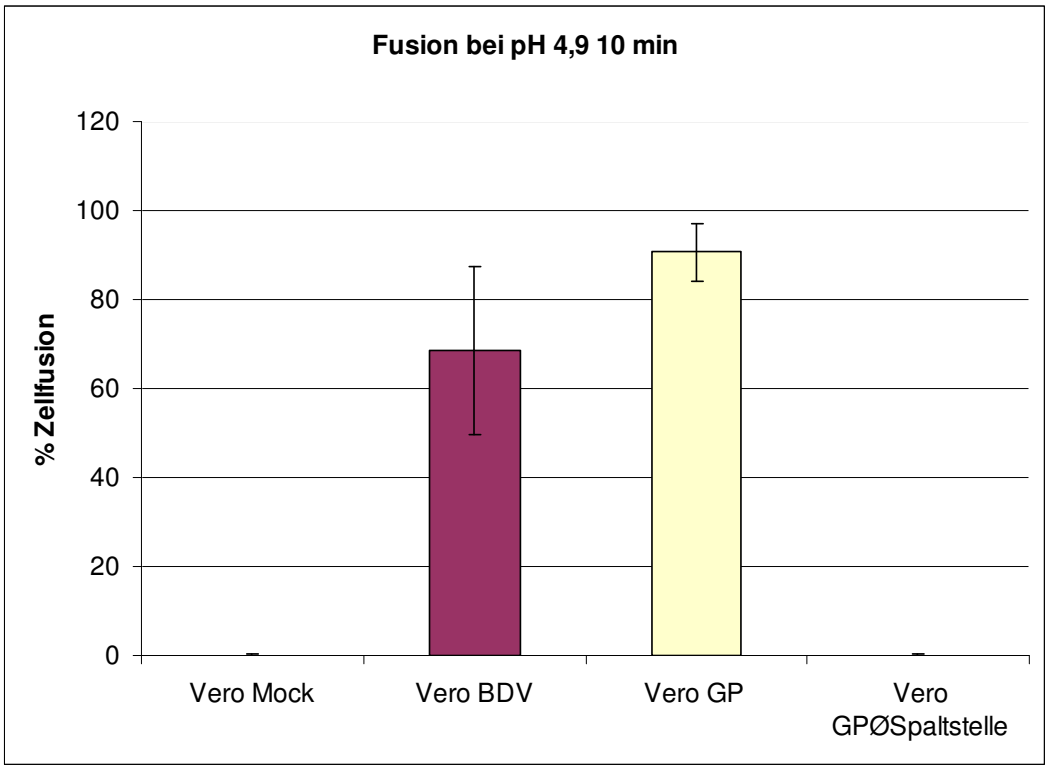


Abb. 28: Gezeigt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt wurden. (1; 2) Bei den stabil GP exprimierende Vero-Zellen sowie den (5; 6) BDV infizierten Vero-Zellen sind deutlich Synzytien zu erkennen. In der Zelllinie mit der Substitution der Spaltstelle (3; 4) zeigen sich wie in den Vero-Zellen (7; 8) keine Polykarien. In der rechten Spalte sind die mit dem Rechteck markierten Bildausschnitte vergrößert dargestellt.

In dem Fusionstest konnte deutlich erkannt werden, dass die BDV infizierten Zellen sowie die stabil BDV-Glykoprotein exprimierende Zelllinie nach Behandlung mit DMEM pH 4,9 viele Synzytien ausbildet. Die Zelllinie mit der substituierten Spaltstelle hingegen weist keinerlei Polykarien auf (Abb. 28). Zur Quantifizierung der Ergebnisse aus dem Fusionstest wurden je fünf Bildausschnitte in Doppelbestimmung ausgezählt. Hierzu wurden alle Zellkerne im Verhältnis zu den Zellkernen in Synzytien gezählt. Die prozentualen Anteile an Kernen in Synzytien wurden grafisch dargestellt (Grafik 2).



Grafik 2: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl. Ausgezählt wurden unbehandelte Vero-Zellen, BDV infizierte Vero-Zellen, stabil GP exprimierende Vero-Zellen, sowie stabil GPØSpa transfizierten Zellen.

In diesem Experiment konnte eindeutig gezeigt werden, dass die Spaltung des Oberflächen-Glykoproteins des BDV essentiell ist für die Fusogenität des Virus. Befindet sich kein gespaltenes GP auf der Oberfläche, sondern nur die ungespaltene Form, findet keine Fusion statt.

5.7 Inhibition der Zellfusion

Zur genaueren Untersuchung der Fusion des BDV GP wurde versucht durch die Blockierung der möglichen Bindungsstelle des Fusionspeptides bzw. durch Blockierung des Fusionspeptides die Zell-Zell-Fusion zu unterbinden oder eine deutliche Reduktion der Fusion zu erreichen.
Hierzu wurden die Zellen für 30 min mit 0,5 mg/ml Heparin vorbehandelt und anschließend einer Behandlung mit Medium pH 4,9 unterzogen. Bei den verwendeten Zelllinien handelte es sich um Vero-Zellen, die Vero BDV GP stabil exprimierende Zelllinie sowie BDV infizierte Vero-Zellen. Diese Zellen wurde in Zellkultur Platten mit 6 Vertiefungen ausgesägt und bis zu einer Dichte von ca. 80% kultiviert. Für diesen Versuch wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS def. gewaschen. Es folgte die Zugabe von 500 µl Heparinlösung. Gelöst wurde das Heparin in DMEM ohne Zusätze. Die Inkubation erfolgte für 30 min bei 37°C. Im Anschluss an die Inkubation wurde das Heparin von den Zellen entfernt und die Zellen für 10 min mit DMEM pH 4,9 bei 37°C behandelt. Nach der Behandlung mit dem niedrigen pH-Wert wurden die Zellen zweimal mit PBS def. gewaschen und in Methanol fixiert. Zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese mit 1:20 verdünntem Giemsa gefärbt und mittels Durchlicht-Mikroskopie dargestellt und dokumentiert.

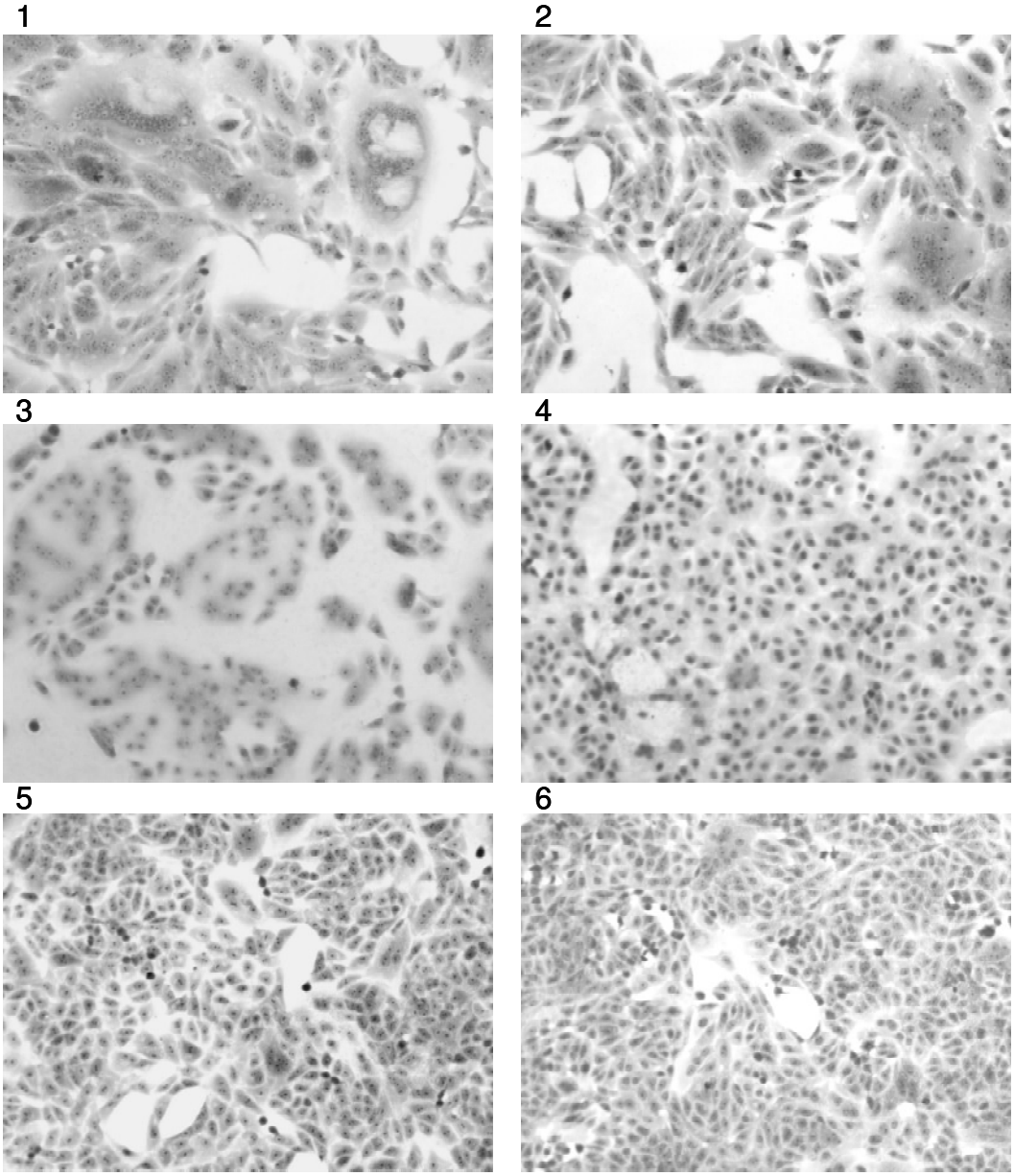
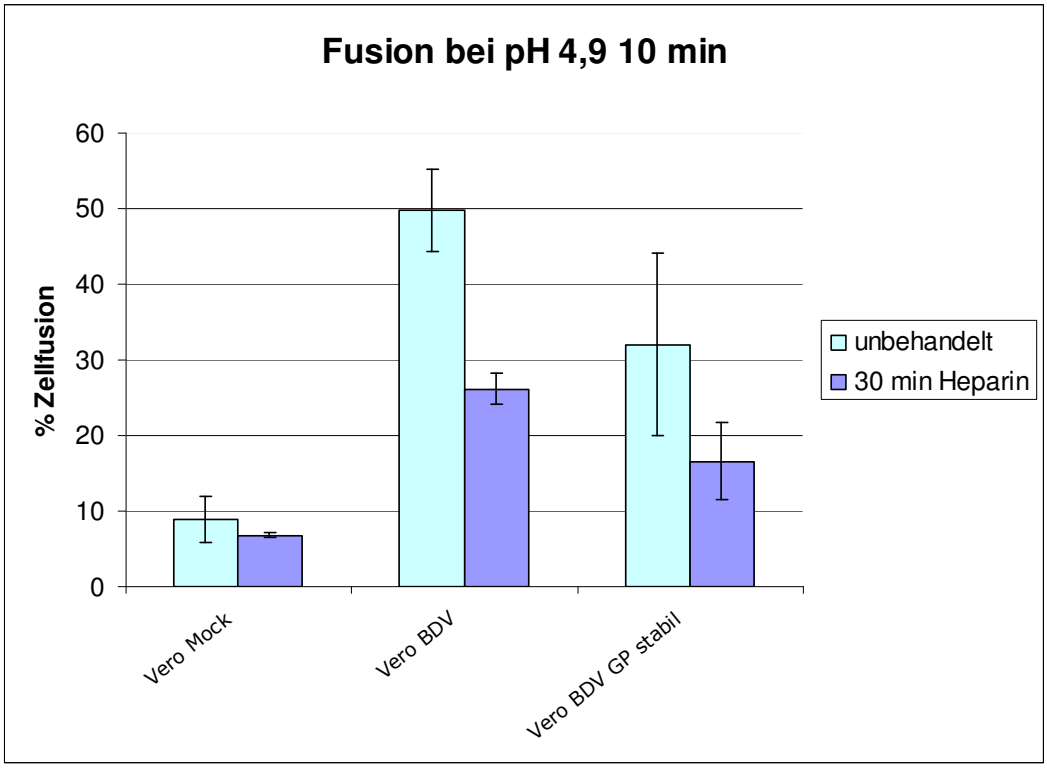


Abb. 29: Dargestellt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 30 min mit 0,5mg/ml Heparin vorinkubiert wurden (2; 4; 6), im Vergleich zu Zellen ohne Vorbehandlung (1; 3; 5). Die Zellen wurden alle 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt. Bei stabil GP exprimierende Vero-Zellen (3) sowie den BDV infizierten Vero-Zellen (1) sind ohne Vorbehandlung deutlich Synzytien zu erkennen. In den Vero-Zellen (5) waren wenige Polykarien zu erkennen. Nach der Behandlung mit Heparin konnte ein deutlicher Rückgang der Polykarien in den BDV infizierten Vero-Zellen (2) und den stabil GP exprimierende Vero-Zellen (4) detektiert werden. Zur Kontrolle dienten Vero-Zellen (6) welche ebenfalls mit Heparin behandelt wurden.

Durch die Behandlung der Zellen mit Heparin konnte ein deutlicher Rückgang der Fusion erreicht werden. Sowohl bei den BDV infizierten als auch bei den Stabil GP exprimierenden Zellen war ein optischer Rückgang der Synzythien zu erkennen (Abb. 29).
Um eine genauere Aussage über die Reduktion der Synzytien treffen zu können, wurden je fünf Bildausschnitte in Doppelbestimmung, wie zuvor beschrieben, ausgezählt und grafisch dargestellt (Grafik 3).



Grafik 3: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl in Zellen, die zuvor mit Heparin behandelt wurden, und unbehandelten Zellen.

Die Anzahl der Kerne in Synzythien bei den unbehandelten infizierten Zellen lag bei 50%. Im Gegensatz dazu konnten nach der Behandlung mit Heparin nur noch 26% der Kerne in Synzythien gezählt werden. Dies entspricht einer Reduktion um 47%.

Für die stabile Zelllinie waren es 32% der Zellkerne in Synzythien ohne die Behandlung mit Heparin, nach der Inkubation mit Heparin waren es nur noch 16% der Kerne. Hier konnte eine Reduktion um 48% gezeigt werden.

5.8 Charakterisierung des Fusionspeptides

Bislang gibt es über ein mögliches Fusionspeptid im Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit und seine genaue Lokalisation noch keine Untersuchungen.

Anhand von Analysen der Aminosäuresequenz des Glykoproteins konnte ein Bereich zwischen Aminosäure 274 und 315 eingegrenzt werden, welcher genauer auf seine fusionsvermittelnden Eigenschaften untersucht werden sollte. Hierzu wurde die Sequenz des BDV-GP mit Sequenzen bekannter Fusionspeptide aus der Literatur verglichen (Abb. 30).

In einem Sequenzvergleich mit dem G Protein des VS Virus und dem SFV E1 Protein sowie dem Ebola Virus Glykoprotein wurden drei Aminosäuren herausgefiltert, die in allen vier Sequenzen in ähnlichen Abständen konserviert vorkommen.

BDV GP	296-GWLNHPDIIGYIVN -309	
VSV G	124- GFPPQSCGYATVTD-137	Zhang et al. 1993
SFV E1	83- GVYPFMWGGAYCFC- 97	
Ebola GP	528-GLAWIPYFGPAAEG -543	Ito et al. 1999
Consensus	g....P...gy.....	

Abb.30: Sequenzvergleich der Glykoproteine des Borna-Virus mit den entsprechenden Proteinen des VS Virus, SFV und Ebola.

Es handelt sich bei den auffälligen Aminosäuren um das Glycin an Position 296 des BDV GP, das Prolin 301 und ein weiteres Glycin an Position 305. Um zu untersuchen, ob diese drei Aminosäuren eine Rolle bei der Fusion des BDV-Glykoproteins spielen, wurden mit Hilfe des „QuikChange Multi Site–Directed Mutagenesis Kit“ (4.1.3.3) die

gewünschten Aminosäuren durch Alanin ersetzt (Abb. 31). Zusätzlich zu den drei konservierten Aminosäuren wurden noch das Isoleucin an Position 304 und Histidin an der Stelle 300 ebenfalls durch Alanin ersetzt, um festzustellen, ob nur einzelne Aminosäuren eine Rolle spielen oder der ganze Bereich essentiell für die fusionsvermittelnden Eigenschaften ist. Des Weiteren wurden Mutanten hergestellt, in der je zwei Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden und eine, in der die beiden Glycine und das Prolin ausgetauscht wurden.

BDV_GP	296-GWLNHPDIIGYIVN-309
BDV_GP-G296A	296-AWLNHPDIIGYIVN-309
BDV_GP-P301A	296-GWLNHADIIGYIVN-309
BDV_GP-G305A	296-GWLNHPDIIAYIVN-309
BDV_GP-G296A,P301A	296-AWLNHADIIGYIVN-309
BDV_GP-G296A, G305A	296-AWLNHPDIIAYIVN-309
BDV_GP-P301A, G305A	296-GWLNHADIIAYIVN-309
BDV_GP-G296A,P301A,G305A	296-AWLNHADIIAYIVN-309
BDV_GP-H300A	296-GWLNAPDIIGYIVN-309
BDV_GP-I 304A	296-GWLNHPDIAGYIVN-309

Abb.31: Schematische Darstellung der gesetzten Mutationen im möglichen Fusionspeptides des BDV-Glykoproteins. A symbolisiert jeweils das Alanin, welches an dieser Stelle für eine Aminosäure eingesetzt wurde.

Als Matrize für die gesamten Klonierungen diente der Vektor pCAGGS-ΔIntronI-GP. Nach erfolgreicher Klonierung (4.1.3) und Sequenzierung (4.1.7) der entstandenen Plasmide wurden diese transient mittels Lipofectamin 2000 in Vero-Zellen transfiziert (4.2.6). Hierzu wurden in Platten mit 6 Vertiefungen Vero-Zellen ausgesät und bis zu einer Dichte von etwa 70% kultiviert. Die Zellen wurden mit 12,5 µg/µl DNA und 25 µl Lipofektamin 2000 transfiziert. Nach der Transfektion von 8 Stunden wurden die Zellen in DMEM Medium mit nur 1% FKS kultiviert, um ein zu

schnelles Wachstum zu verhindern. Nach 48 Stunden wurde je ein Well der transfizierten Zellen für jedes Konstrukt in Probenpuffer geerntet und die Proteine mittels Gelelektrophorese (4.3.3) aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und anschließend in 10% Milchpulver über Nacht abgesättigt. Die spezifische Färbung des BDV GP erfolgte mittels des Kaninchen-Serums gegen die C-terminale Untereinheit.

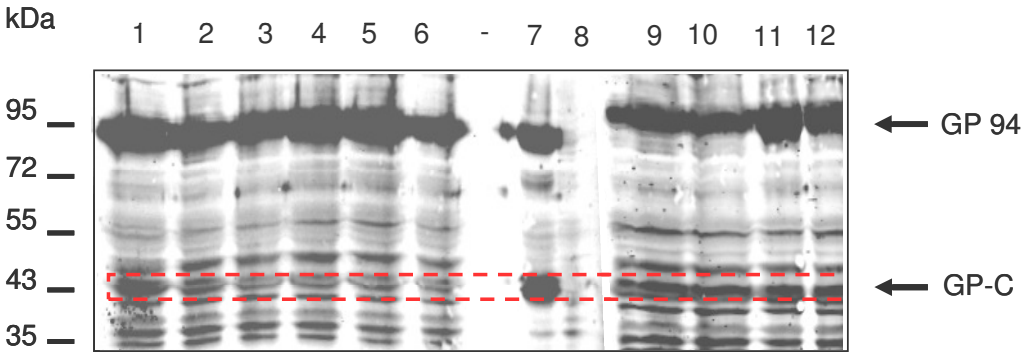
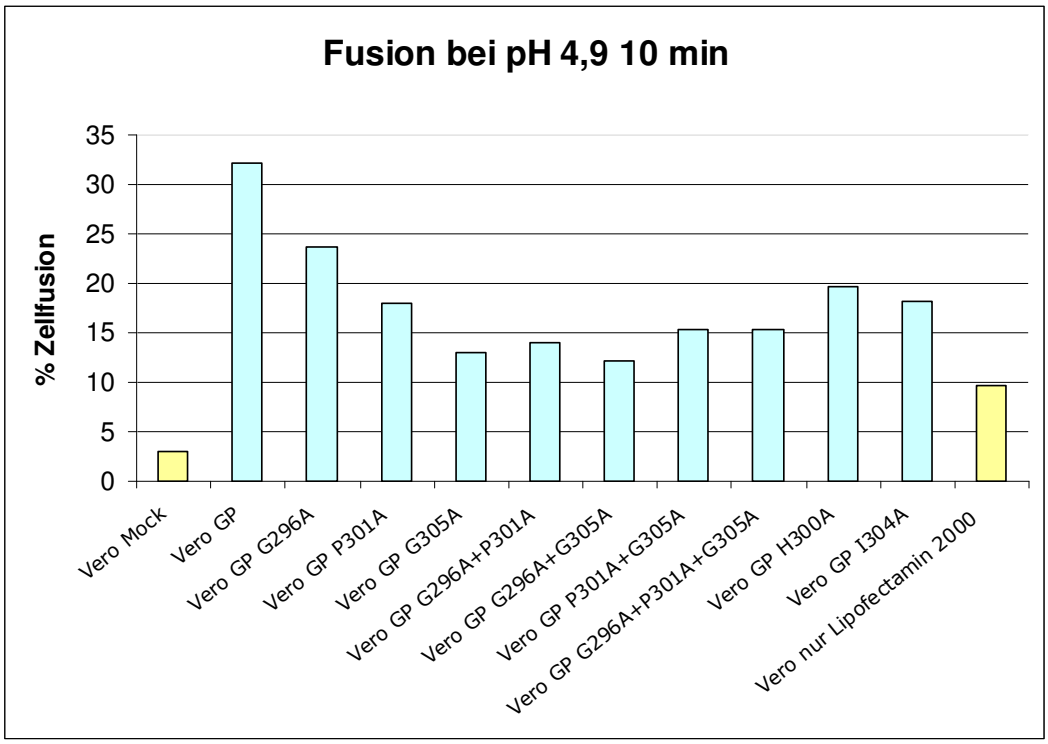


Abb.32: Darstellung der Expression der Substitutionsmutanten im Fusionpeptid. Es konnte gezeigt werden, dass in allen Mutanten das Glykoprotein exprimiert wird und dass auch ein Spaltprodukt zu detektieren ist. Aufgetragen wurden Zelllysate aus transient transfizierten Zellen mit dem Wildtyp BDV GP (1) und den verschiedenen Substitutions-Mutanten GP_G296A (2), GP_P301A (3), GP_G305A (4), GP_H300A (5), GP_I304A (6), GP_G296A + P301A (9), GP_G305A + P301A (10), GP_G296A + G305A (11), GP_G296A + P301A+ G304A (12) sowie das Zelllysat aus der stabil BDV GP exprimierenden Zelllinie (7) und Vero-Zellen (8).

Der Immunoblot zeigte eine starke Expression des Glykoprotein Vorläufers bei 94 kDa und bei 43 kDa war das C-terminale Spaltprodukt deutlich zu erkennen. Jedoch sind Unterschiede bei den einzelnen Mutanten in der Menge an Spaltprodukten zu erkennen, dies kann einen Einfluss auf das Fusionsverhalten haben (Abb. 32). Die Spaltung des Glykoproteins mit den Substitutionen im Fusionspeptid ist essentiell für die weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Fusion. Würde das mutierte Protein nicht korrekt prozessiert, wäre eine Fusion ausgeschlossen. Es konnten erfolgreich funktionelle Glykoprotein-Mutanten in Vero-Zellen exprimiert werden.

Um den Effekt der veränderten Aminosäuren auf die Fusion zu untersuchen, wurden alle Substitutionsmutanten 48 Stunden nach Transfektion dem in dieser Arbeit etablierten Fusionstest unterzogen. Um einen Effekt des Mediums und des Transfektionreagenzes auf die Fusion auszuschließen, wurden als Kontrolle Vero-Zellen mitgeführt, welche einmal nur mit OptiMEM behandelt wurden und zum zweiten Vero- Zellen nach Behandlung mit OptiMEM und Lipfektamin 2000. Die transfizierten Zellen wurden mit DMEM pH 4,9 für 10 min inkubiert. Nach den 10 min bei niedrigem pH-Wert wurden die Zellen für weitere drei Stunden in DMEM 1% FKS kultiviert. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen in Methanol und zur besseren Darstellung der Zellen wurden diese mit Giemsa gefärbt. Zur Dokumentation wurden lichtmikroskopische Aufnahmen durchgeführt.

Es wurden je 10 Bildausschnitte im Lichtmikroskop fotografiert und für die grafische Darstellung ausgezählt. Gezählt wurden alle Kerne im Verhältnis zu den Kernen in Synzythien (Grafik 4). Zur Kontrolle wurden Vero-Zellen einmal nur mit OptiMEM und einmal mit OptiMEM und Lipofektamin 2000 behandelt, um einen Effekt des Mediums und des Transfektionreagenzes auf die Fusion auszuschließen.



Grafik 4: Darstellung des prozentualen Anteils an Zellkernen in Synzytien im Verhältnis zu Gesamtmenge an Zellkernen aller transfiezierten Mutanten, sowie des Wildtyp Glykoproteins, unbehandelten Vero-Zellen und Vero-Zellen, die mit Lipofektamin behandelt wurden. Alle Konstrukte wurden transient in Vero-Zellen transfiziert.

In der Grafik war deutlich zu erkennen, dass keine der Zelllinien mit einer Mutation im möglichen Fusionspeptid des Glykoproteins, eine annähernd so starke Zell-Zell-Fusion zeigt, wie die Zelllinie mit dem Wildtyp-Glykoprotein.

Um diesen Rückgang in Zahlen darzustellen, wurde der prozentuale Anteil der Fusion im Vergleich zu dem wildtypischen GP dargestellt, wenn der Wert für das Wildtyp GP 100% entspricht. Zur deutlicheren Darstellung der Reduktion der Fusion bei den Substitutionsmutanten wurde die prozentuale Abnahme der Fusion im Vergleich zum Wildtyp GP berechnet.

	GP	GP G296A	GP P301A	GP G305A	GP H300A
Prozentualer Anteil fusionierter Zellen	100	73	56	40	61
Prozentuale Abnahme der Fusion	0	27	43	60	39

	GPI304A	GP G296A+P301A	GP G296A+G305A
Prozentualer Anteil fusionierter Zellen	56	44	38
Prozentuale Abnahme der Fusion	44	56	62

	GP P301A+ G305A	GP G296A+P301A+G305A
Prozentualer Anteil fusionierter Zellen	47	48
Prozentuale Abnahme der Fusion	53	52

Tabelle 1: In der ersten Reihe „% Fusion“ ist der prozentualen Anteile der Zellen in Synzytien im Vergleich zu dem wildtypischen Glykoprotein dargestellt, wenn der Wert für das Wildtyp GP 100% entspricht. Die Reihe, prozentuale Abnahme der Fusion, stellt noch mal deutlich die Differenz zwischen dem Wildtyp Glykoprotein und den Mutanten heraus, zu welchem prozentualen Rückgang der Fusion es bei den Mutanten kommt.

Die Tabelle 1 stellt deutlich den Rückgang der Fusion dar. Die Mutante mit der Substitution des Glycin an Aminosäureposition 296 zeigt den geringsten Effekt auf die Fusion mit einem Rückgang der Fusion um lediglich 26%. Die stärkste Auswirkung zeigte sich in der Doppel- Mutante, in welcher die beiden Glycine an Position 296 und 305 gleichzeitig ausgetauscht wurden. In dieser Mutante wurde ein Rückgang der Fusion um 62% gezeigt. Die größte Bedeutung scheint Das Glycin an Position 305 zu haben. Denn bei der Substitutin nur dieser Aminosäure konnte bereits ein Rückgang der Fusion um 60% festgestellt werden. Die Auswirkung der Substitutionen konnte durch den Austausch von zwei oder drei Aminosäuren noch verstärkt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass die Ausgewählten Aminosäuren einen deutlichen Einfluss auf die Zell-Zell-Fusion haben.

6. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit näher charakterisiert. Die Untersuchungen gliederten sich in zwei Teile. Zunächst wurde ein System etabliert, das es ermöglicht, ein funktionelles BDV Glykoprotein in ausreichender Menge solitär zu exprimieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden dann verschiedene funktionelle Domänen, wie Spaltstelle und Fusionspeptid, näher charakterisiert.

6.1 Expression eines funktionellen BDV-Glykoproteins

Die cDNA des 2.8 kd Transkriptes (Schneemann et al, 1995) wurde in gespleißter Form, ohne das Intron I, in den Vektor pCAGGS ligiert. Somit enthält dieses Konstrukt 13 Aminosäure des Matrixproteins, welchen ein Stopp folgt, ein nicht kodierender Bereich und dann der Start des BDV-Glykoproteins. Der Unterschied dieses Konstruktes zu allen vorher verwendeten Systemen liegt darin, dass das „natürliche“ Transkript verwendet wurde. So ist es erstmals gelungen, ein BDV-Glykoprotein vektoriell zu exprimieren, das nach Analysen im Westernblot gespalten vorliegt.

Detektiert werden konnte dies sowohl mit den Antikörpern gegen die C-terminale und auch gegen die N-terminale Untereinheit. Bisher war es nicht möglich, die N-terminale Untereinheit des BDV Glykoproteins ohne Lektinpräzipitation nachzuweisen (Kiermayer *et al*., 2002). Der Grund dafür ist wohl die erhöhte Expressionsrate und sensitivere Nachweismethoden über das *Odyssee infrarot Imaging System*.

Eine mögliche Erklärung für die starke Expression des solitär exprimierten Glykoproteins könnte sein, dass das Primärtranskript dem der gespleißten mRNA des Virus entspricht und so im Kern von dem so genannten Exon-Junktion-Komplex (EJC) als prozessiert erkannt wird und somit ohne Verzögerung direkt nach der Transkription sehr effizient in das Cytoplasma transportiert wird. Der EJC erkennt gespleißte mRNA an dem

Exon-Exon Übergang und bindet 20-24 Nukleotide stromaufwärts an die mRNA. Diese Bindung ist unabhängig von der Sequenz an dieser Stelle. Der EJC besteht aus verschiedenen Spleißfaktoren, Kernexportfaktoren sowie Proteinen, die eine Rolle für die Erkennung bzw. die Rekrutierung an Ribosomen verantwortlich sind. Dies alles führt dazu, dass die mRNA effizienter in das Zytoplasma transportiert wird und dort schneller eine Translation stattfindet (Le Hir *et al.*, 2000).

Alle bisherigen Versuche, ein Glykoprotein vektoriell zu exprimieren, führten nur zu ungespaltenem Protein. Die Spaltung konnte bislang nur in einem rekombinanten VSV-Systemen oder mit Hilfe von Vaccinasystemen gezeigt werden (Gonzalez-Dunia *et al.*, 1997; Richt *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2001), oder in Zelllysaten aus infizierten Zellen. Dabei ist allerdings nicht auszuschließen, dass die anderen Virusproteine die Eigenschaften des BDV Glykoproteins in irgendeiner Form beeinflussen. Ein weiterer Vorteil des solitär exprimierten Glykoproteins liegt darin, dass es in diesem System stärker und schneller exprimiert wird als in den infizierten Zellen. Dies konnte anhand der Expressionskinetik gezeigt werden.

6.2 Vergleichende Studien zwischen infizierten Zellen und stabil BDV exprimierenden Zellen

Um zu zeigen, dass das vektoriell exprimierte Glykoprotein bezüglich der posttranslationalen Modifikation, der Glykosylierung, dem wildtyp Glykoprotein entspricht, wurde es mit dem Glykoprotein aus infizierten Zellen bezüglich der Glykosylierung verglichen. Dies ist ein Maß für den korrekten intrazellularen Transport und für die authentische Faltung des Moleküls. Dazu wurde das BDV-Glykoprotein aus permanent infizierten Zellen ebenso wie das aus den stabil transfizierten Zellen einer Behandlung mit Endoglykosidase H (EndoH) und Peptid-N-Glykosidase F (PNGaseF) unterzogen. Die Behandlung mit EndoH bewirkt eine Abspaltung aller mannosereichen Glykane und PNGaseF spaltet alle N-

glykosidisch gebundenen Zucker. Das ungespaltene Glykoprotein nach vektorieller Expression ist mannosereich glykosyliert. Sowohl EndoH als auch PNGaseF-Inkubation verringern die molekulare Masse auf 57kDa. Das Spaltprodukt GP-C verhält sich anders. Dieses Spaltprodukt wird nach Behandlung mit EndoH unvollständig deglykosyliert GP-C* und zeigt eine molekulare Masse von etwa 35kDa. Nach vollständiger Deglykosylierung mit PNGaseF zeigt das GP-C** eine Größe von etwa 30kDa (Kiermayer, 2002). Die molekulare Masse des N-terminale Spaltfragment sinkt nach PNGaseF Behandlung auf 27 kDa.
Es konnte gezeigt werden, dass die Glykosylierung des vektoriell exprimierten Glykoprotein mit dem Glykoprotein aus infizierten Zellen übereinstimmt. Daraus lässt sich schließen, dass das vektorielle Glykoprotein ebenso wie das Wildtyp Glykoprotein prozessiert wird.

Um mit den stabil Glykoprotein exprimierenden Zellen Studien zum Fusionsverhalten von BDV durchführen zu können, muss das Glykoprotein gespalten auf der Oberfläche vorliegen. Dazu wurde eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt und es konnte eindeutig gezeigt werden, dass sowohl der Vorläufer als auch die C-terminale Untereinheit auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Eine zweite Methode, um zu Überprüfen, ob sich Glykoprotein auf der Oberfläche befindet, ist die Oberflächen- Imunfluoreszenz. Dabei kann allerdings nicht unterschieden werden, ob es sich um das ungespaltene Glykoprotein handelt oder um das Spaltfragment.
Durch die Lokalisation des gespaltenen Glykoproteins auf der Oberfläche konnten die Voraussetzungen für Untersuchungen zum Fusionsverhalten erfüllt werden.

Zur Untersuchung, ob es sich bei der etablierten Zelllinie um eine homogene Zelllinie handelt, wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht, ob alle Zellen das Protein exprimieren. In dem Fall der infizierten Zellen sind nicht alle Zellen positiv und die Intensität der Fluoreszenz und somit der Expression des Glykoprotein schwanken sehr

stark. In der stabil Glykoprotein exprimierenden Zelllinie sind alle Zellen positiv und exprimieren das BDV Glykoprotein relativ gleichmäßig.
Es steht nun erstmals ein System zur Verfügung, welches es erlaubt, Untersuchungen an einem dem Wildtyp entsprechenden Protein durchzuführen.

6.3 Oligomerisierung

Ein weiterer wichtiger Punkt, um den Weg der Infektion eines Virus zu verstehen und die Fusion zu erklären, ist die Bildung von oligomeren Strukturen, die eine Fusion nach Konformationsänderungen bewirken. Die meisten viralen Fusionsproteine bilden trimere Strukturen. Für das BDV-Glykoprotein gibt es noch keine Daten zur Struktur, die z.B. aus Kristalisationuntersuchungen oder sonstigen Strukturanalysen stammen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht eine erste Idee der möglichen oligomeren Formen des BDV Glykoprotein zu erhalten. Dazu wurde das Protein aus der stabil Glykoprotein exprimiernden Zelllinie und aus permanent infizierten Vero-Zellen unter nichtreduzierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Methode wurde für das SARS Coronavirus bereits beschrieben (Song *et al*., 2004). Es konnte dargestellt werden, dass BDV Glykoprotein in höher Molekularen Massen auftritt. Glykoprotein kann auf dem Immunoblot als monomere Form bei 94kDa sowohl für die BDV Infizierten Zellen dargestellt werden als auch für die Glykoprotein stabil exprimierende Zelllinie. Zusätzlich können in der Glykoprotein stabil exprimierende Zelllinie Banden bei 190 kDa und bei 280 kDa beobachtet werden. Dies würde für eine dimere und eine trimere Form des BDV Glykoprotein sprechen. Dass die oligomeren Formen bei dem Glykoprotein aus den infizierten Zellen nicht auftreten, liegt daran, dass die Menge an Glykoprotein zu gering war, um weitere Formen zu detektieren.

Es kann also gefolgert werden, dass auch das BDV-Glykoprotein wie andere virale Proteine, die die Virus-Zell-Fusion vermitteln, als Oligomer vorliegt.

6.4 Fusionsvermittelnde Eigenschaften des BDV-Glykoprotein

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die optimalen Bedingungen für die Zell-Zell-Fusion des BDV-Glykoprotein untersucht. Die optimalen Bedingungen liegen bei pH 4,9 für 10 min. Dieser pH-Wert würde dem späten Endosom während der Infektion entsprechen. Sehr gut untersucht ist die bei Influenzaviren (Skehel & Wiley, 2000). Die Konformationsänderung des Influenza Hämaglutinin (HA), die für eine Fusion notwendig ist, wird durch eine Erniedrigung des pH-Wertes induziert. Für diesen Prozess ist es notwendig, dass die Viren durch rezeptorvermittelte Endozytose in die Zelle aufgenommen werden. Die Ansäuerung der Endosomen löst in den späten Endosomen die Fusion aus.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein alleine für die fusionsvermittelnden Eigenschaften verantwortlich ist. Es werden keine weiteren viralen Komponenten benötigt, um eine Zell-Zell-Fusion auszulösen.

Als nächstes wurde untersucht, inwieweit die Spaltung des Glykoproteins eine Rolle bei der Fusion spielt. Dazu wurde in dem Glykoprotein das tetrabasische Spaltmotiv aus vier Argininen an Aminosäureposition 246-249 durch vier Alanine ersetzt. Dieses Konstrukt wurde stabil in Vero-Zellen transfiziert und ein ungespaltenes Glykoprotein exprimiert. Bisher wurden für das BDV-Glykoprotein drei mögliche Spaltstellen postuliert, wobei aufgrund der Fragmentgrößen nur die Position 246-249 in Frage kam (Richt *et al.*, 1998). Nachdem gezeigt werden konnte, dass das ungespaltene Glykoprotein an die Oberfläche transportiert wurde, konnte es in dem etablierten Fusions-Versuch eingesetzt werden. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass ein ungespaltenes Glykoprotein auf der

Oberfläche nicht in der Lage ist Fusion zu vermitteln, wie dies zu erwarten war. Dies entspricht den Veröffentlichungen, dass Proteine mit Fusions-vermittelnden Eigenschaften im Allgemeinen erst proteolytisch aktiviert werden müssen, damit das Fusionspeptid freigelegt wird (White *et al.,* 1990).

Aus diesem Grund war es auch mit den diversen Expressionssystemen für das BDV-Glykoprotein bislang nicht möglich, eine Fusion zu erreichen, da das Protein nicht gespalten vorlag. Des Weitern kann in dieser Arbeit ganz klar bestätigt werden, dass die genutzte Spaltstelle von BDV-Glykoprotein das tetrabasische Spaltmotiv an Aminosäureposition 246-249 ist. Die erhöhte Fusionsaktivität der Glykoprotein stabil exprimierenden Zelllinie gegenüber den infizierten Zellen liegt wahrscheinlich an der erhöhten Expressionsrate des Glykoprotein und dem effizienteren Transport an die Oberfläche. Auch spielt es eine wichtige Rolle, dass in der stabilen Zellline alle Zellen das BDV Glykoprotein exprimieren und nicht wie bei den infizierten nur ein Teil der Zellen das Glykoprotein exprimiert und zur Oberfläche transportieren. In einer Publikationen (Eickmann *et al*., 2005) konnte gezeigt werden, dass das Glykoprotein im ER von infizierten Zellen reteniert wird und somit nur wenig an die Oberfläche gelangt.

6.5 Inhibition der Fusion

In dieser Arbeit wurde versucht die Fusion mit Hilfe von in Medium gelöstem Heparin zu inhibieren. Gezeigt werden konnte die inhibierende Wirkung von Hparin auf die Virus-Zell-Fusion bereits für das Murine Leukemia Virus (Jinno-Oue *et al*., 2001). Für diese Versuche wurde die spezielle Variante PVC-211, eine neuropathogene Variante des Virus, verwendet. Es verursacht neurodegenerative Krankheiten bei Nagern. Hier wurde beschrieben, dass eine Konzentration des Heparin von mehr als 0,3mg/ml zu einen inhibitorischen Effekt aufweist. In dieser Arbeit wurde eine Heparin Konzentration von 0,5 mg/ml verwendet, um die Fusion zu inhibieren. Der Rückgang der Kerne in Synzytien lag bei den

infizierten Zellen ebenso wie bei der stabil Glykoprotein exprimierenden Zelllinie bei fast 50%. Es konnte also dargestellt werden, dass es möglich ist, durch Heparin eine Zell-Zell-Fusion partiell zu inhibieren. Es gibt zwei Möglichkeiten, über die das Heparin diese inhibierende Wirkung erreichen kann. Zum ersten kann es den Rezeptor bzw. die Bindestelle auf der Zielzelle blockieren oder zum zweiten es bindet direkt an das Fusionspeptid des Glykoproteins und verhindert somit die Anlagerung des Proteins an die Membran bzw. verhindert, dass das Protein seine Konformation so ändern kann, wie es für die Fusion notwendig wäre. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkungsweise des Heparins in Bezug auf das Borna Glykoprotein nicht weiter untersucht.

6.6 Charakterisierung des Fusionspeptides

Um eine Aussage über ein mögliches internes Fusionspeptid bei BDV treffen zu können, wurde die Sequenz der postulierten hydrophoben Domäne (Richt *et al*., 1998) im N-terminalen Bereich (Aminosäure 274 und Aminosäure 315) der C-terminalen Untereinheit des BDV-Glykoprotein genauer betrachtet.

Für das Lassa-Virus wurde ein starker Effekt von Substitutionen einzelner Aminosäuren in den Fusionspeptidsegmenten festgestellt (Klewitz *et al*., 2007). In dieser Untersuchung wurde eine Reihe von Aminosäuren in den beiden postulierten Fusionspeptidsegmenten durch Alanin ausgetauscht. Es zeigten sich unterschiedliche Gründe, weshalb die Fusogenität dieser Substitutionsmutanten reduziert wurde bzw. komplett verloren ging. Ein Teil der Mutanten zeigte eine Beeinträchtigung der Reifespaltung oder sie wurden nicht zur Zelloberfläche transportiert. Insgesamt waren die fusionsaktiven Domänen sehr sensitiv gegenüber Mutationen. Zwei Mutanten in dem N-terminalen Fusionspeptidsegment und acht im internen Fusionspeptidsegment zeigten trotz wildtypischer Reifespaltung und einem Transport zur Zelloberfläche eine Beeinträchtigung der Fusion. Glyzin-Reste schienen eine besonders wichtige Rolle beim

Fusionsprozess zu spielen. Dies konnte auch schon für Influenza-Virus HA2 gezeigt werden (Gething *et al.*, 1986). Auch für das mögliche Fusionspeptid des Borna Virus Glykoproteins wurden die stärksten Effekte von Substitutionen beobachtet, wenn mindestens ein Glycin ausgetauscht wurde.

Um das Fusionspeptid des Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit zu lokalisieren und näher zu charakterisieren, wurden Sequenzvergleiche mit Fusionsproteinen von VSV G, SFV E1 (Zhang *et al.*, 1994) und Ebola-Virus-Glykoprotein (Ito *et al.*, 1999) durchgeführt. Auffällig war dabei, dass bei allen vier Proteinen die Aminosäuren Glycin, Prolin und noch mal Glycin in ähnlichen Abständen auftreten. Von Zhang *et al.*, 1994 wurde beschrieben, dass die Substitutionen der Aminosäure Glycin-124 zu Alanin und Prolin-127 zu Glycin bzw. Leucin einen deutlichen Rückgang der Fusion bei VSV im Fusionstest bewirkte. Für Ebola-Virus Glykoprotein wurde gezeigt, dass die Substitutionsmutante G528A nur zu einer geringen Abnahme der Infektiosität des Rekombinanten VSV∆G-Ebola-Virus Glykoprotein führt (Ito *et al.*, 1999). Der Austausch des Prolin 533 zu Alanin und des Glycin 536 ebenfalls zu Alanin zeigten eine deutlich Reduktion der infektiosität bzw. im Falle von G536A ein fast komplette Inhibition der Infektion. Aber auch alle anderen Substitutionen in dem betreffenden Bereich des Ebola-Virus Glykoprotein zeigen eine starke Reduzierung der Infektiosität bzw. eine völlige Inhibition. Dieses Ergebnis konnte auch für das Borna Glykoprotein beobachtet werden. Das Glycin an Position 296, welches durch Alanin substituiert wurde und dem G528A des Ebola-Virus Glykoprotein in der Sequenzabfolge entsprechen könnte, hat ebenfalls den geringsten Einfluss auf die Fusion. Mit dieser Mutation wurde nur eine Reduktion der Fusion um 26% erwirkt. Den stärksten Effekt aller Einzelsubstitutionen im BDV-Glykoprotein hatte die Substitution des Glycin an Position 305 durch Alanin. Hier wurde eine Reduktion der Fusion um 62% beobachtet. Auch dieses Ergebnis stimmt mit den Daten aus der Untersuchung an Ebola-Virus-Glykoprotein überein. Hier zeigte sich eine komplette Inhibition der Infektiosität bei der Substitution des G536. Alle anderen Substitutionen, die in dem Bereich des potentiellen Fusionspeptides gesetzt wurden,

haben ebenfalls eine reduzierende Wirkung (39 und 44%). Des Weiteren wurde versucht die Fusionsaktivität durch die Substitution von zwei oder drei Aminosäuren noch weiter zu erhöhen. Den stärksten Effekt hatte hier die Doppelsubstitution von G296A und G305A. Mit dieser Kombination wurde eine Reduktion der Fusion um 62% erreicht. Für die anderen Mehrfachsubstitutionen lag der Rückgang der Fusion zwischen 52% und 57%, was ebenfalls ein stärkerer Rückgang war als bei den Substitutionen von nur einer Aminosäure. Ausgenommen ist hier die Substitution des G305A, welche einen stärkeren Rückgang bewirkte. Es scheint eine Rolle zu spielen, wie viele und auch welche Kombination aus Aminosäure substituiert werden.

Kritisch zu betrachten war die Tatsache, dass die Substitutionsmutanten zwar in großen Mengen exprimiert wurden und auch alle gespalten vorlagen, jedoch konnte ein Unterschied in der Menge des gespaltenen Proteins detektiert werden. Es wäre also möglich, dass die Mutanten, welche weniger Spaltprodukt aufweisen auch automatisch weniger Fusion zeigen können, da weniger fusionsaktives Protein auf der Oberfläche vorhanden ist. Dies traf jedoch nicht zu, da die stärkste Reduktion von 62% bei der Mutante mit der Doppelsubstitution G296A und G305A aufgetreten ist, welche eine sehr starke Spaltung gezeigt hat. Die Reduktion der Fusion ist also unabhängig von der Menge an Spaltprodukt.

Es kann daher gefolgert werden, dass der Bereich von Aminosäure 296-305 einen Einfluß auf das Fusionsverhalten des BDV Glykoprotein hat und somit wohl auch das Fusionspeptid in diesem Bereich liegt. In weiteren Studien müssten nun noch andere Mutationen in dem Bereich gesetzt werden und auch der Bereich vor Aminosäure 296 und nach Aminosäure 305 müssten noch genauer betrachtet werden, um das Fusionspeptid genau charakterisieren zu können. Auch sind Untersuchungen zur Struktur nötig, um eine endgültige Aussage über den Typ des Fusionsproteins machen zu können.

6.7 Resümee

Aufgrund der Daten aus dieser Arbeit kann bestätigt werden, dass das BDV-Glykoprotein an der Aminosäureposition 246-249 durch die Endoprotease Furin gespalten wird.
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das BDV-Glykoprotein neben seiner monomeren Form auch noch höhere oligomere Formen bildet. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um Dimere und Trimere.
Auch konnte gezeigt werden, dass die Spaltung essentiell für die fusionsvermittelnden Eigenschaften des BDV-Glykoprotein ist. Ein nicht gespaltenes Glykoprotein kann keine Fusion mehr vermitteln. Deutlich geworden ist, dass das Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit alleine für die Fusogenität des Virus verantwortlich ist, da keine weiteren viralen Bestandteile benötigt werden, um eine Zell-Zell-Fusion auszulösen. Der optimale pH-Wert für eine Zell-Zell-Fusion liegt bei pH 4,9, was in einem natürlichen System dem späten Endosom entsprechen würde. Eine Behandlung mit löslichem Heparin kann die Fusion und damit auch die Infektion reduzieren.
Als Fusionspeptid für Borna Glykoprotein kann ein Bereich zwischen Aminosäure 274-315 angenommen werden, wobei der Bereich von Aminosäure 296-305 in dieser Arbeit genauer betrachtet wurde und jede Änderung in diesem Bereich zu einer Reduktion in der Fusion führt.

7. ZUSAMMENFASSUNG

7.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit ist es gelungen, ein Expressionssystem für das BDV-Glykoprotein zu etablieren, welches ein solitäres BDV-Glykoprotein hervorbringt, das vollständig funktionell ist und in allen seinen Eigenschaften denen des Wildtyp-Glykoproteins entspricht. Es wird ebenso wie das Wildtyp-Glykoprotein an Aminosäure-Position 246-249 durch Furin gespalten. Der Transport zur Oberfläche und die damit verbundene Glykosylierung entsprechen der des natürlichen Glykoproteins. Somit konnten nun alle weiteren Untersuchungen an einem vektoriell exprimierten Glykoprotein durchgeführt werden, welches dem aus infizierten Zellen entspricht.

Da bekannt ist, dass viele Proteine, die an der Zellfusion beteiligt sind, meist als Dimere oder Trimere vorliegen, wurde hier dieses auch für BDV untersucht. Dargestellt werden konnten höher oligomere Formen des BDV-Glykoproteins, wobei es sich wahrscheinlich um dimere und trimere Formen des BDV-Glykoproteins handelt.

Mit Hilfe des Expressionssystems konnte gezeigt werden, dass das BDV-Glykoprotein alleine in der Lage ist, nach einer Erniedrigung des pH-Werts eine Zell-Zell-Fusion zu vermitteln. Essentiell für die Fusion ist, dass das BDV-Glykoprotein gespalten vorliegt. Die erhöhte Fusionsaktivität der stabil Glykoprotein exprimierenden Zelllinie gegenüber infizierten Zellen liegt wahrscheinlich an der erhöhten Expressionsrate und dem effizienteren Transport an die Oberflächen.

Eine Inhibition der Fusion um 50% konnte durch eine Behandlung der Zellen mit gelöstem Heparin erreicht werden, bevor der pH-Wert herabgesetzt wurde.

Durch Substitutions-Mutationen konnte gezeigt werden, dass der Aminosäurebereich 296-305 in der C-terminalen Untereinheit des BDV-Glykoprotein eine wichtige Rolle bei der Fusion spielt. Es kann daher gesagt werden, dass ein Fusionspeptid in diesem Bereich des BDV-Glykoprotein liegt. Für eine genauere Charakterisierung sind weitere Untersuchungen nötig.

7.2. Summary

In this thesis it was succeeded to establish an expression system for BDV-glycoprotein. This system yielded a BDV-glycoprotein, which correlates with the wild type glycoprotein in all characteristics. It is cloven at Amino acid position 246-249 by Furin. The transport to the cell surface and the therewith associated glycosylation conform to the natural glycoprotein. Therefore, it was possible to make the further analysis with the help of a vectorialy expressed glycoprotein, which complies with the glycoprotein of infected cells.

As it is fact, that many proteins which are involved in cell fusion are dimmers or trimers, so this was investigated for the BDV-glycoprotein, too. Superior, oligomeric forms of the BDV glycoprotein could be demonstrated, in all probability, dimers and trimers of this protein.

By means of this new expression system it was possible to show, that the BDV glycoprotein is able to arrange the cell-cell-fusion on its own after the subsidence of the pH-value. For this reaction it is essential that the BDV-glycoprotein has been cloven before. Compared to the amount in infected cells, the increased fusion activity of BDV-glycoprotein stable cell line could be explained by the higher expression level and the more efficient transport to the cell surface.

An inhibition of the fusion of about 50% could be attained by the treatment of the cells with Heparin before lowering the pH-value.

Through substitution in the amino acid region 296-305 in the c-terminal subunit of BDV-glycoprotein it could be shown that this region plays an important role during the fusion process. As a conclusion it can be stated, that the fusion peptide is located in this domain. In order to precisely characterise the fusion peptide, further investigations have to be carried out.

8. LITERATURVERZEICHNIS

Bajramovic JJ, Münter S, Syan S, Nehrbass U, Brahic M, Gonzalez-Dunia D. (2003)
Borna disease virus glycoprotein is required for viral dissemination in neurons.
J Virol. 77(22):12222-31

Bautista, J.R., S.A. Rubin, T.H. Moran, G.J. Schwartz und K.M. Carbone. (1995)
Developmental injury to the cerebellum following perinatal Borna disease virus infection.
Brain Res Dev Brain Res. 90:45-53.

Becht, H., und J. Richt. (1996)
Borna Disease. Pages M.C. Horzinek, Ed. Virus Infection of Vertebrates.
Elsevier, Amsterdam. 235-244.

Birnboim, H.C. und J. Doly (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acid Res 24: 1513-23

Briese, T., A. Schneemann, A.J. Lewis, Y.S. Park, S. Kim, H. Ludwig und W.I. Lipkin. (1994)
Genomic organization of Borna disease virus.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91:4362-4366.

Briese, T., J.C. de la Torre, A. Lewis, H. Ludwig und W. I. Lipkin. (1992)
Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 89:11486-11489.

Clemente R, de la Torre JC. (2007)
Cell-to-cell spread of Borna disease virus proceeds in the absence of the virus primary receptor and furin-mediated processing of the virus surface glycoprotein.
J Virol. 81(11):5968-77.

Creighton, T.E. (1997)
Protein Structure, Practical approach series,
Oxford University Press, 2nd edition.

Cubitt, B., C. Oldstone und J.C. de la Torre. (1994a)
Sequence and genome organization of Borna disease virus.
J Virol. 68:1382-1396.

Cubitt, B., C. Oldstone, J. Valcarcel und J.C. de la Torre. (1994b)
RNA splicing contributes to the generation of mature mRNAs of Borna disease virus, a non-segmented negative strand RNA virus. Virus Res. 34:69-79.

Cubitt, B., und J.C. de la Torre. (1994c)
Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious BDV ribonucleoproteins are present. J Virol. 68:1371-1381.

Cubitt, B., C. Ly und J.C. de la Torre. (2001)
Identification and characterization of a new intron in Borna disease virus.
J Gen Virol.-82:641-646.

de la Torre, J.C., K.M. Carbone und W.I. Lipkin. (1990)
Molecular characterization of the Borna disease agent.
Virology. 179:853-856.

de la Torre J.C. (1994)
Molecular biology of Borna disease virus: prototype of a new group of animal viruses.
J Virol. 68:-7669-7675

Dietrich, D.E., M. Schedlowski, L. Bode, H. Ludwig und H.M. Emrich. (1998)
A viro-psycho-immunological disease-model of a subtype affective disorder.
Pharmacopsychiatry. 31:77-82.

Eickmann M, Kiermayer S, Kraus I, Gössl M, Richt JA, Garten W (2005).
Maturation of Borna disease virus glycoprotein.
FEBS Lett. 29;579(21):4751-6.

Gething MJ, Doms RW, York D, White J. (1986)
Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus.
J Cell Biol. 102(1):11-23.

Gonzalez-Dunia, D., B. Cubitt, F.A. Grasser und J.C. de la Torre.(1997)
Characterization of Borna disease virus p56 protein, a surface glycoprotein involved in virus entry.
J Virol. 71:3208-3218.

Gonzalez-Dunia, D., B. Cubitt und J.C. de la Torre (1998)
Mechanism of Borna disease virus entry into cells.
J Virol 72:783-8

Gosztonyi, G., und H. Ludwig. (1984)
Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals.
Acta Neuropathol (Berl). 64:213-221.

Grabner, A., und A. Fischer. (1991)
Symptomatology and diagnosis of Borna encephalitis of horses. A case analysis of the last 13 years.
Tierarztl Prax. 19:68-73

Hausmann, J., K. Schamel und P. Staeheli. (2001)
CD8(+) T lymphocytes mediate Borna disease virus-induced immunopathology independently of perforin.
J Virol. 75:10460-10466.

Herzog S, Rott R. (1980)
Replication of Borna disease virus in cell cultures.
Med Microbiol Immunol (Berl). 1980;168(3):153-8.

Herzog, S., K. Wonigeit, K. Frese, H.J. Hedrich und R. Rott. (1985)
Effect of Borna disease virus infection on athymic rats.
J Gen Virol. 66:503-508.

Higuchi R., Krummel B. und Saiki RK. (1988)
A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions.
Nucleic Acids Res. 16(15):7351-67

Hilbe M, Herrsche R, Kolodziejek J, Nowotny N, Zlinszky K, Ehrensperger F. (2006)
Shrews as reservoir hosts of borna disease virus.
Emerg Infect Dis 12(4):675-7.

Ito H, Watanabe S, Sanchez A, Whitt MA, Kawaoka Y. (1999)
Mutational analysis of the putative fusion domain of Ebola virus glycoprotein.
J Virol. 73(10):8907-12.

Jinno-Oue A, Oue M, Ruscetti SK (2001)
A unique heparin-binding domain in the envelope protein of the neuropathogenic PVC-211 murine leukemia virus may contribute to its brain capillary endothelial cell tropism.
J Virol. 75(24):12439-45.

Kiermayer, S., Kraus, I., Richt, J.A., Garten, W. und Eickmann, M. (2002)
Identification of the amino terminal subunit of the glycoprotein of Borna disease virus.
FEBS Lett 531:255-8

Klewitz C, Klenk HD, ter Meulen J. (2007)
Amino acids from both N-terminal hydrophobic regions of the Lassa virus envelope glycoprotein GP-2 are critical for pH-dependent membrane fusion and infectivity.
J Gen Virol. 88(Pt 8):2320-8.

Kliche, S., T. Briese, A.H. Henschen, L. Stitz und W.I. Lipkin. (1994)
Characterization of a Borna disease virus glycoprotein, gp18.
J Virol. 68:6918-6923.

Kohno, T., T. Goto, T. Takasaki, C. Morita, T. Nakaya, K. Ikuta, I. Kurane, K. Sano und M. Nakai. (1999)
Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus.
J Virol. 73:760-766.

Kraus, I., M. Eickmann, S. Kiermayer, H. Scheffczik, M. Fluess, J.A. Richt und W. Garten W. (2001)
Open reading frame III of borna disease virus encodes a nonglycosylated matrix protein.
J Virol. 75:12098-12104.

Kraus I, Bogner E, Lilie H, Eickmann M, Garten W. (2005)
Oligomerization and assembly of the matrix protein of Borna disease virus.
FEBS Lett. 9;579(12):2686-92.

Kyhse-Andersen, J. (1984).
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J Biochem Biophys Methods. 10:203-209.

Laemmli, U.K. (1970).
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature. 227:680-685.

Le Hir H, Moore MJ, Maquat LE. (2000)
Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions.
Genes Dev. 1;14(9):1098-108

Ludwig, T.H., H. Becht und L. Groh. (1973)
Borna disease (BD), a slow virus infection. Biological properties of the virus.
Med Microbiol Immunol (Berl). 158:275-289.

Ludwig, H., W. Kraft, M. Kao, G. Gosztonyi, E. Dahme und H. Krey. (1985)
Borna virus infection (Borna disease) in naturally and experimentally infected animals: its significance for research and practice.
Tierarztl Prax. 13:421-453

Malik, T.H., M. Kishi und P.K. Lai. (2000)
Characterization of the P protein-binding domain on the 10-kilodalton protein of Borna disease virus.
J Virol. 74:3413-3417.

Mayr A, Danner K. (1972)
Production of Borna virus in tissue culture.
Proc Soc Exp Biol Med. 1972 Jun;140(2):511-5.

Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. (1983a)
Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities.
J Infect Dis. 148(2):305-15.

Narayan O, Herzog S, Frese K, Scheefers H, Rott R. (1983b)
Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain.
Science. 24;220(4604):1401-3.

Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J.(1991)
Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.
Gene. 15;108(2):193-9

Nowotny, N., J. Kolodziejek, C.O. Jehle, A. Suchy, P. Staeheli und M. Schwemmle. (2000).
Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus.
J Virol. 74:5655-6658

Perez, M., M. Watanabe, M.A. Whitt und J.C. de la Torre (2001)
N-terminal domain of Borna diseas virus G (p56) protein is sufficient for virus receptor recognition and cell entry.
J Virol 75: 7078-85

Richt JA, VandeWoude S, Zink MC, Clements JE, Herzog S, Stitz L, Rott R, Narayan O. (1992a)
Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent.
Clin Infect Dis.;14(6):1240-50.

Richt JA, Stitz L. (1992b)
Borna disease virus-infected astrocytes function in vitro as antigen-presenting and target cells for virus-specific CD4-bearing lymphocytes.
Arch Virol. 124(1-2):95-109.

Richt, J.A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter,K., und Herzog, S. (1997)
Borna desease virus infection in animals and humans.
Emerg Infect Dis 3:343-52

Richt, J.A.; T. Fürbringer, A. Koch, I. Pfeuffer, C. Herden, I. Bause-Niedrig und W. Garten. (1998)
Processing of the Borna disease virus glycoprotein gp94 by the subtilisin-like endoprotease furin.
J Virol. 72:4528-4533.

Rott R, Herzog S, Fleischer B, Winokur A, Amsterdam J, Dyson W, Koprowski H (1985)
Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders.
Science. 1985 May 10;228(4700):755-6

Sambrook, J., E.F. Fritsch und T. Maniatis. (1989)
Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., S. Nicklen und A.R. Coulson. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A. 74:5463-5467.

Sauder C, Staeheli P. (2003)
Rat model of borna disease virus transmission: epidemiological implications.
J Virol. 77(23):12886-90.

Schneemann, A., P.A. Schneider, S. Kim und W.I. Lipkin.(1994)
Identification of signal sequences that control transcription of borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus.
J Virol. 68:6514-6522.

Schneemann A, Schneider PA, Lipkin WI. (1995)
The atypical strategies used for gene expression of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus.
Uirusu. 45(2):165-74.

Schneider, P.A., C.G. Hatalski, A.J. Lewis und W.I. Lipkin. (1997a)
Biochemical and functional analysis of the Borna disease virus G protein.
J Virol. 71:331-336.

Schneider, P.A., R. Kim und W.I. Lipkin. (1997b)
Evidence for translation of the Borna disease virus G protein by leaky ribosomal scanning and ribosomal reinitiation.
J Virol. 71:5614-5619

Schutz-Geschwender A., Yonghong Zhang, Todd Holt, Dayle McDermitt, and D. Michael Olive (2004)
Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence
LI-COR Biosciences, Lincoln, Nebraska 68504

Schwemmle, M., M. Salvatore, L. Shi, J.A. Richt, C.H. Lee und W.I. Lipkin. (1998)
Interactions of the Borna disease virus P, N, and X proteins and their functional implications.
J Biol Chem. 273:9007-9012.

Schwemmle, M. (1999a)
Progress and controversy in Bornavirus research: a meeting report.
Arch Virol. 144:835-840.

Schwemmle, M., C. Jehle, S. Formella und P. Staeheli. (1999b)
Sequence similarities between human bornavirus isolates and laboratory strains question human origin.
Lancet. 354:1973-1974.

Skehel JJ, Wiley DC. (2000)
Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin.
Annu Rev Biochem. 69:531-69.

Song HC, Seo MY, Stadler K, Yoo BJ, Choo QL, Coates SR, Uematsu Y, Harada T, Greer CE, Polo JM, Pileri P, Eickmann M, Rappuoli R, Abrignani S, Houghton M, Han JH. (2004)
Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein.
J Virol. 78(19):10328-35

Staeheli, P., C. Sauder, J. Hausmann, F. Ehrensperger und M. Schwemmle. (2000)
Epidemiology of Borna disease virus.
J Gen Virol. 81:2123-2135

Stitz, L., T. Bilzer, J.A. Richt und R. Rott. (1993)
Pathogenesis of Borna disease.
Arch Virol Suppl. 7:135-151..

Vogelstein, B und D. Gillespie (1979)
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.
Proc Natl Acad Sci USA 76: 615-9

Wehner, T., A. Ruppert, C. Herden, K. Frese, H. Becht und J.A. Richt. (1997)
Detection of a novel Borna disease virus-encoded 10 kDa protein in infected cells and tissues.
J Gen Virol. 78:2459-2466.

White JM. (1990)
Viral and cellular membrane fusion proteins.
Annu Rev Physiol. 52:675-97.

Wolff, T., R. Pfleger, T. Wehner, J. Reinhardt und J.A. Richt. (2000)
A short leucine-rich sequence in the Borna disease virus p10 protein mediates association with the viral phospho- and nucleoproteins.
J Gen Virol. 81:939-947.

Woodcock, D.M., P.J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S.S. Smith, M.Z. Michael und M.W. Graham (1989).
Quantitative evaluation of Escherichia coli host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants.
Nucleic Acids Res. 17:3469-3478.

Yamaguchi, K., T. Sawada, T. Naraki, R. Igata-Yi, H. Shiraki, Y. Horii, T. Ishii, K. Ikeda, N. Asou, H. Okabe, M. Mochizuki, K. Takahashi, S. Yamada, K. Kubo, S. Yashiki, R.W. Waltrip und K.M. Carbone. (1999)
Detection of borna disease virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemiluminescence immunoassay.
Clin Diagn Lab Immunol. 6:696-700

Zhang L, Ghosh HP. (1994)
Characterization of the putative fusogenic domain in vesicular stomatitis virus glycoprotein G.
J Virol. 68(4):2186-93.

9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
aqua bidest.	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BDV	Borna Disease Virus
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	“cell determinant”
CT	“cytoplasmatic tail” cytoplasmatischer Anteil
C-terminal	carboxy-terminal
Da	Dalton
DAPI	4,6 diamino-2-phenylindol, dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
def	defizient
dITP	Desoxyinosintriphosphat
DMEM	*“Dulbecco’s modified Eagle’s medium”*
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukeinsäure
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E. coli	*“Escherichia coli”*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EJC	“Exon Junction Complex”
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	*“et aliter“* (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm

GP	Glykoprotein
GP-C	C-terminales Spaltfragment des BDv Glykoproteins
GP-N	N-terminales Spaltfragment des BDv Glykoproteins
h	Stunde
HA	Hämaglutinin
HCl	Salzsäure
HRP	“horse radish peroxidase” (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
L	phosphorylierte Polymerase
LB	“Luria Bertani”
m	Milli-
M	Matrixprotein
M	Molar
µ	Mikro
min	Minuten
MW	“molecular weight”
NC	Nitrozellulose
N	Nukleoprotein
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte
ORF	“open reading frame” (offener Leserahmen)
P	Phosphoprotein
PBS	“phosphate buffered saline”
PCR	“polymerase chain reaction“ Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
R	Arginin
RNA	Ribonukeinsäure
PNGase F	Peptid-N4-(N-acetyl-β-Glukosaminyl)Asparagin Aminase
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sec	Sekunden

SFV	Semliki-Forest-Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA-puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	“transformation and storage solution”
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WB	Westernblot
WT	Wildtyp
ZNS	Zentral Nervensystem

10. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

10.1 Abbildungen

Abb. 1: Die Spitzmaus als natürliches Wirtsreservoir für BDV

Abb. 2: Typische Symptome für ein an BDV erkranktes Pferd sind

Abb. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines freien, pleomorphen Partikels des Virus der Bornaschen Krankheit

Abb. 4: 3D-Modell eines Viruspartikels

Abb. 5: Genomorganisation des BDV Virus

Abb. 6: Schematischer Überblick zum BDV-Glykoprotein und seinen Spaltprodukten

Abb. 7: Vector pCAGGS

Abb. 8: Schematische Darstellung der recombinanten PCR

Abb. 9: Schematische Darstellung des PCR-Fragmentes, welches in den Vektor pCAGGS kloniert wurde.

Abb. 10: Schematische Darstellung der möglichen Transkripte ohne Spleißen und durch Spleißen des Intron I bzw. Intron II

Abb. 11: Immunoblot von Zelllysaten aus BDV infizierter Vero Zellen, stabil GP transfizierten Zellen und Vero-Zellen. Gefärbt mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des GP

Abb. 12: Immunoblot von Zelllysaten aus stabil GP transfizierten Zellen, BDV infizierter Vero Zellen und Vero Zellen. Gefärbt mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP

Abb. 13: Immunfluoreszenz der stabil GP transfizierten Zellen im Vergleich zu Vero-Zellen.

Abb. 14: Immunoblots von Zelllysaten aus BDV infizierter Vero-Zellen, stabil GP transfizierten Zellen und Vero-Zellen, die Zelllysate wurden unbehandelt oder nach Verdau mit EndoH bzw. PNGaseF aufgetragen. Gefärbt mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die C-terminale Untereinheit des Glykoproteins.

Abb.15: Immunoblots von Zelllysaten aus BDV infizierter Vero-Zellen, stabil GP transfizierten Zellen und Vero Zellen. Die Zelllysate wurden unbehandelt oder nach Verdau mit EndoH bzw. PNGaseF aufgetragen. Gefärbt mit einem Kaninchen-Serum spezifisch gegen die N-terminale Untereinheit des GP.

Abb. 16: Darstellung der biotinylierten Zelllysate im Immunoblot.

Abb. 17: Oberflächen-Immunfluoreszenzen nach Fixierung in 1%PFA.

Abb. 18: Immunfluoreszenzen nach Fixierung in Methanol/Aceton.

Abb. 19: Expressionskinetik über sieben Tagen von BDV infizierten Vero-Zellen.

Abb. 20: Expressionskinetik sieben Tagen von stabil BDV GP exprimierenden Vero-Zellen.

Abb. 21: Darstellung der oligomeren Formen des BDV GP in einem Immunoblot unter nicht denaturierenden Bedingungen.

Abb. 22: Gezeigt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt wurden.

Abb. 23: Schematische Darstellung des Aminosäureaustausches an der potentiellen Spaltstelle.

Abb. 24: Immunoblot von Zelllysaten aus BDV infizierter Vero-Zellen, stabil GPØSpa transfizierten Zellen, Vero GP stabilen Zellen und Vero-Zellen.

Abb. 25: Immunfluoreszenzen nach Fixierung in Methanol/Aceton. Dargestellt ist die intrazelluläre Verteilung des BDV GP in BDV stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und stabil GPØSpa transfizierten Zellen.

Abb. 26: Oberflächen Immunfluoreszenzen nach Fixierung in 1%PFA. Dargestellt ist die Oberfläche von stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und stabil GPØSpa transfizierten Zellen.

Abb. 27: Immunoblot von Zelllysaten biotinylierter Zelllinien stabil GPØSpa transfizierten Zellen, stabil GP exprimierenden Vero-Zellen und Vero -Zellen.

Abb. 28: Gezeigt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt wurden.

Abb. 29: Dargestellt sind in der Abbildung Zellen, nachdem sie 30 min mit 0,5mg/ml Heparin vorinkubiert wurden im Vergleich zu Zellen ohne Vorbehandlung. Die Zellen wurden alle 10 min mit DMEM pH 4,9 behandelt.

Abb. 30: Sequenzvergleich der Glykoproteine des BDV-Virus mit den entsprechenden Proteinen des VS Virus, SFV und Ebola.

Abb. 31: Schematische Darstellung der gesetzten Mutationen im möglichen Fusionspeptides des BDV-Glykoproteins.

Abb. 32: Darstellung der Expression der Substitutionsmutanten im Fusionspeptid.

10.2 Grafiken

Grafik 1: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl.

Grafik 2: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl. Mit Substitution der Spaltstelle.

Grafik 3: Darstellung des prozentualen Anteils der Zellkerne in Synzytien im Verhältnis zur Gesamt-Zellkernzahl in Zellen, die zuvor mit Heparin behandelt wurden, und unbehandelten Zellen.

Grafik 4: Darstellung des prozentualen Anteils an Zellkernen in Synzytien im Verhältnis zu Gesamtmenge an Zellkernen aller transfiezierten Mutanten,

10.3 Tabellen

Tabelle 1**:** Reduktion der Fusion nach Substitutionen im potentiellen Fusionspeptid.

11. ANHANG

Sequenz pCAGGS-ΔIntronI-GP

```
   1  gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata
      cagctgtaac taataactga tcaataatta tcattagtta atgccccagt aatcaagtat

  61  gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc
      cgggtatata cctcaaggcg caatgtattg aatgccattt accgggcgga ccgactggcg

 121  ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag
      ggttgctggg ggcgggtaac tgcagttatt actgcataca agggtatcat tgcggttatc

 181  ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggta aactgcccac ttggcagtac
      cctgaaaggt aactgcagtt acccacctga taaatgccat ttgacgggtg aaccgtcatg

 241  atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg
      tagttcacat agtatacggt tcatgcgggg gataactgca gttactgcca tttaccgggc

 301  cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg
      ggaccgtaat acgggtcatg tactggaata ccctgaaagg atgaaccgtc atgtagatgc

 361  tattagtcat cgctattacc atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc
      ataatcagta gcgataatgg tacccagctc cactcggggt gcaagacgaa gtgagagggg

 421  atctcccccc cctccccacc cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca
      tagaggggggg ggaggggtgg gggttaaaac ataaataaat aaaaaattaa taaaacacgt

 481  gcgatggggg cgggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg
      cgctaccccc gccccccccc cccccgcgcg cggtccgccc cgccccgccc cgctccccgc

 541  gggcggggcg aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagtt
      cccgccccgc tccgcctctc cacgccgccg tcggttagtc tcgccgcgcg aggctttcaa

 601  tccttttatg gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc
      aggaaaatac cgctccgccg ccgccgccgc cgggatattt ttcgcttcgc gcgccgcccg

 661  gggagtcgct gcgttgcctt cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctcgc gccgcccgcc
      ccctcagcga cgcaacggaa gcggggcacg gggcgaggcg cggcggagcg cggcgggcgg

 721  ccggctctga ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc
      ggccgagact gactggcgca atgagggtgt ccactcgccc gccctgccgg gaagaggagg

 781  gggctgtaat tagcgcttgg tttaatgacg gctcgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag
      cccgacatta atcgcgaacc aaattactgc cgagcaaaga aaagacaccg acgcactttc

 841  ccttaaaggg ctccgggagg gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg
      ggaatttccc gaggccctcc cgggaaacac gccccccctc gccgagcccc ccacgcacgc

 901  tgtgtgtgtg cgtggggagc gccgcgtgcg gcccgcgctg cccggcggct gtgagcgctg
      acacacacac gcacccctcg cggcgcacgc cgggcgcgac gggccgccga cactcgcgac

 961  cgggcgcggc gcggggcttt gtgcgctccg cgtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc
      gcccgcgccg cgccccgaaa cacgcgaggc gcacacgcgc tcccctcgcg ccggcccccg

1021  ggtgccccgc ggtgcggggg ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg
      ccacggggcg ccacgccccc ccgacgctcc ccttgtttcc gacgcacgcc ccacacacgc
```

```
1081  tgggggggtg agcagggggt gtgggcgcgg cggtcgggct gtaacccccc cctgcacccc
      acccccccac tcgtccccca cacccgcgcc gccagcccga cattgggggg ggacgtgggg

1141  cctccccgag ttgctgagca cggcccggct tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc
      ggaggggctc aacgactcgt gccgggccga agcccacgcc ccgaggcacg ccccgcaccg

1201  gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg
      cgccccgagc ggcacggccc gccccccacc gccgtccacc cccacggccc gccccgcccc

1261  ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct
      ggcggagccc ggcccctccc gagccccctc cccgcgccgc cggggcctcg cggccgccga

1321  gtcgaggcgc ggcgagccgc agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcaag
      cagctccgcg ccgctcggcg tcggtaacgg aaaataccat tagcacgctc tcccgcgttc

1381  ggacttcctt tgtcccaaat ctgtgcggag ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc
      cctgaaggaa acagggttta gacacgcctc ggctttagac cctccgcggc ggcgtggggg

1441  tctagcgggc gcggggcgaa gcggtgcggc gccggcagga aggaaatggg cggggagggc
      agatcgcccg cgccccgctt cgccacgccg cggccgtcct tcctttaccc gcccctcccg

1501  cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg
      gaagcacgca gcggcgcggc ggcaggggaa gagggagagg tcggagcccc gacaggcgcc

1561  ggggacggct gccttcgggg gggacggggc agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc
      cccctgccga cggaagcccc ccctgccccg tcccgcccca agccgaagac cgcacactgg

1621  ggcagctcta gagcctctgc taaccatgtt catgccttct tctttttcct acagctcctg
      ccgtcgagat ctcggagacg attggtacaa gtacggaaga agaaaaagga tgtcgaggac

                                                          XhoI
                                                       -+-----
1681  ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat cattttggca aagaattcct cgagatgaat
      ccgttgcacg accaataaca cgacagagta gtaaaaccgt ttcttaagga gctctactta
                                                         >>.'M...>
                                                           e  m  n

1741  tcaaagcatt cctatgtgga gctcaaggac aagtgaaaga gcctctgcag cttccacgcg
      agtttcgtaa ggatacacct cgagttcctg ttcactttct cggagacgtc gaaggtgcgc
      >.............................'M.............................>
        s  k  h   s  y  v   e  l  k  d   k  -  k   s  l  c   s  f  h  a

1801  agaagaagtt gaccgactac ttcaccattg acgtagagcc agcaggtcat tccctggtca
      tcttcttcaa ctggctgatg aagtggtaac tgcatctcgg tcgtccagta agggaccagt
      >.............................'M.............................>
        r  r  s   -  p  t   t  s  p  l   t  -  s   q  q  v   i  p  w  s

1861  acatatactt ccagattgac gacttcttgc tcctaacact caactcactg tccgtataca
      tgtatatgaa ggtctaactg ctgaagaacg aggattgtga gttgagtgac aggcatatgt
      >.............................'M.............................>
        t  y  t   s  r  l   t  t  s  c   s  -  h   s  t  h   c  p  y  t

1921  aggacccgat taggaaatac atgttcctac gcctcaacaa ggaacagagc aagcacgcaa
      tcctgggcta atcctttatg tacaaggatg cggagttgtt ccttgtctcg ttcgtgcgtt
      >.............................'M.............................>
        r  t  r   l  g  n   t  c  s  y   a  s  t   r  n  r   a  s  t  q
```

```
1981  ttaatgcagc tttcaatgtc ttctcttatc ggcttcggaa cattggtgtt ggccctctcg
      aattacgtcg aaagttacag aagagaatag ccgaagcctt gtaaccacaa ccgggagagc
      >.............................'M.............................>
        l  m  q   l  s  m   s  s  l  i   g  f  g   t  l  v   l  a  l  s
         >>............................GP.............................>
           m  q   l  s  m   s  s  l  i   g  f  g   t  l  v   l  a  l  s

2041  gcccagacat tcgatcttca gggccttagt tgcaatactg actccactcc tggattaatc
      cgggtctgta agctagaagt cccggaatca acgttatgac tgaggtgagg acctaattag
      >.............'M.............>>
        a  q  t   f  d  l   q  g  l
      >.............................GP.............................>
        a  q  t   f  d  l   q  g  l  s   c  n  t   d  s  t   p  g  l  i

2101  gatctggaga taaggcgact ttgccacacc ccaacggaaa atgtcatttc atgcgaggtt
      ctagacctct attccgctga aacggtgtgg ggttgccttt tacagtaaag tacgctccaa
      >.............................GP.............................>
        d  l  e   i  r  r   l  c  h  t   p  t  e   n  v  i   s  c  e  v

2161  agttatctta accacacgac tattagcctc ccggcagtcc acacgtcatg cctcaagtac
      tcaatagaat tggtgtgctg ataatcggag ggccgtcagg tgtgcagtac ggagttcatg
      >.............................GP.............................>
        s  y  l   n  h  t   t  i  s  l   p  a  v   h  t  s   c  l  k  y

2221  cactgcaaaa cctattgggg attctttggt agctacagcg ctgaccgaat catcaatcgg
      gtgacgtttt ggataacccc taagaaacca tcgatgtcgc gactggctta gtagttagcc
      >.............................GP.............................>
        h  c  k   t  y  w   g  f  f  g   s  y  s   a  d  r   i  i  n  r

2281  tacactggta ctgttaaggg ttgtttaaac aactcagcgc cagaggatcc cttcgagtgc
      atgtgaccat gacaattccc aacaaatttg ttgagtcgcg gtctcctagg gaagctcacg
      >.............................GP.............................>
        y  t  g   t  v  k   g  c  l  n   n  s  a   p  e  d   p  f  e  c

2341  aactggttct actgctgctc ggcgattaca acagagatct gccgatgctc tattacaaat
      ttgaccaaga tgacgacgag ccgctaatgt tgtctctaga cggctacgag ataatgttta
      >.............................GP.............................>
        n  w  f   y  c  c   s  a  i  t   t  e  i   c  r  c   s  i  t  n

2401  gtcacggtgg ctgtacagac attcccaccg ttcatgtact gcagtttcgc ggactgtagt
      cagtgccacc gacatgtctg taagggtggc aagtacatga cgtcaaagcg cctgacatca
      >.............................GP.............................>
        v  t  v   a  v  q   t  f  p  p   f  m  y   c  s  f   a  d  c  s

2461  actgtgagtc agcaggagct agagagtggc aaggcaatgc tgagcgatgg cagtaccttа
      tgacactcag tcgtcctcga tctctcaccg ttccgttacg actcgctacc gtcatggaat
      >.............................GP.............................>
        t  v  s   q  q  e   l  e  s  g   k  a  m   l  s  d   g  s  t  l

2521  acttataccc cgtatatctt acaatcagaa gtcgtgaaca aaacccttaa tgggactata
      tgaatatggg gcatatagaa tgttagtctt cagcacttgt tttgggaatt accctgatat
      >.............................GP.............................>
        t  y  t   p  y  i   l  q  s  e   v  v  n   k  t  l   n  g  t  i

2581  ctctgcaact catcctccaa gatagtttcc ttcgatgaat ttaggcgttc atactcccta
      gagacgttga gtaggaggtt ctatcaaagg aagctactta aatccgcaag tatgagggat
      >.............................GP.............................>
        l  c  n   s  s  s   k  i  v  s   f  d  e   f  r  r   s  y  s  l
```

```
2641  gcgaatggta gttaccagag ctcatcaatc aatgtgacgt gtgtaaacta cacgtcgtcc
      cgcttaccat caatggtctc gagtagttag ttacactgca cacatttgat gtgcagcagg
      >.............................GP.............................>
        a  n  g   s  y  q   s  s  s  i   n  v  t   c  v  n   y  t  s  s

2701  tgccggtcca agttgagaag gcggcgtagg gatactcaac agattgagta cctagttcac
      acggccaggt tcaactcttc cgccgcatcc ctatgagttg tctaactcat ggatcaagtg
      >.............................GP.............................>
        c  r  s   k  l  r   r  r  r  r   d  t  q   q  i  e   y  l  v  h

2761  aagcttaggc ctacactgaa agatgcgtgg gaggactgtg agatcctcca gtctctgctc
      ttcgaatccg gatgtgactt tctacgcacc ctcctgacac tctaggaggt cagagacgag
      >.............................GP.............................>
        k  l  r   p  t  l   k  d  a  w   e  d  c   e  i  l   q  s  l  l

2821  ctagggatgt ttggtactgg gattgcaagt gcttcgcaat tcttgagggg ctggctcaac
      gatccctaca aaccatgacc ctaacgttca cgaagcgtta agaactcccc gaccgagttg
      >.............................GP.............................>
        l  g  m   f  g  t   g  i  a  s   a  s  q   f  l  r   g  w  l  n

2881  caccctgata tcatcgggta tatagttaat ggagttgggg tagtctggca atgccatcgt
      gtgggactat agtagcccat atatcaatta cctcaacccc atcagaccgt tacggtagca
      >.............................GP.............................>
        h  p  d   i  i  g   y  i  v  n   g  v  g   v  v  w   q  c  h  r

2941  gttaatgtca cgttcatggc gtggaatgag tccacatatt accctccagt agattacaat
      caattacagt gcaagtaccg caccttactc aggtgtataa tgggaggtca tctaatgtta
      >.............................GP.............................>
        v  n  v   t  f  m   a  w  n  e   s  t  y   y  p  p   v  d  y  n

3001  ggacggaagt actttctgaa tgatgagggg aggctacaaa caaacacccc cgaggcaagg
      cctgccttca tgaaagactt actactcccc tccgatgttt gtttgtgggg gctccgttcc
      >.............................GP.............................>
        g  r  k   y  f  l   n  d  e  g   r  l  q   t  n  t   p  e  a  r

3061  ccagggctta agcgggtcat gtggttcggc aggtacttcc tagggacagt agggtctggg
      ggtcccgaat tcgcccagta caccaagccg tccatgaagg atccctgtca tcccagaccc
      >.............................GP.............................>
        p  g  l   k  r  v   m  w  f  g   r  y  f   l  g  t   v  g  s  g

3121  gtgaaaccga ggaggattcg gtacaataag acctcacatg attaccatct agaggagttt
      cactttggct cctcctaagc catgttattc tggagtgtac taatggtaga tctcctcaaa
      >.............................GP.............................>
        v  k  p   r  r  i   r  y  n  k   t  s  h   d  y  h   l  e  e  f

3181  gaggcaagtc tcaacatgac cccccagacc agtatcgcct cgggtcatga gacagacccc
      ctccgttcag agttgtactg gggggtctgg tcatagcgga gcccagtact ctgtctgggg
      >.............................GP.............................>
        e  a  s   l  n  m   t  p  q  t   s  i  a   s  g  h   e  t  d  p

3241  ataaatcatg cctacggaac gcaggctgac ctccttccat acaccaggtc tagtaatata
      tatttagtac ggatgccttg cgtccgactg gaggaaggta tgtggtccag atcattatat
      >.............................GP.............................>
        i  n  h   a  y  g   t  q  a  d   l  l  p   y  t  r   s  s  n  i

3301  acgtctacag atacaggctc aggctgggtg cacatcggcc taccctcatt tgctttcctc
      tgcagatgtc tatgtccgag tccgacccac gtgtagccgg atgggagtaa acgaaaggag
      >.............................GP.............................>
        t  s  t   d  t  g   s  g  w  v   h  i  g   l  p  s   f  a  f  l
```

```
3361  aatcctctcg ggtggcttag ggacctactt gcgtgggcgg cctggttggg tggggttcta
      ttaggagagc ccaccgaatc cctggatgaa cgcacccgcc ggaccaaccc accccaagat
      >.............................GP.............................>
        n  p  l   g  w  l   r  d  l  l   a  w  a   a  w  l   g  g  v  l

3421  tacttaataa gtctttgtgt ttccttacca gcctccttcg cgaggaggag acgcctcggc
      atgaattatt cagaaacaca aaggaatggt cggaggaagc gctcctcctc tgcggagccg
      >.............................GP.............................>
        y  l  i   s  l  c   v  s  l  p   a  s  f   a  r  r   r  r  l  g

3481  cggtggcagg aataaaccgt accgaccaat ctcttaaaaa ccctcttctc gggacagagg
      gccaccgtcc ttatttggca tggctggtta gagaattttt gggagaagag ccctgtctcc
      >......GP.....>>
        r  w  q   e  -

3541  tctctttctg ccttaaatcg agttcactcc cccatcacgt acgagcattg ggccagatta
      agagaaagac ggaatttagc tcaagtgagg gggtagtgca tgctcgtaac ccggtctaat

3601  aagcaaagaa cctggcatcc tgtgactatt acttgctatt ccgccaagtt gtattgcccc
      ttcgtttctt ggaccgtagg acactgataa tgaacgataa ggcggttcaa cataacgggg

3661  ctgaagtata tcccattggt gtcttaataa gagctgcgga ggccatacta acagttatag
      gacttcatat agggtaacca cagaattatt ctcgacgcct ccggtatgat tgtcaatatc

3721  tatcagcttg gaagctggat cacatgacaa agaccctata ctcctctgtg agatatgcac
      atagtcgaac cttcgaccta gtgtactgtt tctgggatat gaggagacac tctatacgtg

3781  tcaccaatcc ccgggtccgg gcccaacttg agctccacat tgcctaccag cgcatagtgg
      agtggttagg ggcccaggcc cgggttgaac tcgaggtgta acggatggtc gcgtatcacc

3841  gtcaggtctc gtatagccgg gaagcagata tagggccaaa aaggcttggg aatatgtcat
      cagtccagag catatcggcc cttcgtctat atcccggttt ttccgaaccc ttatacagta

3901  tgcaattcat ccaatccctc gttattgcca ccatagacac aacgagctgc ctaatgacct
      acgttaagta ggttagggag caataacggt ggtatctgtg ttgctcgacg gattactgga

3961  acaaccactt tcttgctgca gcagacacag ccaagagcag atgccacctc ctaatcgcct
      tgttggtgaa agaacgacgt cgtctgtgtc ggttctcgtc tacggtggag gattagcgga

4021  cagtggtcca aggagccctt tgggagcaag ggtcatttct tgatcatata atcaacatga
      gtcaccaggt tcctcgggaa accctcgttc ccagtaaaga actagtatat tagttgtact

4081  tcgacacaat tgactcaatc aacctccccc atgatgatta cttcacaatt attaagtcta
      agctgtgtta actgagttag ttggaggggg tactactaat gaagtgttaa taattcagat

4141  tctctcccta ctcccaaggg cttgttatgg ggaggcacaa tgtgtcagtc tcctctgatt
      agagagggat gagggttccc gaacaatacc cctccgtgtt acacagtcag aggagactaa

                                                  NheI
                                                 -+----
4201  ttgcgtccgt atttactatt cctgaatcat gcccacaact gctagcagat ctttttccct
      aacgcaggca taaatgataa ggacttagta cgggtgttga cgatcgtcta gaaaaaggga

4261  ctgccaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca tctgacttct ggctaataaa
      gacggttttt aataccccctg tagtacttcg gggaactcgt agactgaaga ccgattattt

4321  ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagga
      cctttaaata aaagtaacgt tatcacacaa ccttaaaaaa cacagagagt gagccttcct
```

```
4381  catatgggag ggcaaatcat ttaaaacatc agaatgagta tttggtttag agtttggcaa
      gtataccctc ccgtttagta aattttgtag tcttactcat aaaccaaatc tcaaaccgtt

4441  catatgccca tatgctggct gccatgaaca aaggtggcta taaagaggtc atcagtatat
      gtatacgggt atacgaccga cggtacttgt ttccaccgat atttctccag tagtcatata

4501  gaaacagccc cctgctgtcc attccttatt ccatagaaaa gccttgactt gaggttagat
      ctttgtcggg ggacgacagg taaggaataa ggtatctttt cggaactgaa ctccaatcta

4561  ttttttata ttttgttttg tgttattttt ttctttaaca tccctaaaat tttccttaca
      aaaaaaatat aaaacaaaac acaataaaaa aagaaattgt agggatttta aaaggaatgt

4621  tgttttacta gccagatttt tcctcctctc ctgactactc ccagtcatag ctgtccctct
      acaaaatgat cggtctaaaa aggaggagag gactgatgag ggtcagtatc gacagggaga

4681  tctcttatga agatccctcg acctgcagcc caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt
      agagaatact tctagggagc tggacgtcgg gttcgaaccg cattagtacc agtatcgaca

4741  ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa
      aaggacacac tttaacaata ggcgagtgtt aaggtgtgtt gtatgctcgg ccttcgtatt

4801  agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac
      tcacatttcg gaccccacgg attactcact cgattgagtg taattaacgc aacgcgagtg

4861  tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagcggat ccgcatctca attagtcagc
      acgggcgaaa ggtcagccct ttggacagca cggtcgccta ggcgtagagt taatcagtcg

4921  aaccatagtc ccgcccctaa ctccgcccat cccgccccta actccgccca gttccgccca
      ttggtatcag ggcggggatt gaggcgggta gggcggggat tgaggcgggt caaggcgggt

4981  ttctccgccc catggctgac taatttttt tatttatgca gaggccgagg ccgcctcggc
      aagaggcggg gtaccgactg attaaaaaaa ataaatacgt ctccggctcc ggcggagccg

5041  ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttgga ggcctaggct tttgcaaaaa
      gagactcgat aaggtcttca tcactcctcc gaaaaaacct ccggatccga aaacgttttt

5101  gctaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc
      cgattgaaca aataacgtcg aatattacca atgtttattt cgttatcgta gtgtttaaag

5161  acaaataaag cattttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta
      tgtttatttc gtaaaaaaag tgacgtaaga tcaacaccaa acaggtttga gtagttacat

5221  tcttatcatg tctggatccg ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt
      agaatagtac agacctaggc gacgtaatta cttagccggt tgcgcgcccc tctccgccaa

5281  tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc
      acgcataacc cgcgagaagg cgaaggagcg agtgactgag cgacgcgagc cagcaagccg

5341  tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg
      acgccgctcg ccatagtcga gtgagtttcc gccattatgc caataggtgt cttagtcccc

5401  ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg
      tattgcgtcc tttcttgtac actcgttttc cggtcgtttt ccggtccttg gcatttttcc

5461  ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac
      ggcgcaacga ccgcaaaaag gtatccgagg cgggggggact gctcgtagtg tttttagctg

5521  gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg
```

```
      cgagttcagt ctccaccgct ttgggctgtc ctgatatttc tatggtccgc aaaggggac

5581  gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac ctgtccgcct
      cttcgaggga gcacgcgaga ggacaaggct gggacggcga atggcctatg gacaggcgga

5641  ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc aatgctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg
      aagagggaag cccttcgcac cgcgaaagag ttacgagtgc gacatccata gagtcaagcc

5701  tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct
      acatccagca agcgaggttc gacccgacac acgtgcttgg ggggcaagtc gggctggcga

5761  gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac ttatcgccac
      cgcggaatag gccattgata gcagaactca ggttgggcca ttctgtgctg aatagcggtg

5821  tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt
      accgtcgtcg gtgaccattg tcctaatcgt ctcgctccat acatccgcca cgatgtctca

5881  tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc
      agaacttcac caccggattg atgccgatgt gatcttcctg tcataaacca tagacgcgag

5941  tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca
      acgacttcgg tcaatggaag ccttttttctc aaccatcgag aactaggccg tttgtttggt

6001  ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat
      ggcgaccatc gccaccaaaa aaacaaacgt tcgtcgtcta atgcgcgtct ttttttccta

6061  ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac
      gagttcttct aggaaactag aaaagatgcc ccagactgcg agtcaccttg cttttgagtg

6121  gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt
      caattcccta aaaccagtac tctaatagtt tttcctagaa gtggatctag gaaaatttaa

6181  aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct gacagttacc
      tttttacttc aaaatttagt tagatttcat atatactcat ttgaaccaga ctgtcaatgg
                                                          Amp-R <<..<
                                                                -

6241  aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg
      ttacgaatta gtcactccgt ggatagagtc gctagacaga taaagcaagt aggtatcaac
      <.............................Amp-R.............................<
      w  h  k  i   l  s  a   g  i  e   a  i  q  r   n  r  e   d  m  t

6301  cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg
      ggactgaggg gcagcacatc tattgatgct atgccctccc gaatggtaga ccggggtcac
      <.............................Amp-R.............................<
      a  q  s  g   t  t  y   i  v  v   i  r  s  p   k  g  d   p  g  l

6361  ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc
      gacgttacta tggcgctctg ggtgcgagtg gccgaggtct aaatagtcgt tatttggtcg
      <.............................Amp-R.............................<
      a  a  i  i   g  r  s   g  r  e   g  a  g  s   k  d  a   i  f  w

6421  cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta
      gtcggccttc ccggctcgcg tcttcaccag gacgttgaaa taggcggagg taggtcagat
      <.............................Amp-R.............................<
      g  a  p  l   a  s  r   l  l  p   g  a  v  k   d  a  e   m  w  d

6481  ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg cgcaacgttg
      aattaacaac ggcccttcga tctcattcat caagcggtca attatcaaac gcgttgcaac
```

```
      <.............................Amp-R.............................<
      i  l  q  q   r  s  a   l  t  l   l  e  g  t   l  l  k   r  l  t

6541  ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct tcattcagct
      aacggtaacg atgtccgtag caccacagtg cgagcagcaa accataccga agtaagtcga
      <.............................Amp-R.............................<
      t  a  m  a   v  p  m   t  t  d   r  e  d  n   p  i  a   e  n  l

6601  ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatcccccat gttgtgcaaa aaagcggtta
      ggccaagggt tgctagttcc gctcaatgta ctaggggtta caacacgttt tttcgccaat
      <.............................Amp-R.............................<
      e  p  e  w   r  d  l   r  t  v   h  d  g  m   n  h  l   f  a  t

6661  gctccttcgg tcctccgatc gttgtcagaa gtaagttggc cgcagtgtta tcactcatgg
      cgaggaagcc aggaggctag caacagtctt cattcaaccg gcgtcacaat agtgagtacc
      <.............................Amp-R.............................<
      l  e  k  p   g  g  i   t  t  l   l  l  n  a   a  t  n   d  s  m

6721  ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga
      aataccgtcg tgacgtatta agagaatgac agtacggtag gcattctacg aaaagacact
      <.............................Amp-R.............................<
      t  i  a  a   s  c  l   e  r  v   t  m  g  d   t  l  h   k  e  t

6781  ctggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt
      gaccactcat gagttggttc agtaagactc ttatcacata cgccgctggc tcaacgagaa
      <.............................Amp-R.............................<
      v  p  s  y   e  v  l   d  n  q   s  y  h  i   r  r  g   l  q  e

6841  gcccggcgtc aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca
      cgggccgcag ttatgcccta ttatggcgcg gtgtatcgtc ttgaaatttt cacgagtagt
      <.............................Amp-R.............................<
      q  g  a  d   i  r  s   l  v  a   g  c  l  l   v  k  f   t  s  m

6901  ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt
      aacctttttgc aagaagcccc gctttttgaga gttcctagaa tggcgacaac tctaggtcaa
      <.............................Amp-R.............................<
      m  p  f  r   e  e  p   r  f  s   e  l  i  k   g  s  n   l  d  l

6961  cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt
      gctacattgg gtgagcacgt gggttgacta gaagtcgtag aaaatgaaag tggtcgcaaa
      <.............................Amp-R.............................<
      e  i  y  g   v  r  a   g  l  q   d  e  a  d   k  v  k   v  l  t

7021  ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaaatg ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga
      gacccactcg tttttgtcct tccgttttac ggcgtttttt cccttattcc cgctgtgcct
      <.............................Amp-R.............................<
      e  p  h  a   f  v  p   l  c  f   a  a  f  f   p  i  l   a  v  r

7081  aatgttgaat actcatactc ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt
      ttacaactta tgagtatgag aaggaaaaag ttataataac ttcgtaaata gtcccaataa
      <.....Amp-R....<<
      f  h  q  i   s  m

7141  gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc
      cagagtactc gcctatgtat aaacttacat aaatcttttt atttgtttat ccccaaggcg

7201  gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctg
      cgtgtaaagg ggcttttcac ggtggac
```

Aminosäuresequenz des Matrixproteins von BDV

MNSKHSYVELKDKVIVPGWPTLMLEIDFVGGTSRNQFLNIPFLSVKEPLQLPREKKLTDYFTIDVEPAGH
SLVNIYFQIDDFLLLTLNSLSVYKDPIRKYMFLRLNKEQSKHAINAAFNVFSYRLRNIGVGPLGPDIRSS
GP

Aminosäuresequenz des Glykoproteins von BDV

MQLSMSSLIGFGTLVLALSAQTFDLQGLSCNTDSTPGLIDLEIRRLCHTPTENVISCEVSYLNHTTISLP
AVHTSCLKYHCKTYWGFFGSYSADRIINRYTGTVKGCLNNSAPEDPFECNWFYCCSAITTEICRCSITNV
TVAVQTFPPFMYCSFADCSTVSQQELESGKAMLSDGSTLTYTPYILQSEVVNKTLNGTILCNSSSKIVSF
DEFRRSYSLANGSYQSSSINVTCVNYTSSCRSKLRRRRRDTQQIEYLVHKLRPTLKDAWEDCEILQSLLL
GMFGTGIASASQFLRGWLNHPDIIGYIVNGVGVVWQCHRVNVTFMAWNESTYYPPVDYNGRKYFLNDEGR
LQTNTPEARPGLKRVMWFGRYFLGTVGSGVKPRRIRYNKTSHDYHLEEFEASLNMTPQTSIASGHETDPI
NHAYGTQADLLPYTRSSNITSTDTGSGWVHIGLPSFAFLNPLGWLRDLLAWAAWLGGVLYLISLCVSLPA
SFARRRRLGRWQE

Präsentation der Arbeit auf Tagungen und Kongressen

Vortrag

05 / 2007
Vortrag zum Thema „Characterisation of a vectorial expressed BDV glycoprotein and its functional domains" Sonderforschungsberreich 535 "Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern"

Poster

09 / 2007
Melanie Gössl, Markus Eickmann, Nina Stock, Wolfgang Garten, Dorothee Gicklhorn
„Vectorial expression of Bornavirus Glycoprotein (GP) is sufficient to induce pH-dependent cell-cell fusion"
Third European Congress of Virology in Nürnberg

03/2005
Melanie Gössl, Miriam Hock, Dorothee Gicklhorn, Ina Kraus, Wolfgang Garten, Markus Eickmann
„Eukaryotic expression of the functional glycoprotein of Borna disease virus"
GfV-Jahrestagung in Hannover

Weitere Poster während der Dissertation

03/2005
Hock M, Gössl M, Eickmann M, Garten W, Kraus I,
„Stoichiometrical and structural characterisation of the phosphoprotein-nucleoprotein complex of Borna disease virus." GfV-Jahrestagung in Hannover

03/2004
Sharareh Moghim, Simone Kiermayer, Markus Eickmann, Melanie Gössl, Wolfgang Garten, Ina Kraus
„Interaction of the Borna disease virus matrix protein
with the cytoplasmic tail of the glycoprotein" GfV-Jahrestagung in Tübimgen

03/2003
Schmidke A, Gössl M, Weik M, Kiermayer S, Eickmann M, Garten W, Kraus I
„Phosphorylation as a regulatory factor in the interaction of phosphoprotein and protein X in Borna disease virus"GfV-Jahrestagung in Berlin

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:

08/2005
Eickmann M., KiermayerS., KrausI., Gössl M., RichtJA., Garten W
Maturation of Borna disease virus glycoprotein“ FEBS Lett

08/2008 in Vorbereitung
Gössl M., Gicklhorn D., Garten W., Eickmann M
Solitaire, vectorial expression of Bornavirus Glycoprotein (GP) is sufficient to induce pH-dependent cell-cell fusion

LEBENSLAUF

Name	Melanie Skill
Geburtsname	Gössl
Geburtsdatum	11.09.1978
Geburtsort	Gießen

Schulausbildung

1985 - 1989	Grundschule Reiskirchen
1989 - 1998	Theo-Koch-Schule Grünberg
1998	Allgemeine Hochschulreife

Freiwilliges Soziales Jahr

1998-1999.1	in der Ganztagsbetreuung des Elternvereins der Grundschule Bellersheim Obbornhofen

Hochschulausbildung

1999-2001	Grundstudium des Studienganges Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
2002	Diplom-Vorprüfung
2001-2003	Hauptstudium des Studienganges Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg Hauptfach: Infektionsbiologie Nebenfach: Molekularbiologie
2003	Diplom-Prüfung
2003- 2004	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps Universität Marburg, Thema: „Untersuchung funktioneller Domänen am Glykoprotein des Virus der Bornaschen Krankheit“
2004-2008	Doktorarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, Thema: „Charakterisierung funktioneller Domänen des vektoriell exprimierten Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit“

Verzeichnis der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Aumüller, Daut, Eilers, Elsässer, Feuser, Frenking, Garten, Gromes, Grzeschik, Hasilik, Heeg, Jungclas, Kirchner, Klenk, Koolman, Kunz, Lill, Löffler, Mandrek, Moll, Müller, Portenier, Radsak, Renkawitz-Pohl, Renz, Röhm, Schäfer, Schmidt, Schulz, Schwee, Seitz, J., Seitz, K.A., Tampé, Westermann

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. W. Garten danke ich für die Überlassung des Themas, seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung während dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-P. Elsässer danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-D. Klenk danke ich für die sehr guten Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Dr. Markus Eickmann und Frau Dr. Dorothee Gicklhorn danke ich für die geduldige Betreuung, für die Unterstützung und die Hilfe bei der Lösung anfallender Probleme.

Bei Jens Kursawe, Maria Haß, Joanna Baron, Nina Stock, Miriam Hock und allen, die während meiner Zeit als Doktorand in der AG Garten tätig waren, möchte ich mich für das nette Arbeitsklima im Labor bedanken.

Mein Dank gilt all den Mitarbeitern des Instituts für Virologie in Marburg,
die mir bei meiner Arbeit geholfen haben und die zu der sehr angenehmen
Atmosphäre des Hauses beigetragen haben.

Ein großes Dankeschön gilt Christian Rinné für die orthographische Korrektur dieser Arbeit.

Mein persönlicher Dank geht an meine Eltern, die mich in jeglicher Hinsicht immer gefördert und unterstützt haben.

Und ein ganz besonderes Dankeschön gilt Carsten Skill für die liebevolle Unterstützung während der gesamten Promotion.

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung funktioneller Domänen des vektoriell exprimierten Glykoproteins des Virus der Bornaschen Krankheit“ im Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. S. Becker mit Unterstützung durch Prof. Dr. W. Garten ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegte.

Marburg, den 30.07.2008

(Melanie Skill)