

Aus dem Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie  
der Philipps-Universität Marburg mit  
Medizinal-Untersuchungsamt  
Institut für Virologie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. H.-D. Klenk

## **Das Matrixprotein 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

**Ina Kraus**  
aus Lich

Marburg 2002

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am 23.10.02.

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Bernhard Maisch

Referent: Prof. Dr. Wolfgang Garten

1. Korreferent: Prof. Dr. Roland Lill

2. Korreferent: Prof. Dr. Peter Staeheli

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die Bornasche Krankheit .....	1
1.2	Pathogenese .....	2
1.3	Das Virus der Bornaschen Krankheit .....	4
1.4	Genomorganisation .....	5
1.5	Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit .....	7
1.6	Ziel der Arbeit .....	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>10</b>
2.1	Chemikalien .....	10
2.2	Geräte .....	12
2.3	Kits .....	12
2.4	Säulen .....	13
2.5	Sonstiges .....	13
2.6	Radioaktive Verbindungen .....	14
2.7	Enzyme .....	14
2.8	Restriktionsendonukleasen .....	14
2.9	Oligonukleotide .....	14
2.10	Vektoren .....	15
2.11	Antikörper .....	17
2.12.1	Bakterien .....	17
2.12.2	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur .....	18
2.13.1	Eukaryotische Zellen .....	18
2.13.2	Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur .....	19
2.14	Viren .....	19

<b>3</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien .....</b>	<b>21</b>
3.1.1	Präparation im kleinen Maßstab .....	21
3.1.2	Präparation im großen Maßstab .....	21
3.1.3	Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen .....	22
<b>3.2</b>	<b>Herstellung von Plasmid-DNA-Konstrukten .....</b>	<b>22</b>
3.2.1	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	22
3.2.2	Reinigung von PCR-DNA-Fragmenten .....	23
3.2.3	Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA <i>in vitro</i> .....	23
3.2.4	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen ...	25
3.2.5	Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese .....	25
3.2.6	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	25
3.2.7	Ligation .....	26
<b>3.3</b>	<b>Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien .....</b>	<b>26</b>
3.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien .....	26
3.3.2	Transformation .....	27
3.3.3	Glycerin-Kultur .....	27
<b>3.4</b>	<b>Sequenzierung von DNA .....</b>	<b>27</b>
3.4.1	Sequenzierungsreaktion .....	27
3.4.2	Herstellung des Sequenziergels und Elektrophorese .....	28
<b>3.5</b>	<b>Zellkulturtechniken .....</b>	<b>29</b>
3.5.1	Passagierung von Kultur-Zellen .....	29
3.5.2	Einfrieren und Auftauen von Kultur-Zellen .....	30
<b>3.6</b>	<b>MVA-T7-Expressionssystem .....</b>	<b>30</b>
3.6.1	Herstellung einer MVA-T7 Virusstammsuspension .....	31
3.6.2	Bestimmung des Virus-Titers .....	31
3.6.3	Infektion der Zellen mit MVA-T7 .....	32
3.6.4	Transfektion der Zellen mit Lipofektin .....	32

<b>3.7</b>	<b>BHK-T7-Expressionssystem .....</b>	<b>33</b>
3.7.1	Transfektion der Zellen mit FuGENE 6 .....	33
<b>3.8</b>	<b><i>In vitro</i> Transkription/Translation in Ab- und Anwesenheit von Mikrosomen .....</b>	<b>34</b>
<b>3.9</b>	<b>Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese .....</b>	<b>35</b>
3.9.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	35
3.9.2	Nicht-denaturierende Gele für basische Proteine .....	36
3.9.3	Färbung von Proteinen im Gel .....	36
3.9.4	Fixierung und Autoradiographie .....	37
<b>3.10</b>	<b>Spezifischer Nachweis und Analyse von Proteinen .....</b>	<b>37</b>
3.10.1	Western Blot Analyse .....	37
3.10.2	Indirekte Immunfluoreszenz .....	38
3.10.2.1	Fixierung .....	38
3.10.2.2	Permeabilisierung .....	39
3.10.2.3	Inkubation mit Antikörpern .....	39
3.10.2.4	Eindeckeln .....	39
3.10.3	Radioaktive Markierung von Proteinen .....	40
3.10.4	Immunpräzipitation .....	40
3.10.5	Endoglykosidase-Behandlung .....	41
3.10.6	Lektin Blot .....	41
<b>3.11</b>	<b>Untersuchungen zur Membranassoziation von Proteinen ..</b>	<b>43</b>
3.11.1	Flotationsanalyse im nicht-linearen OptiPrep™-Gradienten ...	43
3.11.2	Charakterisierung der Membranassoziation .....	44
<b>3.12</b>	<b>Bakterielle Expression und Reinigung von Proteinen .....</b>	<b>44</b>
3.12.1	Bakterielle Expression, Affinitätsreinigung über Amylose- Harz und Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa .....	45
3.12.2	Kationenaustausch-Chromatographie .....	46
3.12.3	Gelfiltrations-Chromatographie .....	46
3.12.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	46
3.12.5	Ankonzentrierung von Proteinlösungen .....	47
3.12.6	Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massen- spektrometrie (MALDI-MS) .....	47

<b>3.13</b>	<b>Strukturbiologische Untersuchungen von Proteinen .....</b>	<b>48</b>
3.13.1	Chemische Quervernetzung mit DMP .....	48
3.13.2	Bestimmung des Stokes Radius von Proteinen .....	49
3.13.3	Elektronenmikroskopische Analyse von Einzelpartikeln .....	50
3.13.4	Limitierte Proteolyse von nativen Proteinen mit Trypsin .....	50
3.13.5	Kristallisation von Proteinen .....	51
3.13.6	Lösung des Phasenproblems .....	52
3.13.6.1	Anreicherung von Kristallen mit Schwermetall-Salzen .....	52
3.13.6.2	Expression von Selenomethionin-haltigem Protein in methioninauxotrophen <i>E. coli</i> (B834) .....	53
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Untersuchungen von ko- und posttranslationalen Modifikationen .....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Identifizierung des BDV-Matrixproteins in verschiedenen Systemen .....	55
4.1.2	Untersuchung zur Abspaltung eines möglichen <i>N</i> -terminalen Signalpeptids .....	57
4.1.3	Untersuchung einer möglichen <i>N</i> -Glykosylierung .....	58
4.1.3.1	Behandlung mit Endoglykosidasen .....	58
4.1.3.2	Bindung von Lektinen .....	59
4.1.3.3	<i>In vitro</i> Transkription/Translation in Gegenwart von Mikrosomen .....	61
4.1.4	Herstellung von <i>N</i> -Glykosylierungs-Mutanten zur Bildung des notwendigen <i>N</i> -Glykosylierungsmotivs N-X-T .....	62
4.1.4.1	Expression der <i>N</i> -Glykosylierungs-Mutanten in eukaryotischen Zellen .....	63
4.1.4.2	<i>In vitro</i> Transkription/Translation der <i>N</i> -Glykosylierungs- Mutanten in Gegenwart von Mikrosomen .....	65

<b>4.2</b>	<b>Untersuchungen zur Topologie und Lokalisation .....</b>	<b>66</b>
4.2.1	Flotationsanalyse zur Charakterisierung der Membran- assoziation .....	66
4.2.2	Intrazelluläre Lokalisation des BDV-Matrixproteins in transfizierten BHK-T7-Zellen .....	69
<b>4.3</b>	<b>Strukturbiologische Untersuchungen .....</b>	<b>72</b>
4.3.1	Bakterielle Expression des BDV-Matrixproteins in <i>E. coli</i> .....	72
4.3.2	Reinigung des bakteriell exprimierten BDV-Matrixproteins .....	72
4.3.2.1	Reinigung des Fusionsproteins MBP-BDV-M über Amylose- Harz .....	72
4.3.2.2	Reinigung des BDV-Matrixproteins über Kationenaustausch- Chromatographie .....	73
4.3.2.3	Reinigung des BDV-Matrixproteins über Gelfiltrations- Chromatographie .....	76
4.3.3	Chemische Quervernetzung des BDV-Matrixproteins zur Untersuchung der Multimerisierung .....	80
4.3.4	Bestimmung des Stokes Radius von BDV-M-Partikeln .....	81
4.3.5	Darstellung von Einzelpartikeln im Elektronenmikroskop .....	83
4.3.6	Limitierte Proteolyse des BDV-Matrixproteins .....	84
4.3.7	Kristallisation des BDV-Matrixproteins .....	88
4.3.8	Lösung des Phasenproblems .....	89
4.3.8.1	Vermessung der Schwermetall-Kristalle .....	89
4.3.8.2	Nachweis des Einbaus von Selenomethionin in das BDV- Matrixprotein durch MALDI-TOF .....	89
4.3.8.3	Kristallisation und von Selenomethion-haltigem BDV-Matrixprotein .....	91
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>92</b>
5.1	<i>N</i> -Glykosylierung des BDV-Matrixproteins .....	92
5.2	Membranassoziation des BDV-Matrixproteins .....	94
5.3	Struktur des BDV-Matrixproteins .....	95
5.4	Resümee .....	99

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>100</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>101</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>114</b>
	Kristallisations-Lösungen 1 bis 96 .....	114
	Schematische Darstellung unterschiedlicher Domänen im BDV-Matrixprotein .....	116
	<b>PRÄSENTATION DER ARBEIT AUF KONGRESSSEN UND TAGUNGEN .....</b>	<b>117</b>
	<b>VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>118</b>
	<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>119</b>
	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER .....</b>	<b>120</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>121</b>
	<b>EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>122</b>

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Die Bornasche Krankheit

Die Bornasche Krankheit, früher als „Kopfkrankheit“ oder enzootische Gehirn-Rückenmarksentzündung der Pferde bezeichnet, ist seit etwa 250 Jahren bekannt. Die Krankheit wurde nach der Stadt Borna in Sachsen benannt, als dort 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.

Der bedeutendste natürliche Wirt des 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 dabei von weniger als 100 Neuerkrankungen pro Jahr ausgegangen (Schwemmler, 1999a), es spricht allerdings vieles dafür, dass die Prävalenzrate 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. Von klinischen Erkrankungen in diesen Gebieten wurde aber bisher nicht berichtet.

An zweiter Stelle der Tierarten, die sich natürlicherweise mit BDV infizieren und auch erkranken, steht das Schaf, wenngleich auch 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 Erkrankungen bei

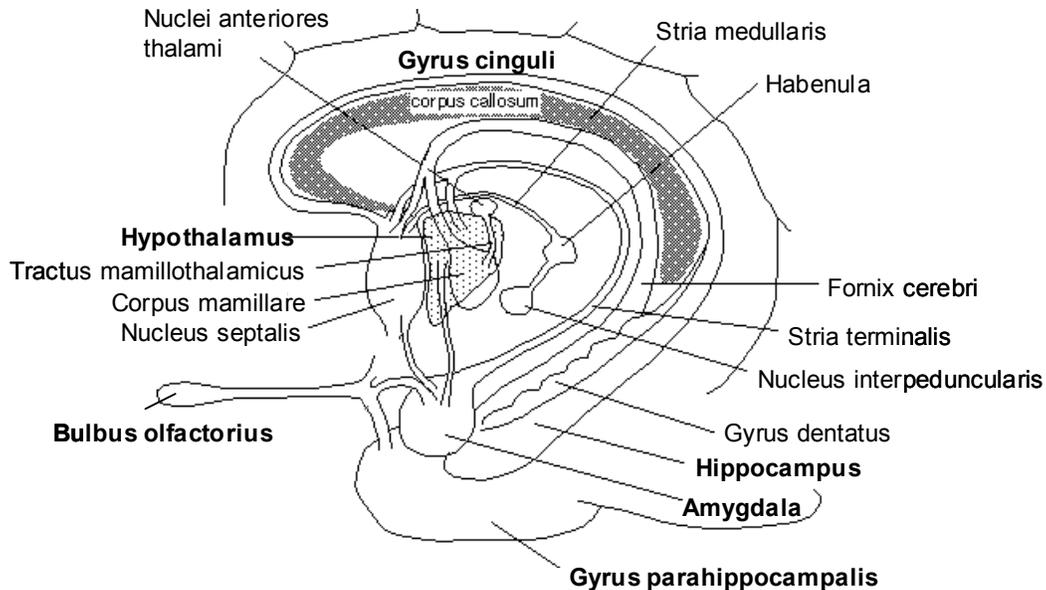
Kaninchen, Katzen (*staggering disease*), Rindern, Ziegen, Lamas, Alpakas, Straußen und beim Hirsch. Experimentell lassen sich eine Reihe von Tierarten nach *i.c.* oder *i.n.* Inokulation mit BDV infizieren. Das Spektrum reicht von Hnern bis zu Primaten.

In 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 in akut an Depressionen erkrankten Patienten gefunden, was zu dem Schluss führte, dass BDV mit psychiatrischen Erkrankungen beim Menschen einhergeht und als Kofaktor bei der Entwicklung dieser Krankheiten fungiert. 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 Blutproben von Patienten mit psychiatrischen Störungen jedoch von einer „Laborkontamination“ aus, da die verschiedenen Laboratorien den jeweils verwendeten Laborstamm auch in den Patientenproben nachwies (Schwemmler *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.

## **1.2 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. Als Übertragungsweg wird allgemein die oro-nasale Route angenommen; das Virus wird mit Speichel und Nasensekret ausgeschieden und durch direkten Kontakt oder kontaminierte Gegenstände verbreitet. Die primäre Virusvermehrung findet wahrscheinlich im Epithel des Nasen-Rachenraums statt. Von dort gelangt der Erreger per intra-axonalem Transport im *Nervus olfactorius* oder anderen Hirnnerven, die in der Schleimhaut des Oropharynx enden, in das

Zentrale Nervensystem (ZNS) und breitet sich dort ebenfalls intra-axonal sowie möglicherweise über die Zerebrospinalflüssigkeit aus. Dabei werden bevorzugt bestimmte Hirnareale infiziert, wie das Limbische System (Abb. 1), die *Substantia grisea*, *Bulbus olfactorius*, *Hippocampus*, *Nucleus caudatus* und *Nucleus niger* (Gosztonyi und Ludwig, 1984).



**Abb. 1: Das Limbische System** besteht im Wesentlichen aus den kortikalen Anteilen *Gyrus cinguli* und *Gyrus parahippocampalis*, dem *Hippocampus* und der *Amygdala*. Eng mit dem Limbischen System sind der *Hypothalamus* und das Riechhirn (*Bulbus olfactorius*) assoziiert. Das Limbische System ist Schaltstelle für die emotionale Bewertung von Situationen. Gefühle wie Furcht, Wut und Aggression entstehen unter Beteiligung von Großhirnrinde, *Thalamus* und *Hypothalamus*.

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. Dabei 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.*, 1994). BDV-spezifische CD8<sup>+</sup>-Zellen zerstören die BDV-infizierten Gehirnzellen. Ein Indiz für die Krankheitsentstehung ist die Erkenntnis, dass

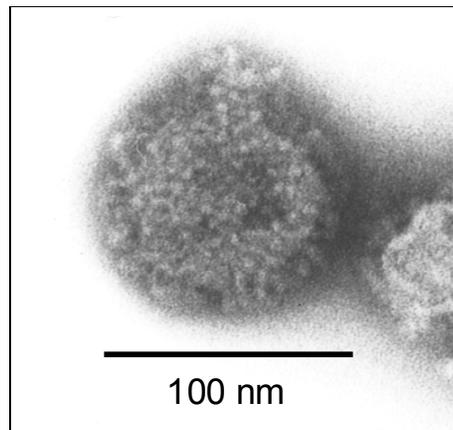
immunsupprimierte Ratten oder neugeborene Ratten persistierend mit BDV infiziert werden können, in Folge aber keine klinische Manifestation der Bornaschen Krankheit ausgebildet wird (Herzog *et al.*, 1985).

In ihrem klinischen Verlauf gehört die Bornasche Krankheit zu den *slow-virus-diseases*. Die Inkubationszeit beträgt im Durchschnitt vier Wochen, kann aber auch nur wenige Tage bis hin zu mehreren Monaten dauern (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 Zwangsbewegungen. Pferde beispielsweise stellen beim Fressen plötzlich das Kauen oder Schlucken ein. Weiterhin lassen sich Verhaltensstörungen (Depressionen, Erregungszustände), sowie andere sensorische und motorische Beeinträchtigungen beobachten. Der Krankheitsverlauf dauert 3 bis 20 Tage und endet in der Regel tödlich. Die Tiere sterben an Entkräftung, Aspirationspneumonien oder durch *Dekubitus* verursachte *Sepsis*. Überlebende Pferde zeigen häufig sensorische und motorische Folgeschäden (Becht und Richt, 1996).

### **1.3 Das Virus der Bornaschen Krankheit**

Das Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) ist ein umhülltes Virus mit einem nicht segmentierten RNA-Genom in Negativ-Strang-Orientierung und gehört zur Familie der *Bornaviridae* in der Ordnung der *Mononegavirales* (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994a; de la Torre, 1994). Im Gegensatz zu anderen Viren dieser Ordnung repliziert und transkribiert BDV im Kern der infizierten Zelle (Briese *et al.*, 1992; Cubitt *et al.*, 1994b, 1994c). Viruspartikel werden nur in sehr geringer Menge *in vivo* und *in vitro* gebildet, was auf die niedrige Syntheserate von Membranproteinen zurückzuführen sein könnte (Richt *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1997a; Schneider *et al.*, 1997b). Durch elektronenmikroskopische

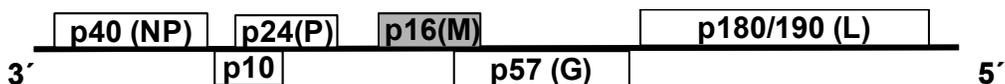
Untersuchungen ließen sich 90 bis 130 nm große umhüllte Viruspartikel darstellen, die 7 nm lange Spikes tragen (Abb. 2). Die Virionen werden wahrscheinlich durch Abschnürung an der Zelloberfläche gebildet (Richt *et al.*, 1993; Zimmermann *et al.*, 1994; Kohno *et al.*, 1999).



**Abb. 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines BDV-Partikels.** Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Eickmann.

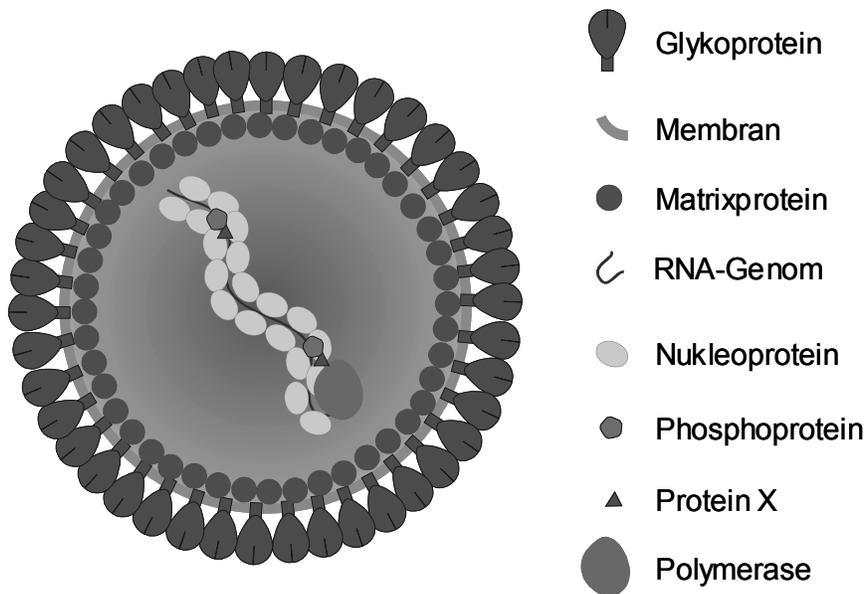
#### 1.4 Genomorganisation

Das Genom des Virus der Bornaschen Krankheit besteht aus einer 8,9 kB langen RNA in Negativ-Strang-Orientierung (de la Torre *et al.*, 1990), welches sechs offene, teilweise überlappende Leserahmen (ORF, *open reading frame*) enthält (Abb. 3).



**Abb. 3: Genomorganisation.** Das 8,9 kB lange Genom in Negativstrang-Orientierung enthält sechs teilweise überlappende offene Leserahmen.

ORF I kodiert für das Nukleoprotein p40 (NP), ORF II kodiert für das Phosphoprotein p24 (P), ORF III kodiert für das Matrixprotein p16 (M), welches auch unter der Bezeichnung gp18 für ein glykosyliertes Matrixprotein bekannt ist (Briese *et al.*, 1994; Kliche *et al.*, 1994; Stoyloff *et al.*, 1997). Der ORF IV kodiert für p57, auch als Glykoprotein gp94 (G) bezeichnet (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; Schwemmler *et al.*, 1998; Wehner *et al.*, 1997; Wolff *et al.*, 2000). Die Anordnung der verschiedenen Proteine im Virus-Partikel ist schematisch in Abb. 4 gezeigt.



**Abb. 4: Schema eines Virus-Partikels.** 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.

Verschiedene BDV-Stämme und Isolate aus unterschiedlichen Regionen der Welt wurden charakterisiert (Schwemmler *et al.*, 1999; Staeheli *et al.*, 2000). Der Vergleich der Nukleotid- und deren abgeleitete Aminosäuresequenzen zeigen eine Übereinstimmung der Aminosäuren

von 84 bis 95,5% unter allen Genprodukten (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 verschiedene Strategien 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.*, 1994b). Die Proteine werden nach den Spleißprozessen von diesen polycistronischen Primärtranskripten translatiert. Lediglich das Nukleoprotein (p40) wird als monocistronische mRNA transkribiert. Die Transkripte sind am 5'-Ende mit einer sogenannten *Cap*-Struktur ausgestattet und besitzen am 3'-Ende eine Polyadenylsequenz (Briese *et al.*, 1994; Cubitt *et al.*, 1994c).

## **1.5 Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit**

1985 isolierten Schädler und Mitarbeiter zum ersten Mal ein BDV-spezifisches Protein aus BDV-infizierten Zellen und Gehirn mit einem Molekulargewicht von 14,5 kDa (Schädler *et al.*, 1985). Dieselbe Isolierungsmethode führte jedoch später zur Identifizierung eines 18 kDa-Proteins, gp18 (Kliche *et al.*, 1994). Durch partielle Sequenzierung des isolierten Proteins wurde es dem ORF III zugeordnet, der in anderen *Mononegavirales* für das Matrixprotein kodiert. Da dieses Matrixprotein ein errechnetes Molekulargewicht von 16,2 kDa haben sollte, wurde die Differenz auf eine ungewöhnliche *N*-Glykosylierung zurückgeführt. In Lektin-Bindungsstudien wurden die Zucker *N*-Acetylglukosamin (GlcNAc), *N*-Acetylgalaktosamin (GalNAc), Mannose und Galaktose identifiziert (Stoyloff *et al.*, 1998). Die Behandlung mit verschiedenen Glykosidasen,

wie Endoglykosidase F, N-Glykosidase F und Endo- $\beta$ -Galaktosidase führten zu einer Reduktion des Molekulargewichts um 1-2 kDa, während O-Glykosidase und Endoglykosidase H keinen Einfluss zeigten. Zusammenfassend wurde auf ein biantennäres komplexe verzuckertes N-Glykan mit terminalen N-Acetylglukosamin-Resten und internen Mannose-Resten geschlossen. Da das Protein jedoch nicht die Konsensus-Sequenz für N-Glykosylierungen N-X-S/T besitzt, wurden zwei alternative Glykosylierungssequenzen in Betracht gezogen: die Sequenz N-I-Y an Aminosäure-Position 74-76 und die Sequenz L-N-S-L-S (AS 87-91) (Kliche *et al.*, 1994). Unter nativen und denaturierenden Bedingungen wurde gp18 (hier als gp17 beschrieben) als Tetramere mit einem Molekulargewicht von 68 kDa beschrieben (Stoyloff *et al.*, 1998).

Unter den *Mononegavirales* ist keines der Matrixproteine glykosyliert, da es sich um rein zytosolische, von innen mit der Hüllmembran der Viren assoziierte Proteine handelt. Es ist lediglich ein einziges glykosyliertes Matrixprotein bekannt. Hierbei handelt es sich um das Matrixprotein E1 des Coronavirus, das zu den *Coronaviridae* gehört, die ein einzelsträngiges RNA-Genom in Positiv-Strang-Orientierung besitzen. Das E1 ist an der oberflächenexponierten aminoterminalen Domäne O-glykosyliert und besitzt drei Transmembrandomänen (Niemann *et al.*, 1982, 1984).

Da monospezifische Antiseren und monoklonale Antikörper gegen das BDV-Matrixprotein neutralisierende Aktivität zeigten, wurde vermutet, dass gp18 ebenfalls auf der Oberfläche der Virushülle zu finden ist (Kliche *et al.*, 1994). Die Neutralisationsversuche wurden von Hatalski und Mitarbeitern 1995 bestätigt. Andere Studien konnten eine Lokalisation von gp18 an der Zelloberfläche jedoch nicht bestätigen (Gonzales-Dunia *et al.*, 1998; Furrer *et al.*, 2001).

Die bisher zum BDV-Matrixprotein publizierten Daten sind in Bezug auf seine N-Glykosylierung und Lokalisation sowohl ungewöhnlich wie auch kontrovers.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die Beschreibung von zwei Glykoproteinen auf der Oberfläche des Virus der Bornaschen Krankheit - einem Vertreter der Familie der *Mononegavirales*, die ausschließlich nur ein Oberflächenglykoprotein besitzen - gab den Ausschlag für die genaue Untersuchung der ungewöhnlichen Glykosylierung des Matrixproteins (gp18). In den vorangegangenen Arbeiten wurden die tatsächlichen Glykosylierungsstellen nicht identifiziert, sondern nur zwei mögliche alternative Motive vorgeschlagen.

In der Regel sind virale Matrixproteine nicht glykosyliert und kleiden die Innenseite der Membranhülle des Viruspartikels aus. Ihre Aufgabe ist dadurch definiert, dass sie die Interaktion zwischen der Virushülle mit dem eingelagerten Glykoprotein und dem Nukleokapsid vermitteln. Sie sind daher essentiell für den Zusammenbau der Viruspartikel und deren Freisetzung.

Das Matrixprotein als Glykoprotein und seine Lokalisation an der Zelloberfläche würden eine ganz andere Topologie und Funktion dieses Proteins mit sich bringen. An der Zelloberfläche lokalisierte virale Glykoproteine vermitteln die Interaktion des Viruspartikels mit Rezeptormolekülen auf der Oberfläche von Zielzellen und sind für die Fusion von Virus- und Zellmembran verantwortlich.

Zur Klärung dieses Sachverhaltes war es notwendig, die Prozessierung und Lokalisation des Matrixproteins zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die genaue Funktion im Viruspartikel zu ziehen.

Vor diesem Hintergrund sollte die Biosynthese, die mögliche Glykosylierung, Lokalisation und Membranassoziation des Matrixproteins untersucht werden. Zum Vergleich mit Matrixproteinen anderer Viren (Influenza, Ebola und Vesikular-Stomatitis-Virus) sollte die Proteinstruktur untersucht werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Chemikalien

β-Alanin	ICN, Ohio, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
Acrylamidlösung Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	Sigma, Deisenhofen
Aminocapronsäure	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Merck, Darmstadt
APS (Ammoniumpersulfat)	Biorad, München
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA (Rinderserumalbumin)	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blue R 250 Tabletten	Merck, Darmstadt
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2.2.2.]-octan)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
DMP (Dimethylpimelimidat)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
DOC (Desoxycholat, Na-Salz)	Sigma, Deisenhofen
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Ethidiumbromid	Boehringer, Mannheim
Formamid	Serva, Heidelberg
Glukose	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Biorad, München
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'- [2-ethansulfonsäure])	Sigma, Deisenhofen
IPTG (Isopropyl β-D-thiogalactopyranosid)	Roche, Mannheim
Isopropanol	Riedel-de-Haën, Seelze
Jodacetamid	Sigma, Deisenhofen

---

Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid (KOH)	Roth, Karlsruhe
Lithiumsulfat (Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
LMP-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Sigma, Deisenhofen
Methylgrün	ICN, Ohio, USA
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Riedel-de-Haën, Seelze
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt
OptiPrep™ (60% Iodixanol)	Sigma, Deisenhofen
PFA (Paraformaldehyd)	Serva, Heidelberg
PEG 8000 (Polyethylenglycol 8000)	Merck, Darmstadt
Protein A-Sepharose	Sigma, Deisenhofen
Pyronin G	Serva, Heidelberg
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck, Darmstadt
Selenomethionin, L-	Sigma, Deisenhofen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Biorad, München
Thiamin	Sigma, Deisenhofen
Trasylol® (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen
Triethanolamin	Sigma, Deisenhofen
Triethylamin	Fluka, Neu Ulm
Trifluoressigsäure	Fluka, Neu Ulm
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tween 20	Serva, Heidelberg
Uranylacetat	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β-D-galaktopyranosid)	Sigma, Deisenhofen

## 2.2 Geräte

ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer	Perkin Elmer, Norwalk, USA
ÄKTA FPLC	Amersham Pharmacia, Freiburg
Biofuge A	Heraeus, Hanau
Elektronenmikroskop EM T109	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Norwalk, USA
Lichtmikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
Microfuge 22 R	Hettich, Tuttlingen
Minifuge T	Heraeus, Hanau
Spectrophotometer DU-40	Beckmann, Frankfurt/Main
Ultraschallgerät Sonifier B-12	Branson, Danbury, USA
Ultrazentrifuge L8-55M	Beckmann, Frankfurt/Main

## 2.3 Kits

ABI PRIMS™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
DIG Glycan Differentiation Kit	Roche, Mannheim
High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep 8 Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La Jolla, USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden

## 2.4 Säulen

HiLoad® 16/60 Superdex® 75 prep grade	Amersham Pharmacia, Freiburg
HiPrep® 26/10 Desalting	Amersham Pharmacia, Freiburg
Mono S HR 5/5	Amersham Pharmacia, Freiburg
Superdex 200 HR 10/30	Amersham Pharmacia, Freiburg

## 2.5 Sonstiges

Alconox	Aldrich, Steinheim
Centricon-10	Millipore, Bedford, USA
Complete™ (Protease Inhibitor Mix)	Roche, Mannheim
Coomassie Plus Protein Assay Reagent	Pierce, Rockford, USA
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
DNA-Längenstandards (Mass Ruler DNA Ladder)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
DNA-Probenpuffer (6x)	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Einfrieröhrchen	Costar, Corning, USA
Microcon-10	Millipore, Bedford, USA
Mikrosomen	Promega, Madison, USA
	Dr. Dobberstein und Dr. Fröschke, Heidelberg
NAP-10 Säulen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nitrozellulosemembran, 0,45 µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Rainbow™ molecular weight markers	Amersham, Braunschweig
Röntgenfilme Biomax MR	Kodak, Rochester, USA
SuperSignal®	Pierce, Rockford, USA
SW60-Zentrifugenröhrchen	Beckmann, Frankfurt/Main
TNT® T7 Quick Master Mix	Promega, Madison, USA
Whatman 3MM-Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (75 cm <sup>2</sup> , 182 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatten mit 6, 24 Vertiefungen	Greiner, Frickenhausen

## 2.6 Radioaktive Verbindungen

Pro-Mix™ (L-[<sup>35</sup>S]-Methionin und L-[<sup>35</sup>S]-Cystein, 14,3 mCi/ml, >1000 Ci/mmol) Amersham-Buchler, Braunschweig

## 2.7 Enzyme

Endoglykosidase H (Endo H)	NEB, Schwalbach
Faktor Xa	Amersham Pharmacia, Freiburg
Peptid N-Glykosidase F (PNGase F)	NEB, Schwalbach
T4-DNA-Ligase	Roche, Mannheim

## 2.8 Restriktionsendonukleasen

<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Sal</i> I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

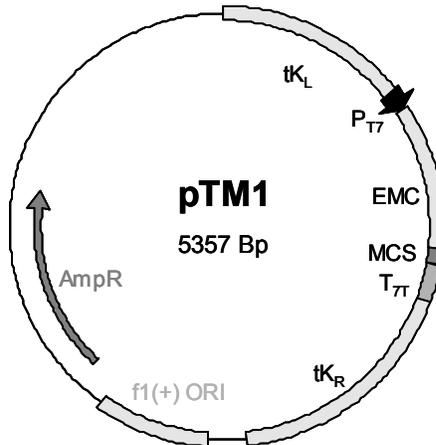
## 2.9 Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
gMA83Vfor	CCAGCAGGTCCTCCCTGGTCAACATATACTTCC
gMA83Vrev	GGAAGTATATGTTGACCAGGGAGTGACCTGCTGG
gMforBamHI	CTGGGATCCATGAATTCAAAACATTCCTAT
gMforL90T	CCTAACACTCAACTCAACGTCCGTGTACAAAGACC
gMforY76T	CCCTGGTCAACATAACCTTCCAGATTGACG
gMrevL90T	GGTCTTTGTACACGGACGTTGAGTTGAGTGTTAGG
gMrevSall	GTCGTCGACCTAAGGCCCTGAAGATCGAATG
gMrevY76T	CGTCAATCTGGAAGGTTATGTTGACCAGGG
gMR30Gfor	GCTTGAGATAGACTTTGTAGGAGGGACTTCACGGAACC
gMR30Grev	GGTTCGGTGAAGTCCCTCCTACAAAGTCTATCTCAAGC
pMAL-c2-for	GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC
pMAL-c2-rev	GGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAG

## 2.10 Vektoren

pTM1

erhalten von Dr. B. Moss  
(Moss *et al.*, 1990)



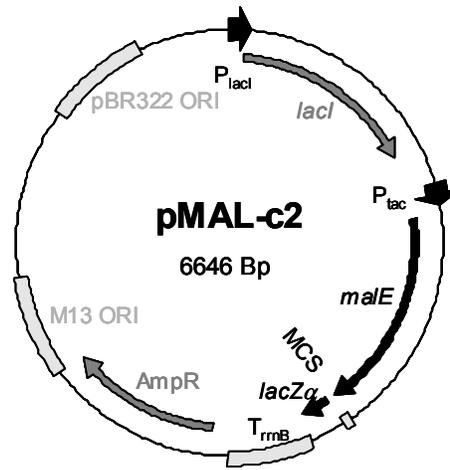
MCS:

<u>Nco I</u>	<u>Eco RI</u>	<u>Sma I</u> <u>Xma I</u>	<u>Sac I</u>	<u>Spe I</u>	<u>Bam HI</u>	<u>Pst I</u>	<u>Xho I</u>	<u>Stu I</u>	<u>Sal I</u>	<u>Hinc II</u>	<u>Acc I</u>
CCA TGG GAA TTC CCC GGG GAG CTC ACT AGT GGA TCC CTG CAG CTC GAG AGG CCT AAT TAA TTA AGT CGA C											

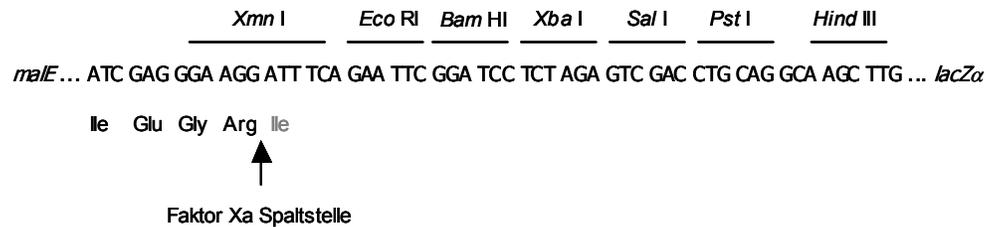
**Abb. 5: Eukaryotischer Expressionsvektor pTM1.** Die Vektorkarte zeigt den Promotor des Bakteriophagen T7 ( $P_{T7}$ ), dessen Terminator ( $T_{T7}$ ) und die untranslatierte Region des Enzephalomyokarditis Virus (EMC) als Ribosomen-Eintrittsstelle. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält Restriktionsschnittstellen zur Einklonierung des gewünschten Gens. Der Vektor besitzt weiterhin das Gen für Ampicillin-Resistenz (AmpR), die Gensequenz der Vaccinia Virus Thymidinkinase ( $tk_L$  und  $tk_R$ ) zur Rekombination in das Virusgenom und einen f1 Replikationsursprung (f1 (+) ORI).

pMAL-c2

NEB, Schwalbach



MCS:



**Abb. 6: Bakterieller Expressionsvektor pMAL-c2.** Die Vektorkarte zeigt das *lacI* Gen, welches für den *lac* Repressor kodiert, der die Transkription von  $P_{tac}$  vor Zugabe von IPTG unterbindet. Die multiple Klonierungsstelle (MCS) enthält Restriktionsschnittstellen, die zur Insertion des gewünschten Gens zwischen das *malE-lacZα*-Fusionsgen verwendet werden können. Der *rrnB* Terminator ( $T_{rrnB}$ ) verhindert die Interferenz von Transkription von  $p_{tac}$  und Plasmidreplikation oder Erhaltungsfunktionen. Weiterhin enthält der Vektor das Gen für Ampicillin-Resistenz (AmpR), einen M13 Replikationsursprung (M13 ORI) und einen pBR322 Replikationsursprung (pBR322 ORI).

## 2.11 Antikörper

Polyklonale Kaninchen-Antiseren (eigene Immunisierungen)

$\alpha$ M1	erkennt BDV-M AS 2-16	J.A. Richt, Gießen
$\alpha$ M128	erkennt BDV-M AS 128-142	J.A. Richt, Gießen
GA1/01	erkennt rekombinantes BDV-M	M. Eickmann, Marburg
GA2/01	erkennt rekombinantes BDV-M	M. Eickmann, Marburg
Prä-GA1/01	Präserum von GA1/01	M. Eickmann, Marburg
$\alpha$ gpC	erkennt BDV-G AS 288-302	J.A. Richt, Gießen

Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein,  
HRP gekoppelt

DAKO, Hamburg

Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein,  
FITC gekoppelt

DAKO, Hamburg

### 2.12.1 Bakterien

*E. coli*, Stamm XL-1 blue  
Stratagene, La Jolla, USA  
*recA1 endA1 gyrA96 thi hsdR17* ( $r_K^+$ ,  $m_K^+$ ) *supE44 relA1*  $\lambda^-$ ,  
*lac*, [F', *proAB*, *lacIqZ* $\Delta$ M15, Tn 10 tet<sup>r</sup>]  
(Bullock *et al.*, 1987)

*E. coli*, Stamm DH5 $\alpha$   
NEB, Schwalbach  
F<sup>-</sup>O<sup>-</sup> *recA1 endA1 hsdR17* ( $r_K^-$ ,  $m_K^+$ ),  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 $\phi$ 80d  
*lacZ* $\Delta$ M15 *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  
(Woodcock *et al.*, 1989)

*E. coli*, Stamm BL21 (DE3)  
Pharmacia Biotech, Freiburg  
F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ) *gal dcm* (DE3)  
(Wood, 1966)

*E. coli*, Stamm B843 (DE 3)  
Novagen, Schwalbach/Ts.  
F<sup>-</sup> *ompT hsdS<sub>B</sub>* ( $r_B^-$ ,  $m_B^-$ ) *gal dcm met* (DE3)  
(Wood, 1966)

### 2.12.2 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, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Pepton	Merck, Darmstadt

### 2.13.1 Eukaryotische Zellen

CEF [SL-21]:

ATCC Nummer: CRL-1590, Organismus: *Gallus gallus* (Huhn),

Gewebe: Embryo, Fibroblasten

BHK-21 [C-13]:

ATCC Nummer: CCL-10, Organismus: *Mesocricetus auratus*

(Syrischer Goldhamster), Gewebe: Niere, normal

HeLa:

ATCC Nummer: CCL-2, Organismus: *Homo sapiens* (Mensch),

Gewebe: Zervix, Adenokarzinom

C6:

ATCC Nummer: CCL-107, Organismus: *Rattus norvegicus*

(Ratte), Gewebe: Gehirn, Glia-Zellen, Gliom

MDCK [NBL-2]:

ATCC Nummer: CCL-34, Organismus: *Canis familiaris* (Cocker

Spaniel), Gewebe: Niere, normal

Vero:

ATCC Nummer: CCL-81, Organismus: *Cercopithecus aethiops*

(Grüne Meerkatze), Gewebe: Niere, normal

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

### 2.13.2 Puffer, Medien und Zusätze für die Zellkultur

PBS<sup>def</sup> (1 L): 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,15 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS<sup>++</sup> (1 L): PBS<sup>def</sup> mit 0,1 g MgCl<sub>2</sub>, 0,13 g CaCl<sub>2</sub>

BHK-21 Medium	Gibco BRL, Eggenstein
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
2x DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM ohne Cystein und Methionin	Sigma, Deisenhofen
FKS (Fötiales Kälberserum)	PAA, Linz, Österreich
FuGENE 6	Roche, Mannheim
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin 100x	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofektin	Gibco BRL, Eggenstein
MEM-Aminosäuren	Gibco BRL, Eggenstein
Opti-MEM	Gibco BRL, Eggenstein
Penicillin/Streptomycin 100x	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein
Tryptose-Phosphat-Lösung	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.14 Viren

BDV-No/98:

Isolat aus dem Gehirn eines Pony, Österreich (Nowotny *et al.*, 2000), in permanent infizierten Vero-Zellen

BDV-RW98:

Isolat aus humanem Blut (Schwemmle *et al.*, 1999b), in permanent infizierten Oligodendrozyten

BDV-He80:

Isolat aus dem Gehirn von Ratten (Carbone *et al.*, 1993), in permanent infizierten C6 und MDCK

BDV-V:

Isolat aus Pferd (Briese *et al.*, 1994), in permanent infizierten Vero-Zellen

MVA-T7:

Rekombinantes Vacciniavirus des Stammes Ankara, welches die T7-RNA-Polymerase exprimiert. Hergestellt und zur Verfügung gestellt von Dr. G. Sutter (Sutter *et al.*, 1995).

### **3       METHODEN**

#### **3.1       Isolierung und Quantifizierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

Die Methode zur Isolierung von Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterien, der anschließenden Adsorption der Plasmid-DNA an eine Silikamembran bei hohen Salzkonzentrationen und Elution in einem Puffer mit geringer Salzkonzentration.

##### **3.1.1    Präparation im kleinen Maßstab**

Zur Isolierung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA wurde das „QIAprep Spin Miniprep Kit“ oder das „QIAprep 8 Miniprep Kit“ der Firma Qiagen, Hilden samt der mitgelieferten Puffer verwendet.

Für die Reinigung der Plasmid-DNA wurden 5 mL einer rekombinanten Bakterienkultur eingesetzt, die über Nacht bei 37°C in *Luria Bertani* (LB)-Medium mit 1 mg/L Ampicillin gewachsen war. Die Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers isoliert und mit 50 µL 10 mM Tris/HCl pH 8,5 eluiert und bei -20°C gelagert.

##### **3.1.2    Präparation im großen Maßstab**

Zur Gewinnung von bis zu 500 µg Plasmid-DNA wurde das „QIAGEN Plasmid Maxi Kit“ der Firma Qiagen, Hilden samt der mitgelieferten Puffer verwendet.

Für die Reinigung der Plasmid-DNA wurden 100 mL einer rekombinanten Bakterienkultur eingesetzt, die über Nacht bei 37°C in LB-Medium und 1 mg/L Ampicillin inkubiert worden war. Die Plasmid-DNA wurde nach den Angaben des Herstellers isoliert und gefällt. Die gefällte Plasmid-DNA wurde in 100-200 µL 10 mM Tris/HCl pH 8,5 gelöst und bei -20°C gelagert.

### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch, wobei die Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Hierbei gilt die einfache Beziehung  $OD_{260} = 1$  entspricht 50  $\mu\text{g/mL}$  doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

## 3.2 Herstellung von Plasmid-DNA-Konstrukten

### 3.2.1 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die sich zwischen zwei mit der Matrizen-DNA antiparallel hybridisierenden Oligonukleotiden befindet (Mullis und Faloona, 1987).

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

Reaktionsansatz:

10 $\mu\text{L}$	10x PCR-Puffer
4 $\mu\text{L}$	dNTP-Mix S
30 pmol	Oligonukleotid 1
30 pmol	Oligonukleotid 2
4 $\mu\text{L}$	25 mM $\text{MgCl}_2$
200 ng	Matrizen-DNA
0,5 $\mu\text{L}$	Ampli <i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{L}$ )
<i>ad</i> 100 $\mu\text{L}$	<i>aqua bidest.</i>

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

Das PCR-Amplifikat wurde gereinigt (3.2.2) und zur Kontrolle durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert (3.2.5).

### 3.2.2 Reinigung von PCR-DNA-Fragmenten

Die Reinigung von PCR-DNA-Fragmenten zur Entfernung von Oligonukleotiden, Nukleotiden und Enzym und das Umpuffern verhindert Störungen bei anschließenden enzymatischen Reaktionen. Hierzu wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. Der Ansatz wurde mit 50 µL *aqua bidest.* von der verwendeten Silikamembran eluiert.

### 3.2.3 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA *in vitro*

Für die ortsgerechte Mutagenese wurde das „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Fa. Stratagene verwendet. Die Methode erlaubt die Mutagenese an doppelsträngiger DNA. Die verwendeten Oligonukleotide, welche die gewünschte Mutation tragen, sind jeweils komplementär zum Gegenstrang und werden von der *PfuTurbo™* DNA-Polymerase in einem Thermozykler verlängert. Durch die Endonuklease *Dpn I* wird die in *E. coli* methylierte und hemimethylierte parentale Matrizen-DNA gespalten. Die Plasmid-DNA mit der gewünschten Mutation wird in superkompetente Epicurian Coli® XL1-Blue transformiert. Die

Methode eignet sich für Punktmutationen und kleine Insertionen oder Deletionen.

Reaktionsansatz:

5	μL	10x Reaktions-Puffer
1	μL	dNTP-Mix
12,5	pmol	Oligonukleotid 1
12,5	pmol	Oligonukleotid 2
25	ng	Matrizen-DNA
2,5	μL	<i>PfuTurbo</i> <sup>™</sup> DNA-Polymerase (2,5 U/μL)
ad 100	μL	<i>aqua bidest.</i>

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
16	Denaturierung	95°C	30 Sekunden
	Hybridisierung	55°C	1 Minute
	Polymerisation	68°C	2 Minuten/kB Plasmid
1		4°C	∞

Nach erfolgter Elongation wurden zur Spaltung der nicht-mutierten Matrizen-DNA 10 U des Restriktionsenzym *Dpn* I zum Reaktionsansatz gegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 50 μL der superkompetenten Epicurian Coli® XL1-Blue wurden mit 1 μL der *Dpn* I-behandelten DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C und erneuter 2-minütiger Inkubation auf Eis wurden 0,5 mL auf 42°C erwärmtes LB-Medium zugegeben und für 1 Stunde bei 37°C geschüttelt. Der gesamte Transformationsansatz wurde auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.2.4 Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

1 µg doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mit 10 U der Restriktionsendonuklease und 1 µL des entsprechenden 10x Inkubationspuffers in einem 10 µL Ansatz für 1 Stunde bei 37°C gespalten.

### 3.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungen oder PCR-Amplifikate wurden in Agarosegelen in 0,5x TBE-Puffer und einer Spannung von 6 V/cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Je nach Größe der Fragmente wurden 0,7 - 1,5 %ige Agarosegele in 0,5x TBE-Puffer verwendet. Die DNA wurde zum Beladen des Gels mit 6x DNA-Probenpuffer (MBI Fermentas) gemischt. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 15 Minuten in 0,006% (w/v) Ethidiumbromid/0,5x TBE-Puffer geschwenkt und die DNA-Banden unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht. Als Marker wurden DNA-Längenstandards (MBI Fermentas) verwendet.

10x TBE-PUFFER: 1 M Tris, 830 mM Borsäure, 12,7 mM EDTA

### 3.2.6 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurden die DNA-Fragmente unter langwelligem UV-Licht (365 nm) mit dem Skalpell ausgeschnitten und das „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Fa. Qiagen, Hilden verwendet. Die Reinigung beruht auf der Bindung von DNA an eine Silikamembran bei hohen Salzkonzentrationen und Elution bei niedriger Salzkonzentration. Die DNA wurde in 30 µL *aqua bidest.* eluiert.

### 3.2.7 Ligation

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

DNA-Konzentrationen von restriktionsbehandeltem Plasmid bzw. Insert (3.2.4) wurden nach Auftrennung im Agarosegel und Ethidiumbromid-färbung (3.2.5) anhand der Bandenintensität im Vergleich zum verwendeten DNA-Längenstandard (MassRuler™ DNA Ladder, MBI Fermentas) bestimmt. Die Plasmid-DNA wurde in einem molaren Verhältnis von 1:5 zur Insert-DNA in der Ligation eingesetzt. In einem Gesamtvolumen von 25 µL wurden 100 ng Plasmid-DNA mit einer entsprechenden Menge Insert-DNA, 2,5 µL 10x Ligationspuffer und 1 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert.

## 3.3 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien

### 3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

50 mL LB-Medium wurden mit 1 mL einer über Nacht gewachsenen Bakterienkultur inokuliert und bei 37°C bis zu einer  $OD_{595} = 0,5$  auf dem Schüttler inkubiert. Die Zellen wurden für 20 Minuten auf Eis gekühlt, für 10 Minuten bei 1.200x *g* und 4°C zentrifugiert und in 5 mL kaltem TSS-Puffer resuspendiert. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die kompetenten Zellen zur Transformation eingesetzt.

TSS-PUFFER: 10% (w/v) Polyethylenglycol 8000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgCl<sub>2</sub> in LB-Medium, steril filtrieren, bei 4°C lagern

### 3.3.2 Transformation

Für die Transformation wurden zu 200 µL der kompetenten Zellen 0,2 µg Plasmid-DNA gegeben und der Ansatz für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C wurden 0,8 mL LB-Medium zu den Zellen gegeben und die Suspension zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. 1/10 bzw. 9/10 des Ansatzes wurden zur Selektion plasmidtragender Klone auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

### 3.3.3 Glycerin-Kultur

Zu 500 µL 87% (w/v) Glycerin (steril) wurden 500 µL Bakterien-Kultur gegeben und die Glycerin-Kultur bei -20°C gelagert.

## 3.4 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung wurde mit doppelsträngiger DNA nach der für einen Thermozykler modifizierten Didesoxy-Kettenabbruch-Methode (Sanger *et al.*, 1977) zur Kontrolle von Subklonierungen und zum Nachweis erfolgter Mutagenesen durchgeführt.

### 3.4.1 Sequenzierungsreaktion

Für die enzymatische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden wurden die Reagenzien des „ABI PRIMS™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ (Perkin Elmer) verwendet.

Für einen 20 µL Ansatz wurden 0,5 µg Matrizen-DNA, 10 pmol Oligonukleotid und 4 µL „Terminator Ready Reaction Mix“ verwendet. Dieser Mix enthält die *Ampli Taq* DNA-Polymerase, die Nukleotide dTTP, dATP, dCTP, dTTP und deren fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Analoga. Die Elongation der Oligonukleotide erfolgte während der Inkubation im Thermozykler.

Anzahl Zyklen	Vorgang	Temperatur	Dauer
1	Denaturierung	96°C	5 Minuten
25	Denaturierung	96°C	10 Sekunden
	Hybridisierung	50°C	5 Sekunden
	Polymerisation	60°C	4 Minuten
1		4°C	∞

Nach erfolgter Elongation der Oligonukleotide wurde der Ansatz mit *aqua bidest.* auf 100 µL eingestellt, 10 µL 3 M Na-Acetat (pH 5,5) und 250 µL Ethanol zugegeben und zur Fällung der Oligonukleotide für 30 Minuten bei 4°C und 20.000x *g* zentrifugiert. Die präzipitierte DNA wurde in 250 µL 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, unter Vakuum getrocknet und in 2 µL Formamid/EDTA-Probenpuffer resuspendiert. Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzieransätze im Harnstoff-Polyacrylamidgel wurden die Proben für 2 Minuten bei 96°C denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert.

FORMAMID/EDTA-PROBENPUFFER: 5 VT Formamid, 1 VT 25 mM EDTA (pH 8,0)

### 3.4.2 Herstellung des Sequenziergels und Elektrophorese

Die mit Alconox und 10%igem (v/v) Isopropanol gründlich gereinigten Glasplatten (36 cm Länge) wurden, getrennt durch 0,2 mm dicke Abstandhalter, im Gelrahmen fixiert. Die Polymerisation der 5%igen Polyacrylamid-Harnstoff-Lösung wurde durch Zugabe von 20 µL TEMED und 300 µL 10%igem (w/v) APS eingeleitet. Die Polyacrylamid-Harnstoff-Lösung wurde zwischen die Glasplatten gegossen und die Rückseite des Kammes eingesteckt. Nach Polymerisation wurde das Gel in den Sequenzierautomaten (ABI PRISM™ 377 DNA Sequencer) eingebaut. Der Vorlauf wurde für 60 Minuten bei einer Spannung von 1680 V in TBE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurden je 2 µL der Sequenzierproben

bei 1680 V, 50 mA, 51°C für die Dauer von 10 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Aufzeichnung des Bandenmusters erfolgte über ein Fluoreszenz-Detektions-System, das mit Hilfe eines Argonlasers (Hauptemission bei  $\lambda=488$  nm und  $\lambda=514,5$  nm) die markierten DNA-Fragmente zur Emission von Fluoreszenzstrahlung anregte. Das Spektrum wurde mit einer CCD-Kamera aufgenommen. Der Detektorchip der CCD-Kamera wandelte das Lichtsignal in ein digitales Signal um, das von einem Rechner und einem Programm (ABI PRISM™ 377 Data Collection Programm) in ein Gelbild umgesetzt wurde. Aus dem Gelbild konnte die Nukleotidsequenz der zu sequenzierenden DNA ermittelt werden.

POLYACRYLAMID-HARNSTOFF-LÖSUNG: 21 g Harnstoff, 8,4 mL 30% (w/v)  
Acrylamid-Lösung, 20 mL *aqua bidest.*, 6 mL 10x TBE-Puffer  
10X TBE-PUFFER: 1 M Tris, 830 mM Borsäure, 12,7 mM EDTA

### **3.5 Zellkulturtechniken**

In dieser Arbeit wurden HeLa-, Vero-, C6-, MDCK-, BHK-21 und CEF-Zellen kultiviert. Die Zellen wurden in 250 mL-Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) der Fa. Greiner gezüchtet. Als Kulturmedium wurde für alle Zellen *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) mit 10% (v/v) FKS, 2 mM L-Glutamin, 50 U/mL Penicillin und 50 µg/mL Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> begast und bei einer konstanten Temperatur von 37°C inkubiert.

#### **3.5.1 Passagierung von Kultur-Zellen**

Zum Passagieren wurden konfluent gewachsene Zellen zweimal mit je 10 mL vorgewärmtem PBS<sup>def</sup> gewaschen und mit 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in 10 mL PBS<sup>def</sup> resuspendiert und ein Teil der Zellsuspension in neue Kulturflaschen mit 20 mL Medium passagiert.

### 3.5.2 Einfrieren und Auftauen von Kultur-Zellen

Zellen können in Anwesenheit von 10% Glycerin in flüssigem Stickstoff (-180°C) über einen längeren Zeitraum aufbewahrt werden. Nach dem Ablösen einer konfluent bewachsenen Kulturflasche mit Trypsin/EDTA-Lösung (3.5.1) wurden die Zellen in 10 mL PBS<sup>def</sup> suspendiert und zentrifugiert (500x g, 5 Minuten, Raumtemperatur). Das Zellpellet wurde in 1 mL DMEM/20% (v/v) FKS/10% (w/v) Glycerin resuspendiert und in ein 2 mL-Einfrieröhrchen (Costar) gegeben. Zunächst wurden die Zellen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C langsam heruntergekühlt und nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Einfrierröhrchen mit der Zellsuspension aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C im Wasserbad aufgetaut. Nach dem Auftauen wurden die Zellen sofort in eine Kulturflasche mit 20 mL vorgewärmtem Medium überführt, die Zellen im 37°C-Brutschrank anheften lassen und anschließend das Medium gewechselt.

### 3.6 MVA-T7-Expressionssystem

Das MVA-T7-Expressionssystem verwendet das modifizierte Vaccinia-Virus des Stammes Ankara-T7 (MVA-T7), das die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 exprimiert (Fuerst *et al.*, 1986; Sutter *et al.*, 1995). Zur Expression wurden Zellen mit einer M.O.I. (*multiplicity of Infection*, Zahl der infektiösen Partikel pro Zelle) von 10 mit MVA-T7 infiziert und danach mit einem Plasmid, dessen zu exprimierendes Gen unter der Kontrolle eines T7-Promotors steht, transfiziert. Plasmide wie pTM1 (2.10), die neben dem T7-Promotor noch eine interne ribosomale Eintritts-Stelle (IRES, *internal ribosomal entry site*) besitzen, ermöglichen eine höhere Expressionsrate.

### 3.6.1 Herstellung einer MVA-T7 Virusstammsuspension

Bei MVA-T7 handelt es sich um einen Sicherheitsstamm des Vaccinia-Virus mit stark eingeschränktem Wirtstropismus. Zwar lassen sich eine Vielzahl von verschiedenen Zelllinien mit diesem Virus infizieren, doch erlauben nur Hühnerembryozellen (CEF, *chicken embryo fibroblast*) und BHK-21-Zellen eine Vermehrung des Virus (Carroll und Moss, 1997). Es wurden jedoch ausschließlich CEF verwendet, da die Vermehrung auf CEF einen höheren Virus-Titer ergab.

Die Hühnerembryozellen wurden in 550 mL-Zellkulturflaschen (182 cm<sup>2</sup>) der Fa. Greiner kultiviert. Die konfluenten Zellen wurden mit Medium gewaschen und dann mit 100 µL einer MVA-T7 Stammsuspension (10<sup>8</sup> PFU/mL) in 10 mL Medium infiziert. Nach 1 Stunde Virusadsorption auf dem Kippschüttler im Brutschrank bei 37°C wurde das Infektionsmedium abgenommen und durch 25 mL DMEM/2% (v/v) FKS ersetzt. Nach 48-72 Stunden bei 37°C zeigten 80% der Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt. Zur Virusgewinnung wurden die Zellen mit einem Zellschaber ins Medium abgeschabt und bei 4°C und 1.300x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Medium gewaschen und schließlich in 1,5 mL Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dreimal mit einem Trockeneis/Ethanol-Gemisch eingefroren und wieder aufgetaut sowie dreimal für 30 Sekunden bei 400 Watt im Ultraschallgerät Sonifier 450 beschallt. Der Vorrat an Virussuspension wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

### 3.6.2 Bestimmung des Virus-Titers

Da das rekombinante MVA-T7 Virus ein *LacZ*-Gen als Selektionsmarker trägt, lässt sich dieses für einen Plaquetest nutzen. Das Genprodukt des *LacZ*-Gens ist die β-Galaktosidase, die X-Gal umsetzt und somit infizierte Zellen blau färbt.

BHK-21-Zellen wurden in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen (Fa. Greiner) ausgesät und bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen zu 80% konfluent waren, wurden sie zweimal mit PBS<sup>++</sup> gewaschen und mit 500 µL einer

Virusverdünnung ( $10^{-3}$  -  $10^{-8}$  in PBS<sup>++</sup>) für 1 Stunde infiziert. 1,8% (w/v) LMP-Agarose in *aqua bidest.* wurde aufgekocht, auf 42°C abkühlen lassen und 1+1 mit 2x DMEM (42°C) gemischt. Das Inokulum wurde von den infizierten Zellen entfernt und diese mit je 2 mL LMP-Agarose/DMEM überschichtet. Nach Erstarren der Agarose wurden die Zellen 2 Tage im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit je 2 mL LMP-Agarose/DMEM (42°C) plus 20 µL einer X-Gal Stammlösung (40 mg X-Gal/mL DMSO) überschichtet und nach Erstarren der Agarose für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Durch Auszählen der blau gefärbten Plaques wurden die PFU/mL bestimmt.

### **3.6.3 Infektion der Zellen mit MVA-T7**

Die eukaryotischen Zellen wurden in Kulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und bei 37°C inkubiert. Sobald die Zellen zu 80% konfluent waren, wurden sie zweimal mit serumfreien DMEM gewaschen und dann mit einer M.O.I. von 10 ( $7 \times 10^5$  PFU in 0,5 mL serumfreien Medium) infiziert. Die Virusadsorption fand für 1 Stunde bei 37°C auf dem Kippschüttler statt.

### **3.6.4 Transfektion der Zellen mit Lipofektin**

Lipofektin (Fa. Gibco) ist ein Liposomen-Gemisch aus bestimmten kationischen Phospholipiden. Nach Zugabe von Plasmid-DNA bilden sich spontan Lipid-DNA-Komplexe aus, die von der Zelle aufgenommen werden können. In der Zelle kommt es dann zur Expression des gewünschten Gens.

Im folgenden wurden mit MVA-T7 infizierte HeLa-Zellen für die Transfektion verwendet. Dazu wurden zunächst zwei Ansätze hergestellt: für Ansatz A wurden 2,5 µL Lipofektin zu 0,75 mL serumfreien DMEM gegeben, für Ansatz B 2,5 µg DNA zu 0,75 serumfreien DMEM. Ansatz B wurde tropfenweise zu Ansatz A gegeben und für 30 Minuten inkubiert. Das Inokulum wurde entfernt und die Zellen mit 1,5 mL Transfektionsansatz für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit

PBS<sup>def</sup> gewaschen, in 1 mL PBS<sup>def</sup> abgeschabt und bei 450x *g* für 4 Minuten bei 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 µL 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, dreimal mit 60 Impulsen (400 Watt) beschallt, für 5 Minuten bei 96°C aufgekocht, durch SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt und für einen Western Blot (3.10.1) eingesetzt.

### **3.7 BHK-T7-Expressionssystem**

Die verwendeten BHK-Zellen exprimieren die DNA-abhängige RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7, da sie das Gen stabil in ihr Genom integriert haben. Die Transfektion eines Expressionsplasmids, dessen Zielgen unter Kontrolle eines T7-Promotors steht, führt zur Produktion des gewünschten Proteins.

Als Kulturmedium wurde BHK-21-Medium (Glasgow MEM, Fa. Gibco) mit L-Glutamin verwendet, dem Tryptose-Phosphat-Lösung, MEM-Aminosäuren und 10% (v/v) FKS zugesetzt wurden. Dem Kulturmedium wurde zur Selektion Geneticin (G418, Fa. Gibco) in einer Endkonzentration von 1 mg/mL zugesetzt.

#### **3.7.1 Transfektion der Zellen mit FuGENE 6**

Das FuGENE 6 Transfektionsreagenz der Fa. Roche besteht aus einer Mischung verschiedener Lipide und anderer Zusätze in 80% Ethanol.

Zur Transfektion wurde eine Kulturplatte mit 6 Vertiefungen mit 50% konfluenten BHK-T7-Zellen auf Glasplättchen verwendet. Die Zellen wurden mit Opti-MEM gewaschen und für 1 Stunde mit 1 mL Opti-MEM pro Vertiefung inkubiert. Für die Transfektionslösung wurde das FuGENE 6 Reagenz direkt in 1 mL Opti-MEM pipettiert, kurz geschwenkt und dann die gewünschte Plasmid-DNA zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde für 45 Minuten inkubiert und dann zu den Zellen gegeben. Nach 6 Stunden wurde der Transfektionsansatz entfernt und durch BHK-21-Medium (3.7) ersetzt. Die Glasplättchen für die Immunfluoreszenz (3.10.2) wurden nach 48 Stunden entnommen und fixiert (3.10.2.1). Die restlichen Zellen der 6er-Vertiefungen wurden zweimal mit kaltem PBS<sup>def</sup>

gewaschen, in 1 mL PBS<sup>def</sup> abgeschabt und bei 450x g für 4 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µL 2x SDS-Probenpuffer resuspendiert, dreimal mit 60 Impulsen (400 Watt) beschallt, für 5 Minuten bei 96°C aufgekocht und nach SDS-PAGE (3.9.1) für einen Western Blot (3.10.1) eingesetzt.

### **3.8 *In vitro* Transkription/Translation in Ab- und Anwesenheit von Mikrosomen**

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde das „TNT® T7 Quick Master Mix“ (Promega) verwendet, einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat welches die T7-RNA-Polymerase, Nukleotide, Salze und RNasin® (Ribonuklease-Inhibitor) enthält. Durch Zugabe einer Plasmid-DNA, deren Zielgen unter der Kontrolle des T7-Promotors steht, wurde das gewünschte Protein hergestellt.

Für einen Ansatz wurden 20 µL des TNT-Mix, 1 µL S<sup>35</sup>-Methionin/Cystein (= 10 µCi) und 0,5 µg Plasmid-DNA für 90 Minuten bei 30°C inkubiert. Das radioaktiv markierte Produkt wurde durch SDS-PAGE (3.9.1) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie (3.9.4) dargestellt.

Mikrosomale Membranen aus dem Pankreas von Hunden sind Vesikel, die zur Untersuchung von kotranslationalen und post-translationalen Modifikationen eingesetzt werden. Dazu gehören Abspaltung eines Signalpeptides, Membran-Insertion, Translokation und Glykosylierung.

Zu dem oben beschriebenen *in vitro* Transkriptions/Translationsansatz wurden 1-2 µL der Mikrosomen-Präparation zugegeben und wie beschrieben inkubiert.

### 3.9 Auftrennung von Proteinen durch Gelelektrophorese

#### 3.9.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der zu untersuchenden Proteingemische wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) durchgeführt. Dazu wurde ein 12, 15 oder 18%iges Polyacrylamidgel (Trenngel) mit einem 3,75%igen Polyacrylamidgel (Sammelgel) überschichtet. Das Gel wurde mit den Proteingemischen in SDS-Probenpuffer beladen und die Proteine mit einer Spannung von 150 V aufgetrennt, bis die Lauffront die untere Gelkante erreicht hatte. Zur Abschätzung der Molekulargewichte der Proteine wurde ein Protein-Marker (Amersham) verwendet.

	Trenngel			Sammelgel
	12%	15%	18%	3,75%
Acrylamidlösung Gel 30	4 mL	5 mL	6 mL	1,7 mL
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	--
1 M Tris/HCl pH 6,8	--	--	--	3,4 mL
10% (w/v) SDS	100 µL	100 µL	100 µL	133 µL
<i>aqua bidest.</i>	3,3 mL	2,3 mL	1,3 mL	8,2 mL
Pyronin G	--	--	--	53 µL
10% (w/v) APS	100 µL	100 µL	100 µL	53 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5µL	20 µL

2X SDS-PROBENPUFFER: 100 mM Tris/HCl pH 6,8, 4% (w/v) SDS, 10% (v/v) 2-Mercaptoethanol, 20% (w/v) Glycerin und 0,05% (w/v) Bromphenolblau

10X SDS-LAUFFUFFER: 250 mM Tris, 1% (w/v) SDS, 14,4% (w/v) Glycerin

### 3.9.2 Nicht-denaturierende Gele für basische Proteine

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.

Zur Analyse der Multimerisierung wurde ein 15%iges natives Polyacrylamidgel (Trenngel) mit einem 3,75%igen nativen Polyacrylamidgel (Sammelgel) verwendet (Creighton, 1997).

	Trenngel (nativ)	Sammelgel (nativ)
	15%	3,75%
Acrylamidlösung Gel 30	6 mL	1 mL
8x Gelpuffer pH 4	1,5 mL	--
8x Gelpuffer pH 5	--	1 mL
<i>aqua bidest.</i>	4,5 mL	6 mL
10% (w/v) APS	120 µL	31 µL
TEMED	36 µL	72 µL

8X GELPUFFER PH 4: 12,8% (v/v) Essigsäure/KOH pH 4,0

8X GELPUFFER PH 5: 4,3% (v/v) Essigsäure/KOH pH 5,0

4X ELEKTROPHORESE-PUFFER: 160 mM  $\beta$ -Alanin/Essigsäure pH 4,0

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

### 3.9.3 Färbung von Proteinen im Gel

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 20 Minuten bei Raumtemperatur in Coomassie Färbelösung geschwenkt und zum Entfärben in *aqua bidest.* in der Mikrowelle aufgeköcht.

COOMASSIE FÄRBE LÖSUNG: 16 Tabletten Coomassie R 250 pro Liter,  
40% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure

### **3.9.4 Fixierung und Autoradiographie**

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach SDS-PAGE durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele für 30 Minuten in 30% (v/v) Ethanol/10% (v/v) Essigsäure fixiert und auf einem angefeuchteten Whatman 3MM-Filterpapier unter Vakuum getrocknet. Das Gel wurde entweder über Nacht auf einer Phospho-Imager-Platte inkubiert oder mehrere Tage auf einen Röntgenfilm (Biomax) aufgelegt.

## **3.10 Spezifischer Nachweis und Analyse von Proteinen**

### **3.10.1 Western Blot Analyse**

Zur Übertragung gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) wurde die Semidry-Methode (Kyhse-Anderson *et al.*, 1984) angewandt. Für den elektrophoretischen Transfer wurden 6 in Anodenpuffer I und 3 in Anodenpuffer II getränkte Filterpapiere auf die Anodenplatte aus Graphit gelegt, darüber die in *aqua bidest.* angefeuchtete Nitrozellulosemembran, das Proteingel und 6 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Die Kathoden-Graphitplatte wurde aufgelegt und die Proteine durch Anlegen einer Stromstärke von 0,8 mA pro  $\text{cm}^2$  für 1,2 Stunden auf die Nitrozellulosemembran transferiert.

Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit 3% (w/v) BSA in PBS<sup>def</sup>/0,1% (w/v) Tween abgesättigt und anschließend dreimal für 10 Minuten in PBS<sup>def</sup>/0,1% (w/v) Tween gewaschen. Die Membran wurde mit dem 1:2000 in PBS<sup>def</sup>/0,1 (w/v) Tween verdünnten spezifischen Erstantikörper für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer auf Parafilm inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal in PBS<sup>def</sup>/0,1% (w/v) Tween gewaschen und für 1 Stunde mit dem 1:2000 verdünnten Zweitantikörper (spezifisch für den Fc-Teil des Erstantikörpers und mit Peroxidase

gekoppelt) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde die Membran kurz in PBS<sup>def</sup> geschwenkt und die gebundene Peroxidase durch Chemolumineszenz mit SuperSignal (Fa. Pierce) nachgewiesen. Dazu wurden Röntgenfilme Biomax MR der Fa. Kodak verwendet.

ANODENPUFFER I: 300 mM Tris/HCl pH 9,0, 20% (v/v) Ethanol

ANODENPUFFER II: 25 mM Tris/HCl pH 7,4, 20% (v/v) Ethanol

KATHODENPUFFER: 25 mM Tris/HCl pH 9,0, 40 mM Aminocaprinsäure,  
20% (v/v) Ethanol

### **3.10.2 Indirekte Immunfluoreszenz**

Zelluläre und virale Proteine auf Zelloberflächen oder in permeabilisierten Zellen können durch die Immunfluoreszenz-Technik sichtbar gemacht werden. Bei der direkten Immunfluoreszenz ist der antigenspezifische Antikörper selbst mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt, bei der indirekten Immunfluoreszenz werden die Antigen-Antikörper-Komplexe erst durch einen zweiten Rhodamin- oder Fluorescein-konjugierten Antikörper markiert. Diese sogenannte „Sandwich“-Technik erhöht im allgemeinen das Fluoreszenz-Signal, da mehrere markierte Antikörper an einen Erstantikörper binden können.

#### **3.10.2.1 Fixierung**

Zellen wurden auf Glasplättchen ausgesät und bei 37°C inkubiert, bis sie zu 50-80% konfluent waren. Die Glasplättchen wurden in eine Kulturplatte mit 24 Vertiefungen überführt und auf Eis zweimal mit kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen. Zur Fixierung mit Paraformaldehyd wurde 1 mL kaltes 4% (w/v) PFA/DMEM zugegeben und für mindestens 1 Stunde auf Eis fixiert. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen und freies Paraformaldehyd mit 1 mL 50 mM Ammoniumchlorid für 30 Minuten auf Eis inaktiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal mit kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen. Zur Darstellung von Proteinen auf der Zelloberfläche erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern (3.10.2.3) direkt

nach der Fixierung. Um intrazelluläre Proteine zu lokalisieren, müssen die Zellen zunächst permeabilisiert werden.

4% (w/v) PFA IN DMEM: 4 g PFA bei 60-70°C in 100 mL DMEM lösen, mit Faltenfilter filtrieren und bei -20°C lagern

### **3.10.2.2 Permeabilisierung**

Da Zellmembranen für Antikörper undurchlässig sind, müssen die Zellen erst permeabilisiert werden, damit auch Antigene im Zellinneren erreicht werden können. Die Zellen wurden für 5 Minuten in 0,2% (w/v) Tween 20/PBS<sup>def</sup> inkubiert und anschließend zweimal mit PBS<sup>def</sup> gewaschen.

### **3.10.2.3 Inkubation mit Antikörpern**

Vor der Inkubation mit Antikörpern wurden die Zellen für 15 Minuten in Blockierungspuffer abgesättigt. Die Inkubation mit den spezifischen Erstantikörpern fand in einer feuchten Kammer auf Parafilm statt. Darauf wurden pro Glasplättchen 20 µL der in Blockierungspuffer 1:100 verdünnten Antikörperlösung gegeben und die Plättchen luftblasenfrei aufgelegt. Nach einer Inkubation von 1 Stunde bei Raumtemperatur wurden die Plättchen zweimal in PBS<sup>def</sup> gewaschen und danach wie oben beschrieben mit dem Zweitantikörper (FITC-gekoppelt) inkubiert.

BLOCKIERUNGSPUFFER: 2% (w/v) BSA, 5% (w/v) Glycerin, 0,2% (w/v) Tween 20, 0,05% (w/v) NaN<sub>3</sub> in PBS<sup>def</sup>

### **3.10.2.4 Eindeckeln**

Nach der Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Glassplättchen zuerst mit PBS<sup>def</sup> und danach mit *aqua bidest.* gewaschen, um sie von störenden Salzen zu befreien. Die überschüssige Flüssigkeit wurde durch Abtropfen auf einem Filterpapier entfernt. Die Glasplättchen wurden mit

7  $\mu\text{L}$  Eindeckellösung (Mowiol/DABCO) auf Objektträgern luftblasenfrei eingedeckelt.

EINDECKELLÖSUNG: 2,4 g Mowiol 4-88, 6 g Glycerin, 6 mL *aqua bidest.* über Nacht quellen lassen, 12 mL 0,2 M Tris/HCl pH 8,5 zugeben, bei 50°C lösen, 15 Minuten bei 3.400x g zentrifugieren, den Überstand mit 10% (w/v) DABCO versetzen, bei -20°C lagern

### 3.10.3 Radioaktive Markierung von Proteinen

Mit Hilfe von  $^{35}\text{S}$ -Methionin und  $^{35}\text{S}$ -Cystein können Proteine metabolisch radioaktiv markiert werden. Zunächst wurden zu 80-90% konfluente Zellen mit PBS<sup>def</sup> gewaschen und dann für 1 Stunde mit methioninfreiem Kulturmedium inkubiert. Danach wurde das Medium unter Zugabe von 50-100  $\mu\text{Ci/mL}$   $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein erneuert. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurde der Zellkultur-Überstand abgenommen. Der Zellrasen wurde dreimal mit kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen und in Extraktionspuffer (RIPA-Puffer) (siehe 3.10.4) abgeschabt. Der Zellextrakt wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend mit 20 Impulsen (400 Watt) beschallt und unlösliche Aggregate durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 20.000x g und 4°C pelletiert.

### 3.10.4 Immunpräzipitation

Für die Isolierung bestimmter viraler Antigene aus infizierten oder transformierten Zellen kann mit spezifischen Antikörpern und dem bakteriellen Protein A (aus *Staphylococcus aureus*), welches den Fc-Teil der Antikörper bindet und mit der Trägermatrix Sepharose konjugiert ist, das gewünschte Protein präzipitiert werden.

Der Überstand des Zellysats (siehe 3.10.3) wurde mit 50  $\mu\text{L}$  Protein A-Sepharose-Suspension und spezifischem Antikörper über Nacht auf einem Drehrad bei 4°C inkubiert. Der Komplex aus Protein, Antikörper und Sepharose wurde durch Zentrifugation für 1 Minute bei 20.000x g und 4°C

pelletiert und der Überstand verworfen. Der Komplex wurde dreimal mit kaltem RIPA-Puffer und einmal mit 50 mM Tris/HCl pH 6,8 gewaschen und schließlich in 20 µL 2x SDS-Probenpuffer für 5 Minuten bei 96°C inkubiert. Die Probe wurde durch SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt.

PROTEIN A-SEPHAROSE (PAS): 2 g PAS in 16 mL *aqua bidest.* und 0,02% (w/v) NaN<sub>3</sub> über Nacht quellen lassen

RIPA-PUFFER: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1% (w/v) Triton X-100, 1% (w/v) DOC, 0,1% (w/v) SDS, 50 µL/mL Trasylol®, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1,85 mg/mL Jodacetamid

### 3.10.5 Endoglykosidase-Behandlung

Das an Protein A-Sepharose gebundene immunpräzipitierte Protein (3.10.4) wurde nach dreimaligem Waschen in 500 µL RIPA-Puffer mit 20 µL Denaturierungspuffer (NEB) für 15 Minuten bei 96°C erhitzt. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 14.000x g wurde der Überstand für die Behandlung mit Endoglykosidase H (Endo H) oder Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) eingesetzt. Für die Endo H Behandlung wurden zu 20 µL Überstand 2 µL 10x G5 Puffer und 2 µL Endo H (= 1.000 U) gegeben, im Falle der PNGase F Behandlung 2 µL 10x G7 Puffer, 2 µL 10% (w/v) NP-40 und 2 µL PNGase F (= 1.000 U). Die Ansätze wurden für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden mit 20 µL 2x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 Minuten bei 96°C aufgeköcht und durch SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt.

### 3.10.6 Lektin Blot

Bei Lektinen handelt es sich um kohlenhydratbindende Proteine, die spezifisch an bestimmte Zuckerreste binden können. Durch ihre hohe Spezifität lassen sich Glykane identifizieren und charakterisieren. Das in dieser Arbeit verwendete „DIG Glycan Differentiation Kit“ (Roche) enthält eine Reihe von Lektinen, die eine große Spannbreite an Kohlenhydrat-Ketten von N- und O-Glykanen identifiziert.

GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*) erkennt terminale Mannose-Reste, die  $\alpha(1-3)$ ,  $\alpha(1-6)$  oder  $\alpha(1-2)$  mit weiteren Mannose-Resten verbunden sind, wodurch sich mannosereiche *N*-Glykane oder *O*-glykosidisch verbundene Mannose-Reste von Hefe-Glykoproteinen identifizieren lassen (Shibuya *et al.*, 1988). SNA (*Sambucus nigra agglutinin*) erkennt Sialinsäuren, die  $\alpha(2-6)$  mit Galaktose-Resten verbunden sind und identifiziert damit in Kombination mit dem Lektin MAA komplexe, sialylierte *N*-Glykane, wie auch Sialinsäuren in *O*-Glykanen (Shibuya *et al.*, 1987). MAA (*Maackia amurensis agglutinin*) erkennt Sialinsäuren in  $\alpha(2-3)$  Bindung mit Galaktosen, in Kombination mit SNA lassen sich komplexe, sialylierte Kohlenhydrat-Ketten und der Typ der Bindung erkennen;  $\alpha(2-3)$ -gebundene Sialinsäuren in *O*-Glykanen werden ebenfalls identifiziert (Wang und Cummings, 1988). PNA (*Peanut agglutinin*) erkennt das Disaccharid Galaktose- $\beta(1-3)$ -*N*-Acetylgalaktosamin im Trimannosyl-Grundgerüst und eignet sich für die Identifizierung von *O*-glykosidisch gebundenen Kohlenhydrat-Ketten (Goldstein und Hayes, 1978). DSA (*Datura stramonium agglutinin*) erkennt Galaktose- $\beta(1-4)$ -*N*-Acetylglukosamin in komplexen und hybriden *N*-Glykanen, in *O*-Glykanen und *N*-Acetylglukosamin in *O*-Glykanen (Crowley *et al.*, 1984).

Immunpräzipitiertes Material (3.10.4) sowie Kontroll-Glykoproteine wurden in 15% Polyacrylamid Gelen mittels SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt und auf Nitrozellulosmembranen transferiert (3.10.1). Nach der Inkubation mit Blockierungs-Puffer (Roche, Mannheim) über Nacht bei 4°C wurden die Membranen in TBS-Puffer und Lektin-Puffer gewaschen, mit spezifischen Digoxigenin-markierten Lektinen für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und erneut mit TBS-Puffer gewaschen. Um gebundene Lektine zu identifizieren wurden die Membranen mit Antikörpern gegen Digoxigenin, gekoppelt an alkalische Phosphatase, für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden sie in TBS-Puffer und Detektionspuffer gewaschen und mit NBT/X-Phosphat-Lösung gefärbt, die Farbreaktion wurde mit *aqua bidest.* gestoppt.

TBS-PUFFER: 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl

LEKTIN-PUFFER: 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> in TBS, pH 7,5

DETEKTIONSPUFFER: 100 mM Tris/HCl pH 9,5, 100 mM NaCl

### 3.11 Untersuchungen zur Membranassoziation von Proteinen

#### 3.11.1 Flotationsanalyse im nicht-linearen OptiPrep™-Gradienten

Die Flotationsanalyse ist eine Standardmethode, um membranassoziierte Proteine zu charakterisieren (Bergmann *et al.*, 1988; Cong und Rose, 1993, 1994). In dieser Arbeit wurde das Gradienten-Medium OptiPrep™ (Sigma) verwendet, welches aus einer 60%igen Iodixanol-Lösung besteht. Das Prinzip der Flotationsanalyse beruht auf der Eigenschaft von Membranen, während einer Gleichgewichtszentrifugation aufgrund ihrer Schwebedichte in einem Stufengradienten (35%-30%-0%) in die Interphase der hoch (30%) und niedrig (0%) konzentrierten Gradienten-Medien zu flotieren. Lösliche Proteine verbleiben in der 35%igen Lösung. Radioaktiv markierte Zellen (3.10.3) wurden zweimal mit kaltem PBS<sup>def</sup> gewaschen, in PBS<sup>def</sup> abgeschabt und für 5 Minuten bei 450x g und 4°C pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µL isotonischem Puffer resuspendiert und zu 500 µL hypotonischem Puffer getropft. Die Zellen wurden durch 20 Hübe im Dounce Homogenisator auf Eis aufgeschlossen. Die Zellkerne und Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 700x g, 4°C für 5 Minuten vom Zelllysat getrennt. Dieser postnukleäre Überstand wurde auf eine Endkonzentration von 35% (v/v) OptiPrep™ eingestellt. 500 µL dieser Lösung wurden in ein SW60-Röhrchen (Beckmann) pipettiert und mit 3,5 mL 30% (v/v) OptiPrep™ in TNE-Puffer und 500 µL TNE-Puffer überschichtet. Alle Lösungen enthielten außerdem den Protease-Inhibitor-Mix Complete™ (Roche). Der Gradient wurde für 4 Stunden bei 165.000x g und 4°C zentrifugiert und von oben fraktioniert (5 Fraktionen). Die Fraktionen wurden zur Immunpräzipitation eingesetzt (3.10.4), die Präzipitate mittels SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt und durch Autoradiographie visualisiert (3.9.4).

ISOTONISCHER PUFFER: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl

HYPOTONISCHER PUFFER: 20 mM Tris/HCl pH 7,4

TNE-PUFFER: 25 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA

### **3.11.2 Charakterisierung der Membranassoziation**

Peripher assoziierte und integrale Membranproteine unterscheiden sich in der Stabilität der Membranassoziation (Chong und Rose, 1993). Durch alkalischen pH werden Membranvesikel in Membranblätter transformiert, dadurch werden lösliche oder periphere Proteine freigesetzt, die in den Vesikeln eingeschlossen sind. Hohe Salzkonzentrationen schirmen Ladungen und schwache ionische Wechselwirkungen ab, die periphere Proteine direkt oder indirekt über andere Membranproteine an Membranen binden. Chelatbildner stören Membranassoziationen, die durch divalente Kationen-Brücken vermittelt werden (Kretzschmar *et al.*, 1996).

Die Zellmembranen, die während der Zentrifugation in die Interphase zwischen der 30% (v/v) und 0% OptiPrep™ Lösung flotierten, wurden mit verschiedenen Lösungen behandelt. Ein Aliquot der Membranfraktion wurde mit 1 M Na-Bicarbonat-Puffer (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:NaHCO<sub>3</sub> 10:1) auf pH 10 eingestellt, für 1 Stunde bei 4°C inkubiert und danach mit 1 M Tris/HCl pH 6,8 wieder neutralisiert. Ein Aliquot wurde für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit einer Endkonzentration von 2 M KCl inkubiert, ein anderer mit einer Endkonzentration von 50 mM EDTA. Als Kontrolle blieb ein Aliquot unbehandelt. Die Membranen wurden danach einer erneuten Flotation unterzogen und wie in 3.11.1 beschrieben analysiert.

### **3.12 Bakterielle Expression und Reinigung von Proteinen**

Im Vektor pMAL-c2 (Abb. 6) wird das zu exprimierende Gen über die multiple Klonierungsstelle hinter das *malE* Gen von *E. coli* eingefügt, welches für das Maltose-Bindungsprotein (MBP) kodiert. Durch den tac-Promotor und das *malE* Translations-Initiationssignal wird nach Induktion mit IPTG eine große Menge des Fusionsproteins aus MBP und gewünschtem Protein synthetisiert. Die Bindung des MBP an Amylose

kann zur Reinigung des Fusionsproteins über Amylose-Harz ausgenutzt werden. 5' der multiplen Klonierungsstelle befindet sich die Erkennungssequenz für die spezifische Protease Faktor Xa, wodurch das MBP vom gewünschten Protein abgespalten werden kann.

### **3.12.1 Bakterielle Expression, Affinitätsreinigung über Amylose-Harz und Spaltung des Fusionsproteins mit Faktor Xa**

Zur Expression des Fusionsproteins wurde das glukosehaltige Expressionsmedium mit Ampicillin (1 mg/L) versetzt und 1:100 mit einer Übernachtskultur rekombinanter *E. coli* BL-21 angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD<sub>595</sub> von 0,5 bei 37°C und 180 UpM geschüttelt. Die Induktion erfolgte mit IPTG in einer Endkonzentration von 0,3 mM. Nach weiteren 2 Stunden auf dem Schüttler wurden die Zellen geerntet. Dazu wurden sie für 20 Minuten bei 4°C und 2.800x g pelletiert und das Pellet von 1 L Kultur in 20 mL kaltem Amylose-Säulen-Puffer mit ½ Tablette Complete™ (Protease-Inhibitor-Mix, Roche) resuspendiert. Zum Aufschluss der Zellen wurde die Suspension über Nacht bei -20°C eingefroren, aufgetaut und viermal für 15 Sekunden mit 75 Watt beschallt, zwischen den einzelnen Schritten wurde die Probe auf Eis gekühlt. Das Zelllysat wurde für 30 Minuten bei 4°C und 5.100x g zentrifugiert, der Überstand zu 10 mL gewaschenem Amylose-Harz pro Liter Kultur gegeben und für 1 Stunde bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Das Harz wurde zweimal für je 10 Minuten mit Amylose-Säulen-Puffer gewaschen und das Fusionsprotein zweimal für je 10 Minuten mit 10 mL 10 mM Maltose in Amylose-Säulen-Puffer eluiert. Zu dem Eluat wurden pro 1 L Kultur 25 U Faktor Xa gegeben und der Ansatz über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

EXPRESSIONSMEDIUM (PRO LITER): 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, autoklavieren und 10 mL sterilfiltrierte 20%ige (w/v) Glukose-Lösung zufügen

AMYLOSE-SÄULEN-PUFFER: 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA

### **3.12.2 Kationenaustausch-Chromatographie**

Das durch Faktor Xa gespaltene Fusionsprotein wurde zur Trennung der beiden Komponenten über eine starke Kationenaustausch-Säule (Mono S) gereinigt. Da das Matrixprotein stark positiv geladen ist, bindet es an das Säulenmaterial, während das Maltose-Bindungsprotein negativ geladen ist und sich daher im Durchfluss befindet.

Die Protein-Lösung wurde zuerst mit 50 mM HEPES, 25 mM NaCl, pH 7,6 über eine „HiPrep® 26/10 Desalting“ Säule entsalzt. Die Protein-Fractionen wurden vereinigt und mit demselben Puffer über eine „Mono S HR 5/5“ Säule aufgetrennt. Das Matrixprotein wurde mit einem steigenden NaCl-Gradienten (von 25 mM auf 1 M NaCl in 20 Säulenvolumen) eluiert.

### **3.12.3 Gelfiltrations-Chromatographie**

Zur Trennung von verschiedenen multimeren Formen des Matrixproteins wurden jeweils 3 Fraktionen 48 Stunden nach der Auftrennung mit der Mono S Säule vereinigt und mit 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,6 über eine „HiLoad® 16/60 Superdex® 75 prep grade“ Säule gereinigt.

### **3.12.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das „Coomassie Plus Protein Assay Reagent“ der Fa. Pierce verwendet. Das Prinzip der Konzentrationsbestimmung beruht auf einem modifizierten Bradford-Coomassie-Farbstoff, der im sauren Medium an Proteine bindet und eine Blaufärbung hervorruft, die bei einer Wellenlänge von 595 nm zu einer intensiven Absorption führt. Zur Messung wurde ein definiertes Volumen der Proteinlösung (10 µL) mit einem definierten Reagenzvolumen (300 µL) eingesetzt. Parallel wurde eine Eichkurve mit Albumin als Standard aufgenommen. Die Proteinkonzentration wurde anhand der gemessenen Extinktion bei 595 nm an der Eichkurve abgelesen.

### 3.12.5 Ankonzentrierung von Proteinlösungen

Zur Ankonzentrierung von Proteinlösungen durch Ultrafiltration wurden, abhängig vom Ausgangsvolumen, verschiedene Konzentratoren der Fa. Amicon verwendet. Die Membranen der verwendeten Konzentratoren sind für Proteine mit einer molaren Masse von mehr als 10 kDa undurchlässig, wodurch es zur Ankonzentrierung größerer Moleküle kommt. Vor Gebrauch wurden die Konzentratoren mit dem entsprechenden Puffer für 30 Minuten zentrifugiert, um zugesetzte Konservierungsmittel von der Membran zu entfernen.

Der Centricon-10 Konzentrator fasst 2 mL und wurde bei 21°C für 30 Minuten bei 2.000x g eingesetzt, der Microcon-10 Konzentrator fasst 500 µL und wurde bei 18°C für 30 Minuten bei 12.500x g eingesetzt.

### 3.12.6 Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen durch Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-MS)

Für die Massenspektrometrie wird das zu untersuchende Protein im 1.000 bis 10.000fachen molaren Überschuss mit einer geeigneten, bei der verwendeten Laserwellenlänge absorbierenden Matrix gemischt und auf einen metallischen Probenhalter aufgetropft. Durch Verdunstung kommt es zur Kokristallisation von Matrix und Protein. Im Hochvakuum der Ionenquelle des Massenspektrometers wird die kristalline Oberfläche einem intensiven Impuls kurzwelliger Laserstrahlung ausgesetzt. Neben den Matrixmolekülen werden dabei auch Proteinmoleküle in die Gasphase freigesetzt, die Matrix spielt dabei eine wichtige Rolle bei der Ionisation der Probenmoleküle. Durch die Erzeugung eines elektrostatischen Feldes werden die Ionen beschleunigt und ihre Flugzeit bis zum Detektor (daher MALDI-TOF = *time of flight*) bestimmt. Die jeweilige Masse lässt sich aus der gemessenen Flugzeit ermitteln, wobei die Kalibrierung über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen erfolgt.

Die Messungen wurden am Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg, Arbeitsgruppe Prof. R. Thauer, von Dr. J. Kahnt

durchgeführt. Als Matrix wurde das kleine organische Molekül Sinapinsäure (3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure) verwendet, von dem eine gesättigte Lösung in 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) und 67% Acetonitril angesetzt wurde. Von der Proteinlösung wurde eine Verdünnungsreihe in 0,1% TFA hergestellt. Matrixlösung und Proteinlösung wurden im Verhältnis 1+1 gemischt, auf eine Goldplatte aufgetropft, trocknen lassen und die entstandenen Kokristalle für die Massenspektrometrie eingesetzt.

### **3.13 Strukturbiologische Untersuchungen von Proteinen**

#### **3.13.1 Chemische Quervernetzung mit DMP**

Durch Verwendung von sogenannten Vernetzungsreagenzien lassen sich Protein-Moleküle kovalent miteinander verbinden. Sie eignen sich unter anderem zur Untersuchung der oligomeren Proteinstruktur und der Interaktion einzelner Proteine. Durch Vernetzungsreagenzien mit verschieden langen Abstandhaltern lässt sich der Abstand zwischen den beiden Molekülen abschätzen.

Beim Dimethylpimelimidat (DMP) handelt es sich um ein homobifunktionales Vernetzungsreagenz, das zwei identische reaktive Gruppen trägt und sich mit primären Aminen durch seine beiden Imidoestergruppen verbindet. Der Abstandhalter von DMP ist 9,2 Å (7 Atome) lang.

Die Proteinlösung wurde mit 2,2 M Triethanolamin pH 8,0 auf eine Endkonzentration von 0,2 M Triethanolamin eingestellt. Es wurde eine frische 0,5 M DMP Lösung in 0,2 M Triethanolamin Endkonzentration angesetzt und mit 1 M NaOH auf pH 8,0 eingestellt. Zu 3-5 µg Protein wurden 2 µL DMP-Lösung (Endkonzentration 77 mM) oder als Negativ-Kontrolle 0,2 M Triethanolamin pH 8,0 gegeben und für 30 Minuten bei 10°C inkubiert. Mit 1 µL 2,2 M Triethanolamin pH 8,0 wurde das restliche DMP neutralisiert. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, durch SDS-PAGE (3.9.1) separiert und die Gele mit Coomassie gefärbt (3.9.3).

### 3.13.2 Bestimmung des Stokes Radius von Proteinen

Der Stokes Radius gibt den hydrodynamischen Radius eines Proteins an (Siegel und Monty, 1966). Dieser Radius kann mit Hilfe der Gelfiltration bestimmt werden, das zugehörige Molekulargewicht kann jedoch nur durch Vergleich mit Standardproteinen der gleichen Form abgeschätzt werden. Die Methode ist schonend, so dass die Struktur der Untereinheiten in der Regel erhalten bleibt.

Zunächst wird die Gelfiltrationssäule mit Markerproteinen, deren Stokes Radius bekannt ist, über deren Elutionsvolumen ( $V_e$ ) kalibriert und das Ausschlussvolumen der Säule ( $V_0$ ) mit Dextran Blau (2000 kDa) bestimmt. Nach Laurent und Killander (Laurent und Killander, 1964) wird der Wert  $(-\log K_{av})^{1/2}$  gegen den Stokes Radius aufgetragen.

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

$K_{av}$  = Verteilungs-Koeffizient  
 $V_e$  = Elutionsvolumen des Proteins [mL]  
 $V_0$  = Ausschlussvolumen [mL]  
 $V_t$  = Säulenvolumen [mL]

Anschließend wird das Elutionsvolumen des zu untersuchenden Proteins bestimmt. Anhand der Standard-Gerade kann der Stokes Radius des Proteins bestimmt werden.

Zur Kalibrierung wurde das „Low Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit“ und das „High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit“ (Amersham Pharmacia) verwendet. Die Standard-Proteine und das Dextran Blau wurden in *aqua bidest.* gelöst (Endkonzentration 10 mg/mL) und je 250  $\mu$ L Probe in drei Säulenläufen mit 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,6 über eine „Superdex 200 HR 10/30“ Säule aufgetrennt.

1. Lauf	2. Lauf	3. Lauf
	300 µg Thyroglobulin	65 µg Ferritin
500 µg Dextran	750 µg Katalase	250 µg Aldolase
Blau	1000 µg Albumin	900 µg Ovalbumin
	450 µg Chymotrypsinogen A	1300 µg Ribonuklease A

### 3.13.3 Elektronenmikroskopische Analyse von Einzelpartikeln

Für die elektronenmikroskopische Analyse von Proteinen können diese direkt auf ein Trägernetzchen gegeben und durch Negativkontrastierung dargestellt werden. Dazu können verschiedene Schwermetall-Salze verwendet werden, die sich an den Proteinmolekülen anlagern, diese einhüllen und Vertiefungen und Löcher ausfüllen. Die Schwermetallhülle ist strahlenresistenter als das Protein selbst und konserviert die räumliche Struktur des Moleküls auch bei Trocknung und moderater Bestrahlung im Vakuum des Elektronenmikroskops.

Zur Untersuchung von Einzelpartikeln wurde ein Kohlefilm in die Proteinlösung getaucht und zur Negativkontrastierung in 4% (w/v) Uranylacetat, pH 4,3 flotieren lassen. Auf diesen Kohlefilm wurde vorsichtig ein 400-Maschen-Netz aus Kupfer aufgelegt und zusammen mit dem Film abgenommen. Das Präparat wurde im Elektronenmikroskop (Zeiss EM T109, Beschleunigungs-Spannung 80 kV) bei einer 50.000fachen Vergrößerung betrachtet. Die Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Elke Bogner, Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen durchgeführt.

### 3.13.4 Limitierte Proteolyse von nativen Proteinen mit Trypsin

Die Eigenschaften von proteolytischen Enzymen, sehr spezifisch Bindungen in Proteinen zu spalten, macht sie zu einem wichtigen Werkzeug bei der Aufklärung von höheren Strukturordnungen. Läuft die enzymatische Spaltung nicht vollständig ab, entstehen unterschiedliche Peptidmuster mit dem gleichen Enzym. In der Strukturaufklärung wird die

limitierte Proteolyse bei Topologiestudien an nativen Proteinen eingesetzt. Gerade sehr kompakte, native Proteine werden häufig nur limitiert gespalten.

Trypsin (Molekulargewicht 23,5 kDa) katalysiert die Spaltung von Peptidbindungen C-terminal von Arginin und Lysin. Es ist die wohl am häufigsten verwendete Serinprotease in der Proteinanalytik, gerade in Verbindung mit der Massenspektrometrie.

Gleiche Quantitäten von BDV-Matrixprotein und Trypsin wurden für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Senkung auf pH 3 gestoppt (0,5% (v/v) Trifluoressigsäure). Die Probe wurde mittels SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt und das Gel in Coomassie gefärbt (3.9.3) bzw. im Western Blot (3.10.1) analysiert. Außerdem wurde die Probe durch Massenspektrometrie analysiert (3.12.6). Dazu wurde die Proteinlösung mit Hilfe einer NAP-10 Säule in 10 mM Triethylamin-Puffer pH 7,6 umgepuffert, um störende Salze zu entfernen. Die Probe wurde im Vakuum getrocknet und das Protein in 0,1% Trifluoressigsäure und 67% Acetonitril resuspendiert.

### 3.13.5 Kristallisation von gereinigtem Protein

Zur Kristallisation wurde die *sitting drop*-Methode verwendet, bei der 2 µL der Kristallisationslösung und 2 µL der Proteinlösung eingesetzt wurden, das Reservoir enthielt 500 µL der Kristallisationslösung. Die Kristallisationslösung besteht im Wesentlichen aus drei Komponenten: 1) einem Präzipitans wie z.B. Salzen ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na-Citrat, (K/Na)-Phosphat), organischen Verbindungen (Polyethylenglykole 400-20.000 Da) oder Alkoholen (Methylpentandiol, Ethanol, Isopropanol), 2) einem Puffer mit pH 4-10 und 3) Salzen wie z.B. CaCl<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Kristallisationsplatte mit 24 Einheiten wurde mit durchsichtigem Klebeband verschlossen und bei 18°C gelagert. Durch Dampfdiffusion stieg die Konzentration an Protein, Präzipitans und Salzen im Tropfen an und im Idealfall bildeten sich Proteinkristalle.

Die Kristallisationsversuche wurden am Institut für Pharmazeutische Chemie, Marburg, Arbeitsgruppe Prof. G. Klebe, in Zusammenarbeit mit Dr. M.T. Stubbs durchgeführt. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 5 mg/mL ankonzentriert (3.12.5) und zur Kristallisation wie oben beschrieben eingesetzt. Beim ersten Versuch wurden 96 verschiedene Kristallisationslösungen (Anhang, Tab. 6) verwendet. Zur Optimierung der Bedingungen wurden die einzelnen Parameter variiert. Letztendlich wurde folgende Kristallisationslösung verwendet.

KRISTALLISATIONSLÖSUNG: 10% (w/v) PEG 8000, 0,5 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ,  
0,1 M Tris/HCl pH 7,0

### **3.13.6 Lösung des Phasenproblems**

Die an einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen enthalten die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome in dem Kristall. Diese Information ist in den drei beschriebenen Größen einer elektromagnetischen Welle, der Wellenlänge, der Amplitude und der Phase enthalten. Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert und ist somit bekannt. Werden die gebeugten Röntgenstrahlen mittels Film oder Flächenzähler detektiert, so kann nur die Amplitude durch die relative Intensität, z.B. der Schwärzung auf den Film, gemessen werden. Eine Messung der Phase ist prinzipiell nicht möglich, wodurch ein entscheidender Teil der Information über die Anordnung der Atome im Kristall verloren geht.

#### **3.13.6.1 Anreicherung von Kristallen mit Schwermetall-Salzen**

Die Methode des isomorphen Ersatzes (MIR, *Multiple Isomorphous Replacement*) dient der Lösung des Phasenproblems. Hierbei werden die Proteinkristalle in Lösungen von Salzen oder Verbindungen transferiert, die ein Atom oder Ion mit hoher Massenzahl enthalten. Die Schwermetallverbindungen diffundieren in den Kristall und binden meist an die Proteinoberfläche. Je nach den chemischen Eigenschaften des Metall-

Ions oder der Metallverbindung bilden sie mit dem Protein eine kovalente Bindung. Durch ihre größere Zahl an Elektronen streuen die Schweratome Röntgenstrahlen viel stärker als die in den Aminosäuren enthaltenen Atomen. Die Reflexe eines isomorphen Derivatkristalls liegen an identischen Positionen auf sich entsprechenden Beugungsaufnahmen, die relativen Intensitäten unterscheiden sich aber. Durch die Intensitätsunterschiede kann die Position der Schweratome in der Kristallzelle berechnet werden. Die durch die Schweratom-Position erhaltene Phaseninformation erlaubt eine grobe Abschätzung der Phasen für die Proteinstruktur.

Native Kristalle wurden für 30 Minuten in Schwermetall-Puffer inkubiert und dann in einen 10  $\mu$ L Tropfen der Schwermetall-Lösung (1 mM Endkonzentration in Schwermetall-Puffer) auf einem Deckglas transferiert. Die Deckgläser wurden nach der *hanging drop*-Methode 48 Stunden über einem Reservoir mit Schwermetallpuffer inkubiert. Es wurden folgende Schwermetall-Salz-Lösungen verwendet:  $\text{KAu}(\text{CN})_2$ ,  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ,  $\text{K}_3\text{IrCl}_6$ ,  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{CH}_3\text{-HgAcetat}$ ,  $\text{K}_2\text{OsO}_4$ . Die Kristalle wurden in Einfrier-Puffer eingefroren und am Synchrotron in Hamburg vermessen.

SCHWERMETALL-PUFFER: 15% PEG 8000, 0,6 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris/HCl  
pH 7,0

EINFRIER-PUFFER: 12,5% PEG 8000, 0,5 M  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , 0,1 M Tris/HCl, pH 7,0,  
30% Glycerin

### **3.13.6.2 Expression von Selenomethionin-haltigem Fusionsprotein in methionin-auxotrophen *E. coli* (B834)**

Eine weitere Methode zur Bestimmung von Proteinkristallstrukturen beruht auf der anomalen Streuung von Röntgenstrahlen. Bei Proteinkristallen, die nur leichte Atome enthalten sind die Intensitäten der zwei Reflexe, die durch Inversionssymmetrie miteinander verknüpft sind (Friedel-Paar), identisch. Die Anwesenheit bestimmter Atome im Kristall kann jedoch dazu führen, dass sich die Intensitäten von Friedel-Paaren unterscheiden (anomale Dispersion). Aus den auftretenden Intensitätsunterschieden lässt sich eine Phaseninformation ableiten. Häufig wird die MAD-Methode

(multiple anomale Dispersion) mit Selenatomen bei rekombinanten Proteinen angewendet. Die Methionin-Reste eines Proteins werden dafür während der Synthese in Bakterien durch Selenomethionin (SeMet) ersetzt, die Eigenschaften des Proteins werden in der Regel nicht verändert.

Zur Expression wurde der methionin-auxotrophe *E. coli* Stamm B834 verwendet. Die rekombinanten Bakterien wurden in M9-Minimalmedium mit einem Zusatz von 1 mg/L Ampicillin, 1 g/L Thiamin und 50 mg/L L-Selenomethionin kultiviert. Als Vorkultur wurde eine Bakterienkolonie in 5 mL M9-Minimalmedium und 5% (v/v) LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Für die Expression wurde das M9-Minimalmedium 1:500 mit der Vorkultur angeimpft. Sobald die Kultur bei 37°C und 180 UpM auf dem Schüttler eine OD<sub>595</sub> von 0,5 erreicht hatte, wurde mit einer IPTG-Endkonzentration von 1 mM induziert. Die Bakterien wurden nach einer Induktionsdauer von 12 Stunden durch Zentrifugation (20 Minuten bei 2.800x g und 4°C) geerntet. Der Zellaufschluss und die Reinigung des SeMet-Fusionsproteins wurde wie unter 3.12.1 beschrieben durchgeführt.

5X M9-SALZE (1 L): 64 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 15 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,5 g NaCl,  
5 g NH<sub>4</sub>Cl

M9-MINIMALMEDIUM (1 L): 200 mL 5x M9-Salze, 20 mL 20% (w/v) Glukose,  
50 mL 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mL 1 M MgSO<sub>4</sub>

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Untersuchungen von ko- und posttranslationalen Modifikationen

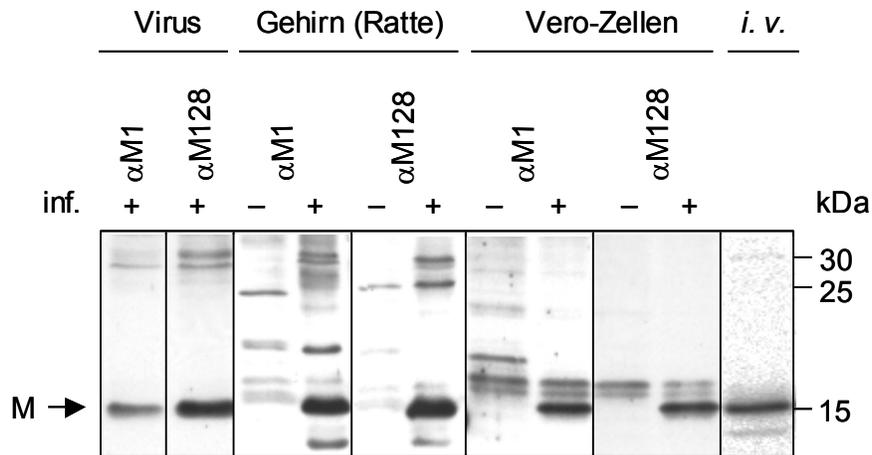
#### 4.1.1 Identifizierung des BDV-Matrixproteins in verschiedenen Systemen

Das Virus der Bornaschen Krankheit vermehrt sich experimentell sowohl im Gehirn infizierter Ratten als auch in eukaryotischer Zellkultur. Um auszuschließen, dass sich durch die verschiedenen Probenmaterialien Unterschiede in der Prozessierung ergeben oder es Unterschiede zwischen den einzelnen BDV-Stämmen gibt, wurde das Matrixprotein aus verschiedenen Expressionssystemen und Stämmen untersucht.

Es wurde ein Virusisolat aus permanent BDV-infizierten MDCK-Zellen (Stamm He/80), Gehirnmaterial experimentell BDV-infizierter Ratten (Stamm He/80) und permanent BDV-infizierte Vero<sup>No98</sup>-Zellen (Stamm No98) verwendet. Als Vergleich wurde Material einer *in vitro* Transkription/Translation (3.8) in Abwesenheit eines Glykosylierungssystems eingesetzt (Abb. 7). Die Viruspräparation wurde freundlicherweise von Dr. M. Eickmann, Marburg, das Gehirnmaterial von M. Fließ, Gießen zur Verfügung gestellt (Kraus *et al.*, 2001). Zum Nachweis des Matrixproteins wurden die verschiedenen Materialien mit SDS-Probenpuffer versetzt, die Proteine durch SDS-PAGE (3.9.1) separiert und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (3.10.1). Der spezifische Nachweis des Matrixproteins erfolgte durch Western Blot Analyse (3.10.1) mit Hilfe des polyklonalen Antiserums  $\alpha$ M1, gerichtet gegen den N-Terminus des Proteins (Aminosäuren 2-16) und des polyklonalen Antiserums  $\alpha$ M128, welches gegen den C-Terminus (Aminosäuren 128-142) des Matrixproteins gerichtet ist.

Unabhängig davon welche Quelle verwendet wurde, befindet sich das Matrixprotein nach SDS-PAGE in Höhe des 15 kDa-Standards. Außerdem lässt sich eine BDV-spezifische Bande in Höhe des 30 kDa-Standards erkennen, die wahrscheinlich einem Dimer des Matrixproteins entspricht.

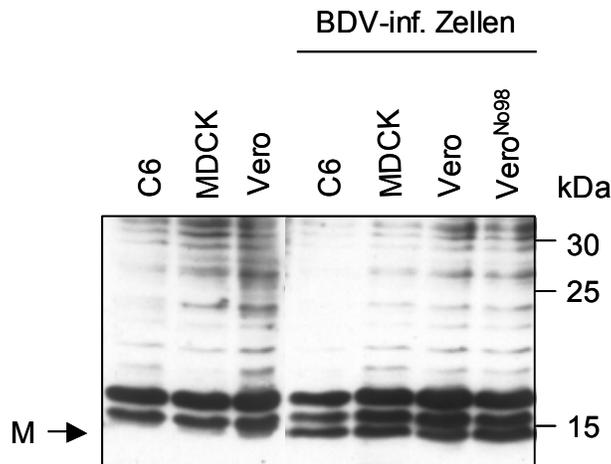
Weitere Banden finden sich auch in den Negativ-Kontrollen, so dass es sich hier um unspezifische Bindungen der Antikörper handelt. Das Protein aus der *in vitro* Transkription/Translation, welches in Abwesenheit eines Glykosylierungssystems synthetisiert wurde, zeigt ein identisches Laufverhalten im Gel.



**Abb. 7: BDV-M aus verschiedenen Probenmaterialien.** Western Blot Analyse mit den Antiseren  $\alpha$ M1 und  $\alpha$ M128 mit Material aus unterschiedlichen Probenmaterialien: Virusisolat aus permanent BDV-infizierten MDCK-Zellen, Gehirn experimentell BDV-infizierter Ratten und permanent BDV-infizierte Vero<sup>No98</sup>-Zellen (inf. +). Als Negativ-Kontrolle wurde Gehirn nicht infizierter Ratten bzw. nicht infizierte Vero-Zellen verwendet (inf. -). Autoradiographie einer *in vitro* Transkription/Translation (*i. v.*) des Konstrukts pTM1-M. Die Lokalisation des BDV-M ist mit einem Pfeil (M) markiert, die Positionen der Markerproteine des Längenstandards sind angezeigt.

Außerdem wurde das Matrixprotein aus verschiedenen permanent BDV-infizierten eukaryotischen Zellkulturen untersucht (Abb. 8). Die verwendeten Zelllinien waren mit folgenden BDV-Stämmen infiziert: C6-Zellen (He/80), MDCK-Zellen (He/80), Vero-Zellen (V), Vero<sup>No98</sup>-Zellen (No98).

Auch hier zeigt das Matrixprotein unabhängig vom verwendeten BDV-Stamm ein identisches Laufverhalten im Gel. Unspezifische Banden unterschiedlicher Intensität konnten in allen Spuren beobachtet werden.



**Abb. 8: Permanent BDV-infizierte Zellkulturen.** Western Blot Analyse mit  $\alpha$ M128 von unterschiedlichen Zellkulturen, die mit verschiedenen BDV-Stämmen infiziert sind: C6-Zellen (He/80), MDCK-Zellen (He/80), Vero-Zellen (V) und Vero<sup>No98</sup>-Zellen (No98). Als Negativ-Kontrolle wurden nicht infizierte Zellen verwendet. Der Pfeil (M) markiert die Position des BDV-M, die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

### 2.1.2 Untersuchung zur Abspaltung eines möglichen *N*-terminalen Signalpeptids

Aus den Ergebnissen, die in Abb. 7 gezeigt sind, können auch Aussagen über die kotranslationale Abspaltung eines *N*-terminalen Signalpeptids getroffen werden.

Signalpeptide sind notwendig für die Translokation in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums, wo sich verschiedene Glykosyltransferasen und Glykosidasen befinden, die für die Entstehung der Kohlenhydrat-Ketten verantwortlich sind. Es handelt sich dabei um eine hydrophobe Proteinregion am *N*-Terminus, die meist kotranslational abgespalten wird oder um eine interne hydrophobe Region. Signalpeptide umfassen typischerweise zwischen 15 und 60 Aminosäuren, so dass sich die Abspaltung eines *N*-terminalen Peptides durch ein verändertes Laufverhalten in der SDS-PAGE nachweisen lässt.

Im Fall des BDV-Matrixproteins ergab sich kein Unterschied des Laufverhaltens während der Elektrophorese. Durch die Verwendung des Antiserums gegen den *N*-Terminus des Matrixproteins ( $\alpha$ M1) und des

Antiserums gegen den C-Terminus ( $\alpha$ M128) wurde durch Western Blot Analyse das gleiche Produkt detektiert, was die Abspaltung eines Signalpeptids ausschließt.

#### 4.1.3 Untersuchung einer möglichen *N*-Glykosylierung

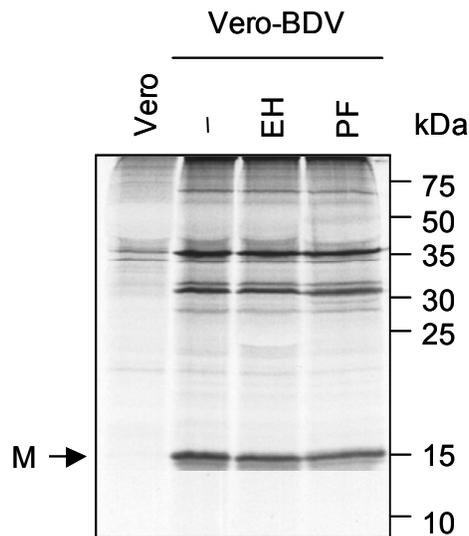
##### 4.1.3.1 Behandlung mit Endoglykosidasen

Im Laufe der Glykosylierung eines Proteins ergeben sich durch wiederholte Anheftung und Abspaltung von Zuckerresten unterschiedliche Molekulargewichte des Moleküls. Eine typische *N*-Glykosylierung der Glykosylierungsstelle N-X-S/T geht mit einer Erhöhung des Molekulargewichts um etwa 1-3 kDa einher. Diese glykosylierte Form sollte daher von der unglykosylierten Form aufgrund ihres Laufverhaltens in der SDS-PAGE zu unterscheiden sein. Für die Abspaltung der Kohlenhydrat-Ketten wurden verschiedene Endoglykosidasen verwendet, die unterschiedliche Formen, wie zum Beispiel mannosereiche von komplexen Verzuckerungen unterscheiden und spezifisch spalten.

Die Endoglykosidase H (Endo H) spaltet die Chitobiose-Einheit von mannosereichen und manchen hybriden *N*-glykosidischen Oligosacchariden. Die Endoglykosidase Peptid *N*-Glykosidase F (PNGase F) spaltet zwischen dem inneren *N*-Acetylglukosamin und dem Asparagin-Rest von *N*-Glykanen des mannosereichen, hybriden und komplexen Typs.

Permanent BDV-infizierte Vero<sup>No98</sup>-Zellen und nicht infizierte Vero-Zellen als Kontrolle wurden mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein metabolisch markiert (3.10.3), aufgeschlossen und der partikelfreie Überstand nach Zentrifugation zur Immunpräzipitation eingesetzt (3.10.4). Für die Immunpräzipitation wurde ein Mischung der Antiseren  $\alpha$ M1 und  $\alpha$ M128 verwendet. Zur Behandlung mit Endoglykosidasen (3.10.5) wurde das Immunpräzipitat der BDV-infizierten Zellen geteilt, wobei einer Probe Endo H und einer PNGase F zugesetzt wurde. Als Kontrolle diente eine Probe ohne Enzym-Zusatz. Nach Auftrennung im Polyacrylamid-Gel (3.9.1) und Visualisierung der radioaktiv markierten Proteine durch Auto-

radiographie (3.9.4) befanden sich spezifische Banden bei etwa 15 kDa (Monomer), 30 kDa (Dimer) und 60 kDa (Tetramer) (Abb. 9). Es ließ sich kein Unterschied im Laufverhalten zwischen unbehandelter Probe und mit Endoglykosidase behandelten Proben erkennen.



**Abb. 9: Behandlung mit Endoglykosidasen.** Autoradiographie von immunpräzipitiertem Material von nicht infizierten (Vero) und permanent BDV-infizierten Vero<sup>No98</sup>-Zellen (-), sowie Behandlung mit Endo H (EH) bzw. PNGase F (PF). Der Pfeil markiert die Position des BDV-M, die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

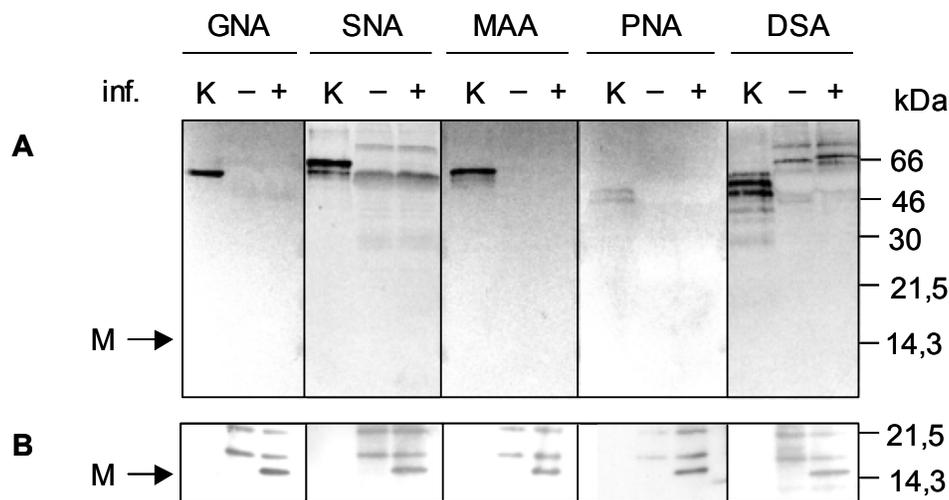
#### 4.1.3.2 Bindung von Lektinen

Zur Identifizierung einer möglichen Glykosylierung und der Charakterisierung der eventuell angehefteten Kohlenhydrat-Ketten wurden verschiedene Lektine aus dem „DIG Glycan Differentiation Kit“ verwendet (3.10.6).

Permanent BDV-infizierte Vero<sup>No98</sup>-Zellen und nicht infizierte Zellen als Kontrolle wurden wie in 3.10.3 beschrieben aufgeschlossen und zur Immunpräzipitation (3.10.4) mit  $\alpha$ M128 eingesetzt. Die Immunpräzipitate wurden zusammen mit Kontroll-Glykoproteinen aus dem Kit durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.9.1), auf Nitrozellulose transferiert (3.10.1), wie in 3.10.6 beschrieben mit verschiedenen Lektinen inkubiert und gebundene Lektine durch eine Farbreaktion dargestellt. Für GNA wurde als Kontroll-

Glykoprotein Carboxypeptidase Y verwendet, für MAA Fetuin, für PNA Asialofetuin, für SNA Transferrin und Fetuin und für DSA Fetuin und Asialofetuin.

Die verschiedenen Lektine erkannten zwar die verwendeten Kontroll-Glykoproteine, nicht aber ein Produkt zwischen 15 und 18 kDa, wo das glykosylierte Matrixprotein zu vermuten gewesen wäre (Abb. 10A). Weiterhin wurden einige Banden angefärbt, die aber auch im Material aus nicht infizierten Zellen auftraten, so dass es sich hierbei um unspezifisch immunpräzipitierte zelluläre Glykoproteine handelt. Zur Kontrolle, ob ausreichende Quantitäten für die Detektion vorhanden waren, wurden die Membranen gewaschen, erneut mit BSA abgesättigt und eine Western Blot Analyse (3.10.1) damit durchgeführt. Obwohl sich die Nachweisbereiche von Lektinen und Antikörpern gleichen, konnte im Gegensatz zur Lektinbindung eine eindeutige Bindung der Antikörper an das Matrixprotein nachgewiesen werden (Abb. 10B).



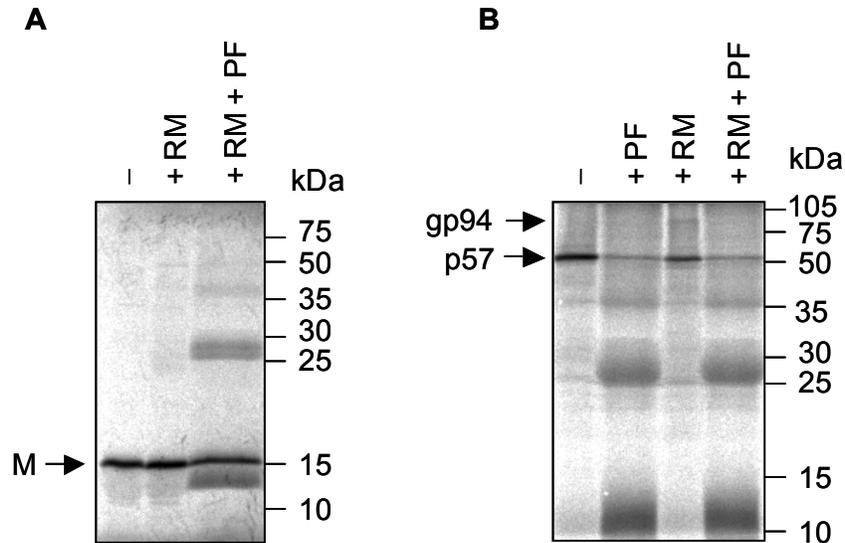
**Abb. 10: Bindung von Lektinen. A)** Lektin Blot von immunpräzipitiertem Material aus nicht infizierten (-) und permanent BDV-infizierten Vero<sup>No98</sup>-Zellen (+), sowie den im Kit enthaltenen Kontroll-Glykoproteinen (K). Es wurden die Lektine GNA (*Galanthus nivalis agglutinin*), SNA (*Sambucus nigra agglutinin*), MAA (*Maackia amurensis agglutinin*), PNA (*Peanut agglutinin*) und DSA (*Datura stramonium agglutinin*) getestet. **B)** Western Blot Analyse der im Lektin Blot eingesetzten Nitrozellulosemembranen. Die Pfeile (M) markieren die Position von BDV-M, am Rand sind die Positionen der Markerproteine angezeigt.

#### 4.1.3.3 *In vitro* Transkription/Translation in Gegenwart von Mikrosomen

Für die *in vitro* Transkription/Translation wurde das „TNT® T7 Quick Master Mix“ verwendet. Durch Zugabe des Plasmids pTM1-M (Abb. 5) und <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein wurde das Matrixprotein-Gen, das stromabwärts des T7-Promotors liegt, transkribiert und das Transkript translatiert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Durch Zugabe von Mikrosomen wurde eine mögliche ko- und posttranslationale Modifizierung, wie Abspaltung eines Signalpeptides, Membran-Insertion, Translokation und Glykosylierung, untersucht.

Aus der *in vitro* Transkription/Translation (3.8) des Plasmid pTM1-M, der anschließenden SDS-PAGE (3.9.1) und Autoradiographie (3.9.4) resultierte eine Bande in der Höhe von etwa 15 kDa (Abb. 11A). Durch Zugabe von Mikrosomen zu dem Transkriptions/Translations-Ansatz änderte sich das Laufverhalten im Polyacrylamidgel und demzufolge das Molekulargewicht nicht. Die Behandlung mit PNGase F (3.10.5) hatte ebenfalls keinen Einfluss.

Als Positiv-Kontrolle wurde das Plasmid pTM1-G verwendet, welches für das BDV-Glykoprotein kodiert. In Abwesenheit von Mikrosomen zeigte sich eine Bande von etwa 50 kDa, welche das unglykosylierte Produkt p57 darstellt (Abb. 11B). Nach Zugabe von Mikrosomen ließ sich eine weitere Bande bei etwa 90 kDa detektieren, welche das glykosylierte Produkt gp94 repräsentiert. Das Protein wurde in diesem System allerdings sehr ineffizient modifiziert. Die Zugabe von PNGase F nach der Transkription/Translation in Anwesenheit von Mikrosomen führte aufgrund der Abspaltung von *N*-Glykanen zu einer einheitlichen Bande bei etwa 50 kDa.



**Abb. 11: *In vitro* Transkription/Translation in Ab- und Anwesenheit von Mikrosomen. A)** Verwendung des Plasmids pTM1-M in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von Mikrosomen (RM), sowie Behandlung mit PNGase F (+ PF). Der Pfeil (M) markiert die Position des BDV-M. **B)** Verwendung des Plasmids pTM1-G in Abwesenheit (-) und Anwesenheit (+) von Mikrosomen (RM), sowie Behandlung mit PNGase F (+ PF). Die Pfeile markieren das unglykosylierte Produkt (p57) und die glykosylierte Form (gp94). Die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

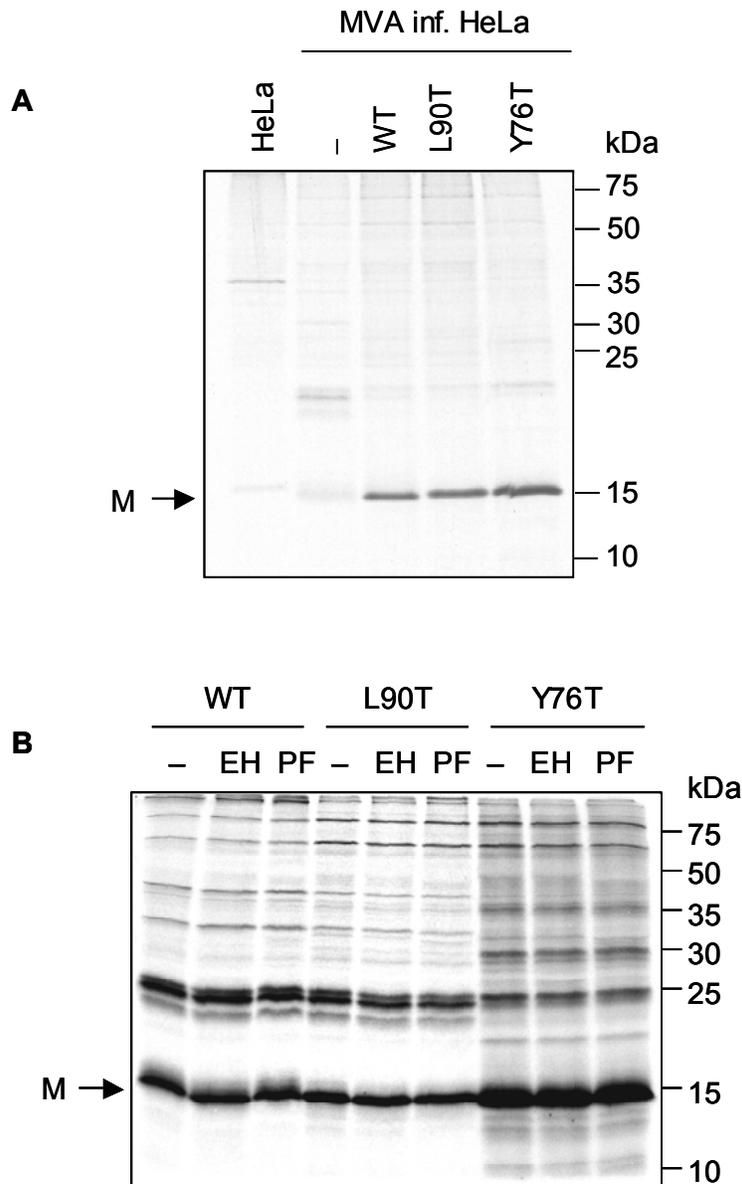
#### 4.1.4 Herstellung von *N*-Glykosylierungs-Mutanten zur Bildung des notwendigen *N*-Glykosylierungsmotivs N-X-T

In der Regel werden nur Proteine *N*-glykosyliert, die das Konsensus-Motiv N-X-S/T für *N*-Glykosylierungen tragen. Da in der Aminosäuresequenz des Matrixproteins der Bornaschen Krankheit dieses Motiv nicht zu finden ist, eine *N*-Glykosylierung aber publiziert wurde (Kliche *et al.*, 1994), wurde das Motiv durch eine Mutagenese an den beiden vorgeschlagenen alternativen Glykosylierungsstellen eingeführt. Die putative Glykosylierungssequenz N<sub>74</sub>-I-Y wurde zu N<sub>74</sub>-I-T<sub>76</sub> (Y76T) und die Sequenz L-N<sub>88</sub>-S-L-S zu L-N<sub>88</sub>-S-T<sub>90</sub>-S (L90T) mutiert. Mit Hilfe dieser Mutagenesen sollte geklärt werden, ob es prinzipiell möglich ist, das Matrixprotein an diesen Positionen zu glykosylieren.

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde an dem Plasmid pTM1-M mit dem „QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ durchgeführt (3.2.3) und das Konstrukt anschließend durch Sequenzierung überprüft (3.4).

#### **4.1.4.1 Expression der N-Glykosylierungs-Mutanten in eukaryotischen Zellen**

Mit Hilfe des MVA-T7-Expressionssystems (3.6) wurden die verschiedenen pTM1-M-Konstrukte in eukaryotischen Zellen exprimiert. HeLa-Zellen wurden zu diesem Zweck mit MVA-T7 infiziert (3.6.3) und mit pTM1-M, pTM1-M-L90T bzw. pTM1-M-Y76T transfiziert (3.6.4). Als Kontrolle wurden nicht infizierte und MVA-T7-infizierte HeLa-Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen metabolisch mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein markiert (3.10.3), nach 3 Stunden aufgeschlossen und zur Immunpräzipitation mit einer Mischung aus  $\alpha$ M1 und  $\alpha$ M128 verwendet (3.10.4). Das Präzipitat wurde durch SDS-PAGE (3.9.1) aufgetrennt. Nach Autoradiographie (3.9.4) war sowohl bei der Wildtyp-Form als auch bei den beiden Glykosylierungs-Mutanten eine prominente Bande bei etwa 15 kDa erkennbar (Abb. 12A). Es waren jedoch keine weiteren spezifischen Banden mit höherem Molekulargewicht detektierbar, wie es im Fall einer Glykosylierung des Konstrukts zu erwarten gewesen wäre. Die Behandlung der Immunpräzipitate mit Endo H und PNGase F (3.10.5) hatte keinen Einfluss auf das Laufverhalten des BDV-M (Abb. 12B).

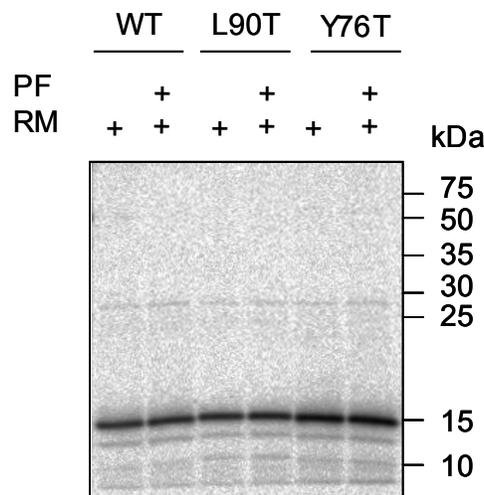


**Abb. 12: Expression der N-Glykosylierungs-Mutanten in HeLa-Zellen.**

**A)** Autoradiographie von immunpräzipitiertem Material aus nicht infizierten HeLa-Zellen (HeLa) und MVA-infizierten HeLa-Zellen (-), die mit pTM1-M (Wildtyp, WT) oder den Glykosylierungs-Mutanten pTM1-M-L90T (L90T) bzw. pTM1-M-Y76T (Y76T) transfiziert wurden. **B)** Material der beschriebenen transfizierten Zellen (-) wurde mit Endo H (EH) bzw. PNGase F (PF) behandelt und entsprechend analysiert. Die Pfeile (M) zeigen die Position des BDV-M, die Position der Markerproteine ist dargestellt.

**4.1.4.2 *In vitro* Transkription/Translation der *N*-Glykosylierungs-Mutanten in Gegenwart von Mikrosomen**

Die oben beschriebenen pTM1-M-Konstrukte wurden ebenfalls in der *in vitro* Transkription/Translation (3.8) in Anwesenheit von Mikrosomen eingesetzt (Abb. 13). Im *in vitro* Glykosylierungssystem ist bei den Glykosylierungs-Mutanten ebenfalls nur eine prominente Bande bei etwa 15 kDa (Monomer) und eine schwache Bande bei etwa 30 kDa (Dimer) sichtbar, jedoch keine Bande in dem Bereich, in dem eine glykosylierte Form zu erwarten gewesen wäre. Durch Behandlung mit PNGase F (3.10.5) änderte sich die Position der Banden nicht.



**Abb. 13: *In vitro* Transkription/Translation der *N*-Glykosylierungs-Mutanten.** Verwendung der Plasmide pTM1-M (Wildtyp, WT), pTM1-M-L90T (L90T) bzw. pTM1-M-Y76T (Y76T) in Anwesenheit von Mikrosomen (RM) und Behandlung der Proben mit PNGase F (PF). Der Pfeil (M) markiert die Position des BDV-M, die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

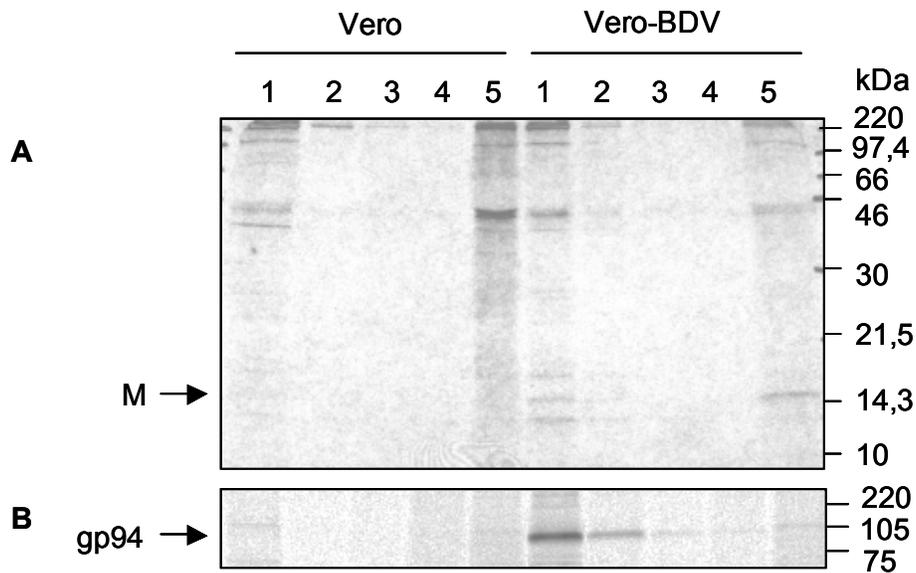
## 4.2 Untersuchungen zur Topologie und Lokalisation

### 4.2.1 Flotationsanalyse zur Charakterisierung der Membranassoziation

Virale Glykoproteine benötigen mindestens eine hydrophobe Transmembrandomäne in der Polypeptidkette, mit der sie in der Membran verankert sind. Solche integralen Membranproteine können nur durch die Behandlung mit Detergenzien aus der Membran isoliert werden. Mit der Membran assoziierte Proteine lassen sich im Gegensatz dazu von der Membran dissoziieren ohne diese zu zerstören.

Mit Hilfe einer Flotationsanalyse lassen sich zunächst lösliche von membranassoziierten Proteinen trennen, da die Membranen während der Ultrazentrifugation im Gradienten flotieren. Permanent BDV-infizierte Vero<sup>No98</sup>-Zellen und nicht infizierte Zellen wurden mit <sup>35</sup>S-Methionin/Cystein metabolisch markiert (3.10.3), die Zellen lysiert und der postnukleäre Überstand für die Flotationsanalyse eingesetzt (3.11.1). Der Gradient wurde nach der Ultrazentrifugation von oben fraktioniert und die Fraktionen zur Immunpräzipitation mit  $\alpha$ M128 und anschließend mit  $\alpha$ gpC (polyklonales Antiserum gegen das BDV-Glykoprotein) verwendet (3.10.4). Die immunpräzipitierten Proteine wurden durch SDS-PAGE (3.9.1) separiert und anschließend durch Autoradiographie (3.9.4) sichtbar gemacht.

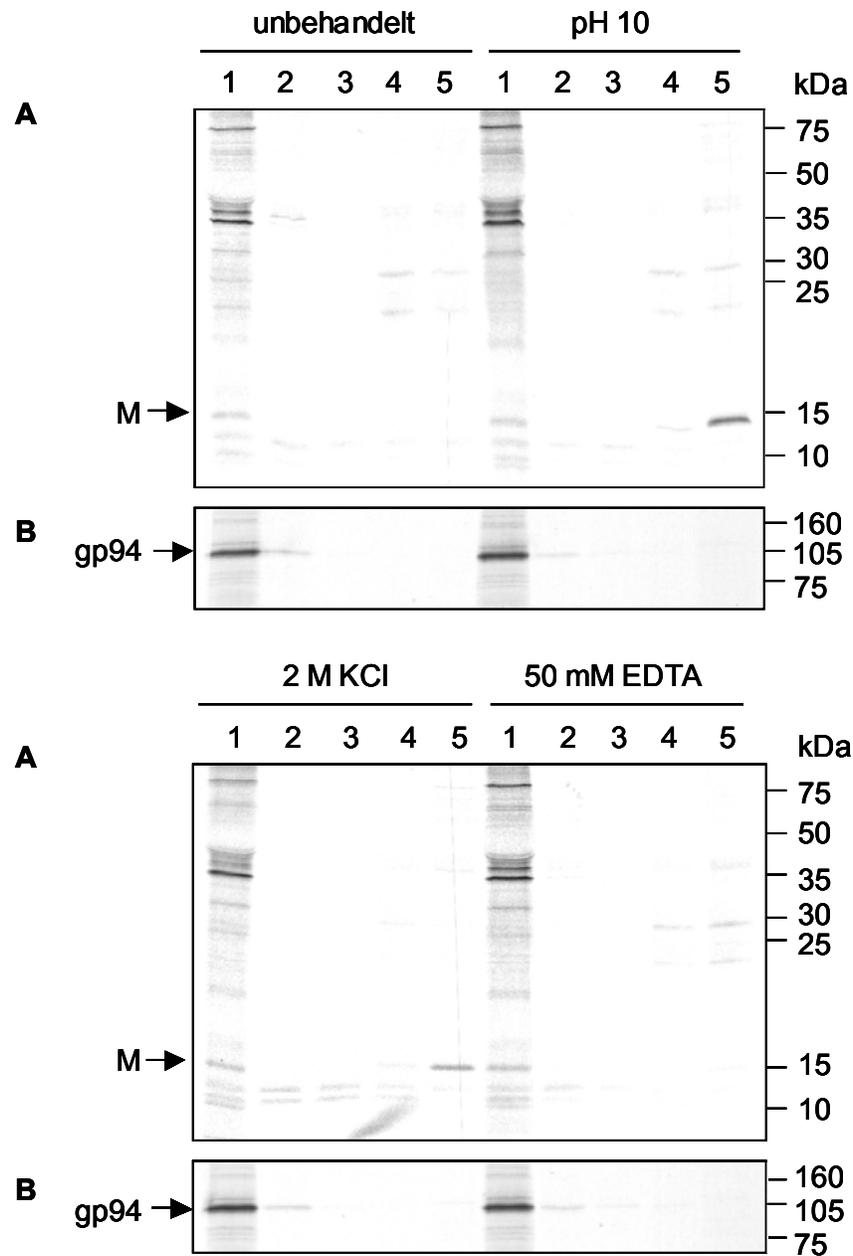
Wie in Abb. 14A zu erkennen, befindet sich das BDV-Matrixprotein sowohl in der Membranfraktion (Fraktion 1), wie auch in der Fraktion der löslichen Proteine (Fraktion 5). Das BDV-Glykoprotein liegt ausschließlich in membrangebundener Form vor (Abb. 14B, Fraktion 1).



**Abb. 14: Flotationsanalyse.** Fraktionierte Gradienten (von oben nach unten, Fraktionen 1-5) von nicht infizierten (Vero) bzw. permanent BDV-infizierten Vero<sup>No98</sup>-Zellen (Vero-BDV) mit **A)**  $\alpha$ M128 bzw. **B)**  $\alpha$ gpC immunpräzipitiert und nach SDS-PAGE durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren das BDV-M (M) bzw. das BDV-G (gp94), die Positionen der Proteinmarker sind angezeigt.

Zur näheren Charakterisierung der Membranassoziation wurde die Membranfraktion (Fraktion 1) mit verschiedenen Lösungen (Karbonat-Puffer pH 10, 2 M KCl bzw. 50 mM EDTA) behandelt (3.11.2) und die Proben einer erneuten Flotation unterzogen. Als Kontrolle wurde ein Anteil der Membranfraktion unbehandelt eingesetzt. Wie in Abb. 15A gezeigt, befindet sich das Matrixprotein der unbehandelten Probe nach der zweiten Flotation ausschließlich in der Membranfraktion, während sich ein Großteil des Proteins durch Behandlung mit Karbonatpuffer (pH 10) und 2 M KCl von der Membran lösen lässt und sich in der Fraktion löslicher Proteine (Fraktion 5) befindet. Durch die Behandlung mit 50 mM EDTA ließ sich das Matrixprotein nicht von der Membran lösen und flotierte weiterhin mit den Membranen. Zur Kontrolle wurden sämtliche Fraktionen zur Immunpräzipitation mit  $\alpha$ gpC eingesetzt, da es sich beim Glykoprotein um ein Transmembranprotein handelt und es daher durch die beschriebenen Behandlungen nicht von der Membran gelöst werden sollte. Wie in

Abb. 15B gezeigt, befindet sich das gp94 immer in der Membranfraktion (Fraktion 1).



**Abb. 15: Charakterisierung der Membranassoziation.** Gradienten nach Behandlung der Membranfraktion mit Karbonat-Puffer (pH 10), 2 M KCl und 50 mM EDTA bzw. unbehandelte Membranfraktion. Die Fraktionen wurden zur Immunpräzipitation mit **A)**  $\alpha$ M128 bzw. **B)**  $\alpha$ gpC eingesetzt und die Proteine nach SDS-PAGE durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Pfeile markieren das BDV-M (M) bzw. das BDV-G (gp94), die Positionen der Proteinmarker sind angezeigt.

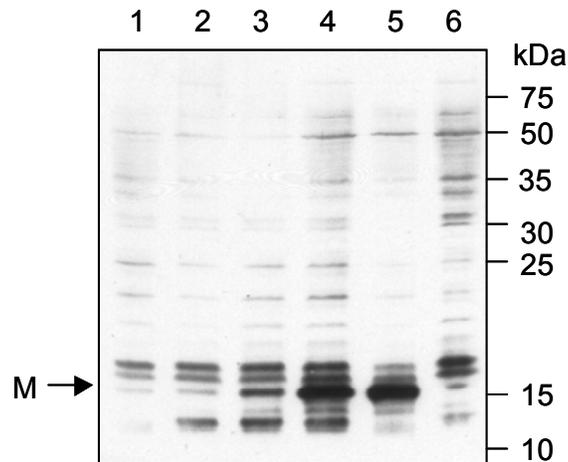
#### 4.2.2 Intrazelluläre Lokalisation des BDV-Matrixproteins in transfizierten BHK-T7-Zellen

Für die intrazelluläre Lokalisation wurde das Matrixprotein solitär in BHK-T7-Zellen exprimiert (3.7). BHK-T7-Zellen wurden in Schalen auf Glasplättchen ausgesät und mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGENE 6 mit dem Plasmid pTM1-M nach dem Transfektionsschema in Tab.1 transfiziert (3.7.1).

**Tab.1: Transfektionsschema für FuGENE 6.** Die angegebenen Mengen gelten für Kulturplatten mit 6 Vertiefungen.

Ansatz	Verhältnis FuGENE 6 : DNA	FuGENE 6	pTM1-M
1	6 : 1	3 µl	0,5 µg
2	3 : 1	3 µl	1 µg
3	3 : 2	3 µl	2 µg
4	6 : 1	6 µl	1 µg
5	3 : 1	6 µl	2 µg
6	Negativ-Kontrolle	--	--

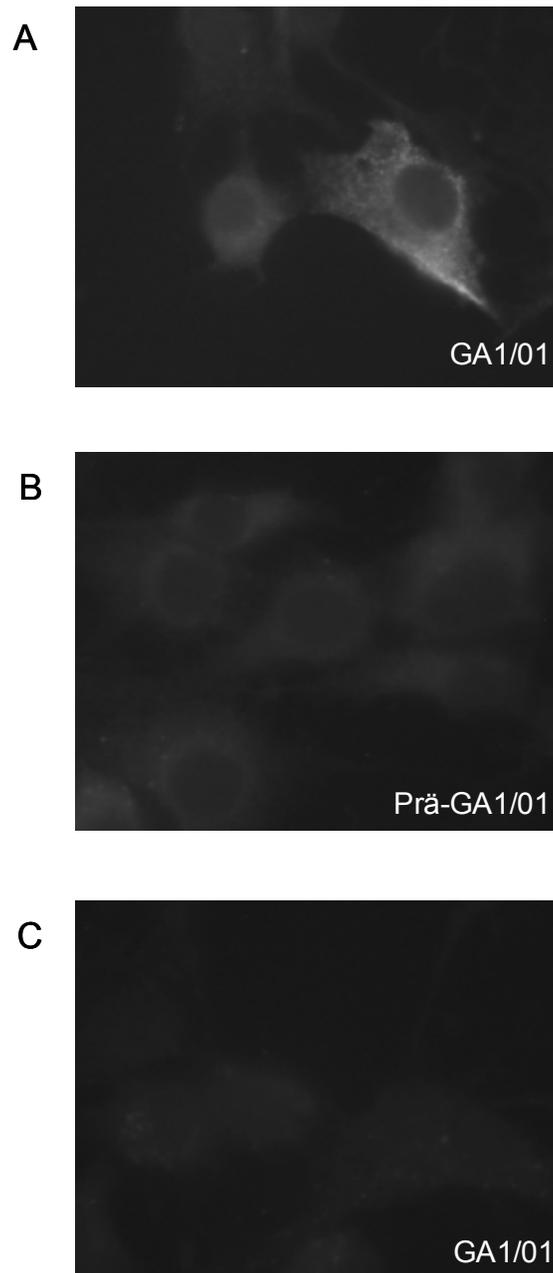
Die Zellen auf den Glasplättchen wurden für die indirekte Immunfluoreszenz (3.10.2) eingesetzt. Die restlichen Zellen in den Kulturschalen wurden abgeschabt, in SDS-Probenpuffer aufgenommen und nach SDS-PAGE (3.9.1) für eine Western Blot Analyse (3.10.1) eingesetzt. Als spezifischer Erstantikörper wurde das Kaninchen-Antiserum GA1/01 (1:2000) verwendet, als Zweitantikörper HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein (1:2000). Durch Western Blot Analyse (Abb. 16) lassen sich in den Ansätzen 1-5 ansteigende Mengen an Matrixprotein bei etwa 15 kDa erkennen, in der Negativ-Kontrolle fehlt diese Bande.



**Abb. 16: Western Blot Analyse von pTM1-M transfizierten BHK-T7-Zellen.** Die Zellen in den Ansätzen 1-6 wurden mit unterschiedlichen Verhältnissen von FuGENE 6 zu pTM1 transfiziert (siehe Tab. 1). Als spezifischer Antikörper wurde GA1/01 verwendet. Der Pfeil (M) markiert die Position des BDV-M, die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

Die Zellen auf den Glasplättchen wurden mit 3% PFA in MEM fixiert (3.10.2.1), mit 0,2% Tween-20 permeabilisiert (3.10.2.2) und mit dem spezifischen Kaninchen-Antiserum GA1/01 (1:100) inkubiert. Durch Inkubation mit einem Fluoreszein-gekoppelten Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein (1:100) wurden im Fluoreszenz-Mikroskop spezifische Antigen-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden Glasplättchen mit dem Präserum (Prä-GA1/01) inkubiert.

Bei den mit dem Serum GA1/01 inkubierten Präparaten ist eine deutliche zytoplasmatische Fluoreszenz zu erkennen (Abb. 17A), der Kern ist ausgespart. Bei der Verwendung des Präserums ist nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu erkennen (Abb. 17B), dies gilt auch für die mit spezifischem Antiserum inkubierten nicht transfizierten Präparate (Abb. 17C).



**Abb. 17: Indirekte Immunfluoreszenz: Intrazelluläre Lokalisation des BDV-M in pTM1-M transfizierten BHK-T7-Zellen. A)** Zellen aus Transfektionsansatz 2 mit spezifischem Antiserum GA1/01, **B)** Zellen aus Transfektionsansatz 3 mit Prä-Serum Prä-GA1/01 (Negativ-Kontrolle), **C)** Zellen aus nicht transfiziertem Ansatz 6 (Negativ-Kontrolle) mit spezifischem Antiserum GA1/01. Als Zweitantikörper wurden jeweils Fluoreszein-gekoppelte Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet.

### **4.3 Strukturbiologische Untersuchungen**

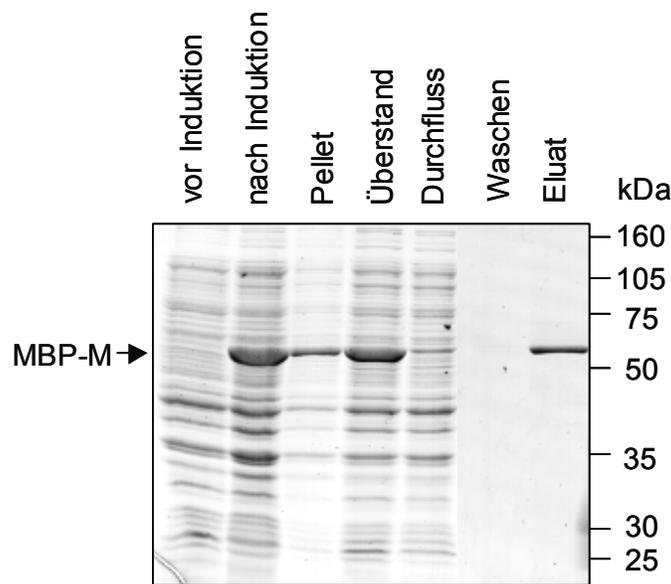
#### **4.3.1 Bakterielle Expression des BDV-Matrixproteins in *E. coli***

Zur Gewinnung großer Mengen Protein für die Immunisierung von Kaninchen und zur Kristallisation wurde das BDV-Matrixprotein in Bakterien überexprimiert. Dafür wurde mit dem Oligonukleotid-Paar gMfor*Bam*HI und gMrev*Sal*I das BDV-M aus dem Plasmid pTM1-M mittels PCR (3.2.1) amplifiziert und anschließend über die Schnittstellen *Bam* HI und *Sal* I (3.2.4) in den Expressions-Vektor pMAL-c2 (Abb. 6) kloniert (3.2.7) und zur Kontrolle sequenziert (3.4). Das Gen des Matrixproteins wurde dadurch stromabwärts des *malE* Gens von *E. coli* inseriert, welches für das Maltose-Bindungs-Protein (MBP) kodiert. Für die Expression (3.12.1) wurde der proteasedefiziente *E. coli* Stamm BL-21 verwendet.

#### **4.3.2 Reinigung des bakteriell exprimierten BDV-Matrixproteins**

##### **4.3.2.1 Reinigung des Fusionsproteins MBP-BDV-M über Amylose-Harz**

Das exprimierte Fusionsprotein MBP-BDV-M ließ sich aufgrund der Affinität des MBP für Maltose über eine Amylose-Säule reinigen (3.12.1). Abb. 18 zeigt die einzelnen Schritte der Reinigung. Der Großteil des exprimierten Fusionsproteins ist löslich und befindet sich daher nach Abtrennung unlöslicher Bestandteile im Überstand. Das Fusionsprotein bindet fast vollständig an das Amylose-Harz und ist nach Waschen des Materials als relativ reine Präparation vom Amylose-Harz eluierbar. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins liegt entsprechend dem der beiden einzelnen Proteine (MBP = 42,5 kDa, BDV-M = 16,2 kDa) bei etwa 58 kDa.

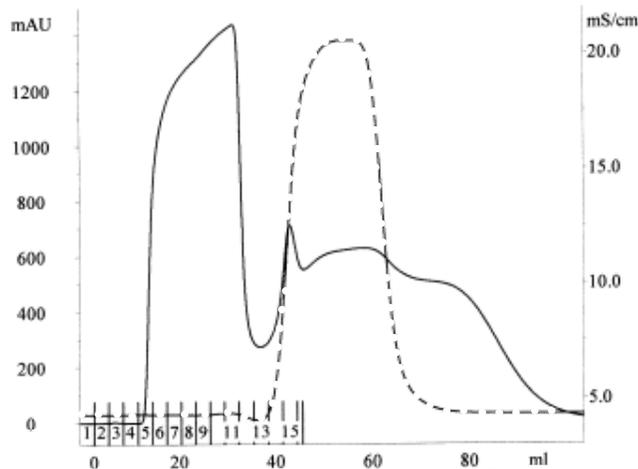


**Abb. 18: Expression des MBP-BDV-M Fusionsproteins und Reinigung über Amylose-Harz.** Eine rekombinante Bakterienkultur (vor Induktion) wurde bei einer  $OD_{595}$  von 0,5 mit IPTG induziert (nach Induktion). Die Bakterien wurden aufgeschlossen und unlösliche Bestandteile (Pellet) durch Zentrifugation vom Lysat (Überstand) getrennt. Dieser Überstand wurde mit Amylose-Harz inkubiert, ungebundene Proteine anschließend entfernt (Durchfluss) und das Harz gewaschen (Waschen). Das gebundene Fusionsprotein wurde mit 10 mM Maltose im Puffer eluiert (Eluat). Die Position des Fusionsproteins ist durch den Pfeil (MBP-M) markiert, die Position der verwendeten Markerproteine ist angezeigt.

#### 4.3.2.2 Reinigung des BDV-Matrixproteins über Kationenaustausch-Chromatographie

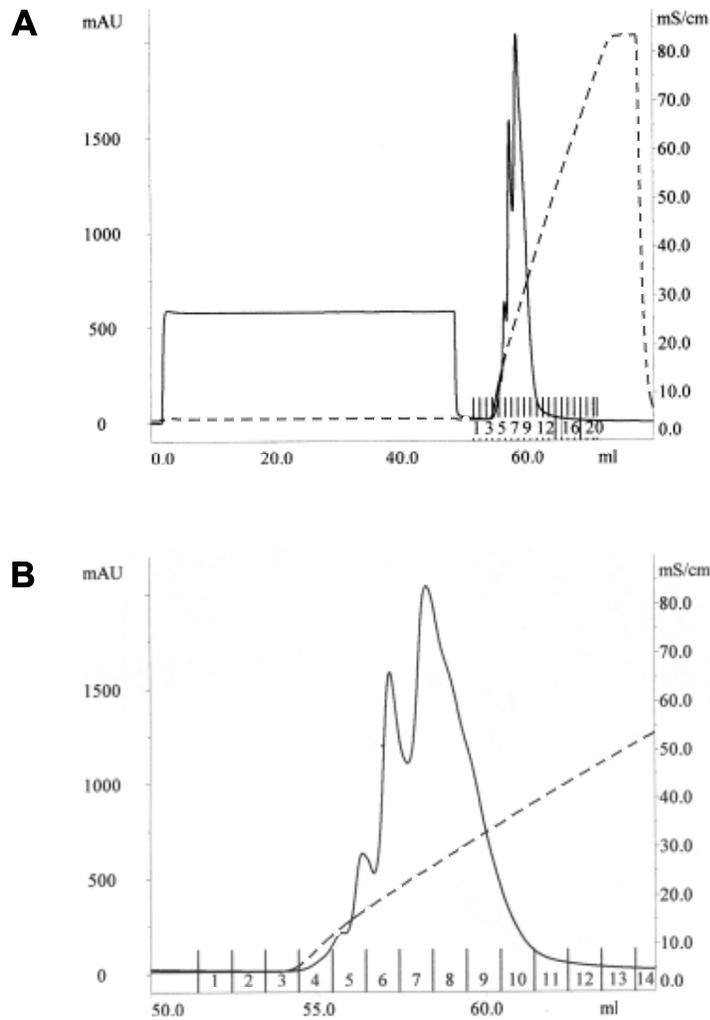
Durch die Zugabe von Faktor Xa wurde das Fusionsprotein an der zwischen dem MBP und dem Matrixprotein liegenden Spaltstelle in seine beiden Komponenten gespalten (3.12.1). Da die Reinigung über Amylose-Harz in einem Puffer mit 200 mM NaCl durchgeführt wurde, musste die Probe vor der Kationenaustausch-Chromatographie über eine „HiPrep® 26/10 Desalting“ Säule entsalzt werden. Bei dieser Säule wird das Trennungsprinzip einer Gelfiltration verwendet. Wie Abb. 19 zeigt, können die Proteine (durchgezogene Linie = Extinktion bei 280 nm) annähernd ungehindert die Säule durchfließen (Fraktionen 5-12), während Salze

später eluieren. Das Salz lässt sich durch Anstieg der Leitfähigkeit (gestrichelte Linie) identifizieren.



**Abb. 19: Entsalzung der Protein-Lösung.** Die durchgezogene Linie stellt die Proteinmenge dar (Extinktion bei 280 nm in mAU). Salze werden durch die Leitfähigkeit (mS/cm) angezeigt (gestrichelte Linie).

Anschließend wurden die einzelnen Protein-Komponenten mit Hilfe einer starken Kationenaustauscher-Säule (Mono S HR 5/5) getrennt. Beim BDV-Matrixprotein handelt es sich um ein stark basisches Protein (berechneter isoelektrischer Punkt  $pI = 10,0$ ), während das Maltose-Bindungs-Protein ein saures Protein ist (berechneter isoelektrischer Punkt  $pI = 4,7$ ). Durch die gewählten Puffer-Bedingungen ( $pH 7,6$ ) war das Matrixprotein positiv geladen und wurde an das Mono S-Säulenmaterial gebunden, während sich das negativ geladene MBP im Durchfluss befand (Abb. 20A). Der Faktor Xa (berechneter  $pI = 5,1$ ) befand sich ebenfalls im Durchfluss. Das gebundene BDV-Matrixprotein wurde nach dem Auswaschen ungebundener Proteine durch einen ansteigenden Salzgradienten (25 mM - 1 M NaCl in 20 Säulenvolumen) eluiert (Abb. 23). Dabei zeigte sich, dass das Matrixprotein nicht in Form eines einzelnen Peaks eluiert wurde, sondern mehrere überlagerte Peaks auftraten (Abb. 20B). Vermutlich stellen diese Peaks unterschiedliche multimere Formen des Matrixproteins dar.



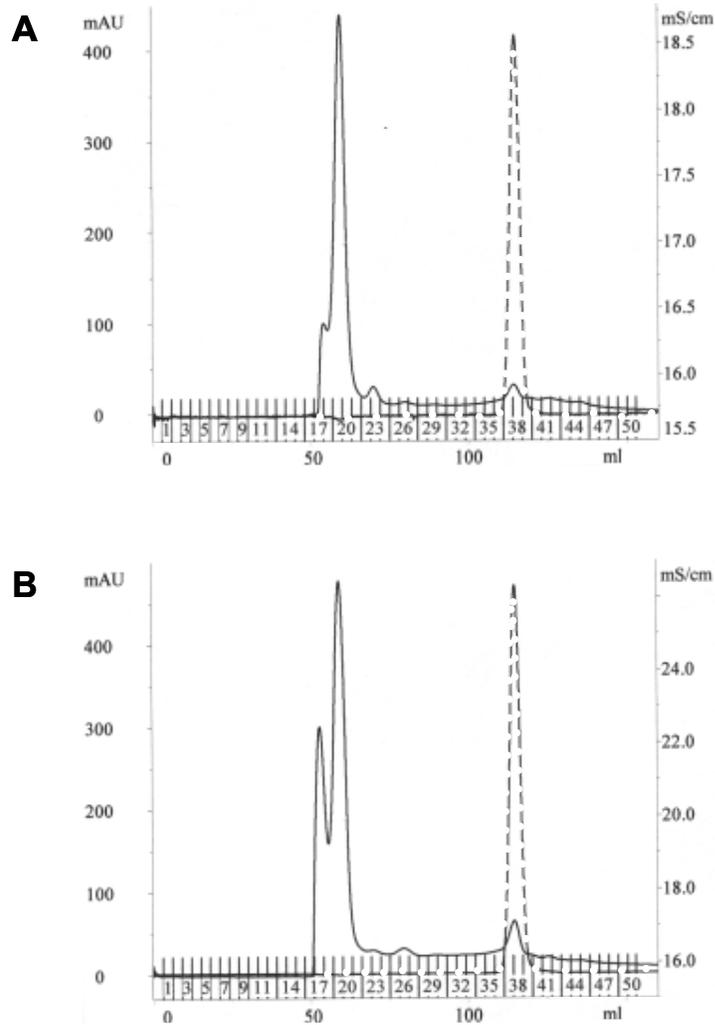
**Abb. 20: Kationenaustausch-Chromatographie. A)** Die durchgezogene Linie stellt die Proteinmenge dar (Extinktion bei 280 nm in mAU). Das MBP wurde nicht an die Säule gebunden und befand sich im Durchfluss (0 – 50 mL). Nach dem Auswaschen von ungebundenem Protein wurde mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten von 25 mM - 1 M NaCl in 20 Säulenvolumen (dargestellt durch die Leitfähigkeit in mS/cm, gestrichelte Linie) das gebundene BDV-M von der Säule eluiert. **B)** Der vergrößerte Ausschnitt des Elutionsprofils zeigt die verschiedenen überlappenden Protein-Peaks.

#### **4.3.2.3 Reinigung des BDV-Matrixproteins über Gelfiltrations-Chromatographie**

Da das Protein für die Kristallisation monodispers, d.h. in nur einer multimeren Form, vorliegen muss, wurden die verschiedenen multimeren Formen aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe durch Gelfiltration getrennt. Dazu wurden die Mono S-Fractionen 5-7 und 8-10 nacheinander über eine „HiLoad® 16/60 Superdex® 75 prep grade“ Säule gereinigt.

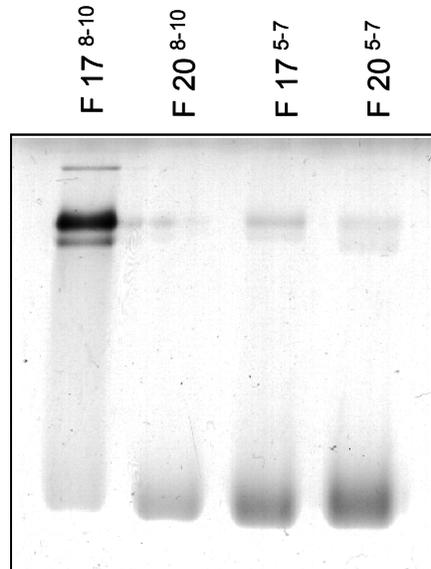
Aufgrund der Kalibrierung der Säule mit Standardproteinen (Amersham Pharmacia) lassen sich die Molekulargewichte der beiden auftretenden Hauptpeaks in Fraktion 17 und 20 (Abb. 21) auf etwa 120 und 60 kDa schätzen, was einem Oktamer und einem Tetramer des BDV-Matrixproteins entsprechen würde. Die genaue Bestimmung der Partikelgröße ist in 4.3.4 gezeigt.

Wie in Abb. 21A dargestellt, befindet sich in den Mono S-Fractionen 5-7 hauptsächlich die tetramere Form (Fraktion 20) des Moleküls und nur geringe Mengen der oktameren Form (Fraktion 17). In den Mono S-Fractionen 8-10 (Abb. 21B) liegen die oktamere (Fraktion 17) und tetramere Form (Fraktion 20) etwa im Verhältnis 1:2 vor.



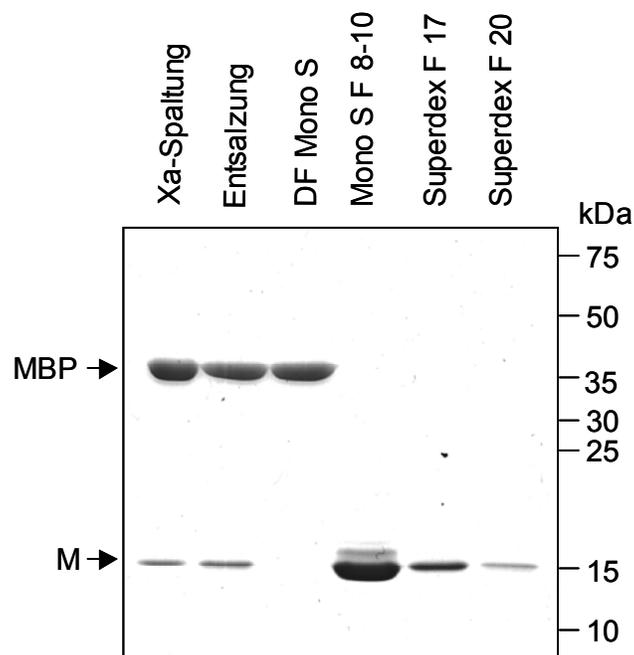
**Abb. 21: Gelfiltrations-Chromatographie.** Die durchgezogene Linie (Extinktion bei 280 nm in mAU) entspricht der Proteinmenge, die gepunktete Linie (Leitfähigkeit in mS/cm) entspricht der Salzkonzentration. **A)** Auftrennung der Mono S-Fractionen 5-7. **B)** Auftrennung der Mono S-Fractionen 8-10.

Durch die elektrophoretische Auftrennung einzelner Fraktionen im nativen Polyacrylamid-Gel (3.9.2) zeigen sich ebenfalls unterschiedliche multimere Formen. In Superdex-Fraktion  $17^{8-10}$  liegt überwiegend eine höhermolekulare Form vor (Abb. 22), während in Superdex-Fraktion  $20^{8-10}$  fast ausschließlich die niedermolekulare Form zu finden ist. Die Trennung ist in den Superdex-Fraktionen  $17^{5-7}$  und  $20^{5-7}$  nicht vollständig gegeben.



**Abb. 22: Analyse der Superdex 75-Fraktionen im nativen Polyacrylamid-Gel.** F  $17^{8-10}$  und F  $20^{8-10}$ : Superdex-Fraktionen 17 und 20 der Mono S-Fraktionen 8-10, F  $17^{5-7}$  und F  $20^{5-7}$ : Superdex-Fraktionen 17 und 20 der Mono S-Fraktionen 5-7.

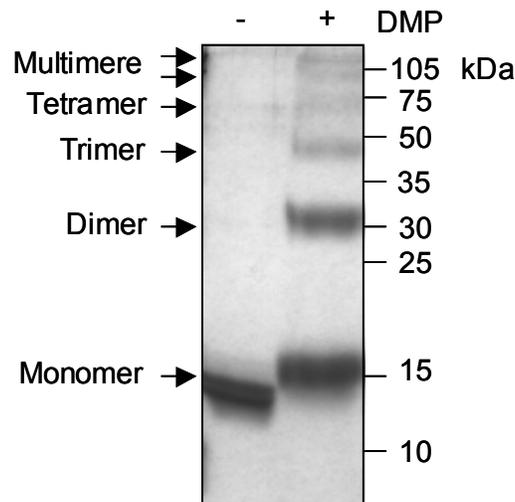
Zur Dokumentation der einzelnen Schritte während der Reinigung und deren Reinheit befindet sich eine Zusammenfassung in Abb. 23. Die verschiedenen multimeren Formen des Matrixproteins sind im SDS-Polyarylamid-Gel (3.9.1) nicht zu erkennen, da die Untereinheiten nicht kovalent verbunden sind und durch die Behandlung mit SDS in die Monomere dissoziieren. Das Matrixprotein stellt sich im Gel als Doppelbande in der Höhe des 15 kDa-Standards dar.



**Abb. 23: Übersicht der einzelnen Reinigungsschritte im SDS-Polyacrylamidgel.** Nach der Spaltung des gereinigten Fusionsproteins MBP-M mit Faktor Xa (Xa-Spaltung) wurde die Proteinlösung entsalzt (Entsalzung). Die beiden Komponenten MBP und M wurden mit einer Mono S Säule voneinander getrennt: das MBP befand sich im Durchfluss (DF Mono S), während das BDV-M an die Säule gebunden und durch einen steigenden NaCl-Gradienten eluiert wurde (Mono S F 8-10). Zur Trennung der multimeren Formen des BDV-M wurde das Protein über eine Superdex-Gelfiltrations-Säule gereinigt (Superdex F 17, Superdex F 20). Die Positionen der beiden Komponenten des Fusionsproteins sind durch Pfeile (MBP und M) gekennzeichnet, die Positionen der Markerproteine sind angegeben.

### 4.3.3 Chemische Quervernetzung des BDV-Matrixproteins zur Untersuchung der Multimerisierung

Die einzelnen Untereinheiten des BDV-M-Multimers sind nicht kovalent miteinander verbunden. Zur Darstellung der Multimerisierung in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelen wurden die Untereinheiten an freien Aminogruppen ( $\text{-NH}_2$  von Lysin) durch das homobifunktionale Vernetzungsreagenz Dimethylpimelimidat (DMP) kovalent miteinander verbunden (3.13.1). Es sind Monomere ( $\sim 15$  kDa), Dimere ( $\sim 30$  kDa), Trimere ( $\sim 45$  kDa) und Tetramere ( $\sim 60$  kDa), aber auch Aggregate mit höherem Molekulargewicht ( $\sim 90$  kDa und größer als  $100$  kDa) zu erkennen (Abb. 24). Durch die Zugabe von DMP verändert sich auch das Laufverhalten der monomeren BDV-M-Form.



**Abb. 24: Multimerisierung des BDV-M mit DMP.** Auftrennung im denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel von unbehandeltem (-) und mit DMP inkubiertem (+ DMP) BDV-M. Die Pfeile markieren die Positionen der einzelnen multimeren Formen (Monomer, Dimer, Trimer, Tetramer und Multimere) des BDV-M, die Positionen der Markerproteine sind angezeigt.

#### 4.3.4 Bestimmung des Stokes Radius von BDV-M-Partikeln

Zur genauen Bestimmung der Größe der multimeren BDV-M-Partikel im nativen System (4.3.2.3) wurde der hydrodynamische Radius (Stokes Radius; Siegel und Monty, 1966) bestimmt (3.13.2). Zunächst wurde die „Superdex 200 HR 10/30“ Säule mit Standardproteinen („Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit“) kalibriert. Das mit Dextran Blau (2000 kDa) ermittelte Ausschlussvolumen  $V_0$  der Säule liegt bei 8,45 mL, das Säulenvolumen  $V_t$  beträgt 24 mL. Die Elutionsvolumina  $V_e$  der Standardproteine und die der beiden BDV-Matrixprotein Proben sind in der Tab. 2 aufgeführt:

**Tab. 2: Bestimmung des Stokes Radius.** In der Tabelle sind die verwendeten Standardproteine mit zugehörigem Molekulargewicht (MW), Stokes Radius und dem ermittelten Elutionsvolumen ( $V_e$ ) sowie der daraus errechnete Wert für  $(-\log K_{av})^{1/2}$  angegeben. Für die beiden BDV-M Proben (Mono S F<sup>5-7</sup>, Mono S F<sup>8-10</sup>) ist das ermittelte Elutionsvolumen, bzw. der berechnete Wert für  $(-\log K_{av})^{1/2}$ , sowie der daraus ermittelte Wert für den Stokes Radius und das ungefähre Molekulargewicht angegeben.

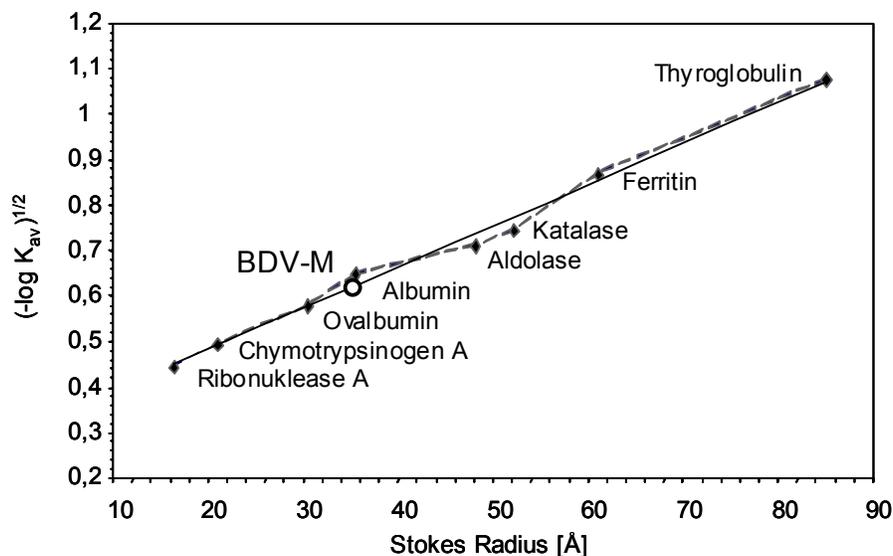
Protein	MW [kDa]	Stokes Radius [Å]	$V_e$ [mL]	$(-\log K_{av})^{1/2}$
Ribonuklease A	13,7	16,4	18,27	0,446
Chymotrypsinogen A	25	20,9	17,28	0,496
Ovalbumin	43	30,5	15,62	0,580
Albumin	67	35,5	14,32	0,651
Aldolase	158	48,1	13,26	0,714
Katalase	232	52,2	12,78	0,746
Ferritin	440	61,0	11,18	0,869
Thyroglobulin	669	85,0	9,53	1,078
BDV-M, Mono S F <sup>5-7</sup>	~ 67	35,38	14,85	0,621
BDV-M, Mono S F <sup>8-10</sup>	~ 66	35,04	14,91	0,618

Mit Hilfe der Formel

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

wurde der Verteilungs-Koeffizient  $K_{av}$  der einzelnen Standardproteine bestimmt und der Wert für  $(-\log K_{av})^{1/2}$  nach Laurent und Killander (1964) in Abhängigkeit vom jeweiligen Stokes Radius aufgetragen (Abb. 25). Für die Ausgleichsgerade gilt die Gleichung  $y = 0,009x + 0,3026$ , das Bestimmtheitsmaß der Geraden beträgt  $R^2 = 0,9918$ .

Die Auftrennung der Mono S Fraktionen 5-7 (siehe auch Abb. 20B, 21A) ergab einen Peak mit dem Elutionsvolumen 14,85 mL, woraus ein Stokes Radius von 35,38 Å errechnet werden konnte. Die Auftrennung der Mono S Fraktionen 8-10 (siehe auch Abb. 20B, 21B) ergab ebenfalls nur einen Peak mit dem Elutionsvolumen 14,91 mL (= 35,04 Å), jedoch keinen dem Oktamer entsprechenden zweiten Peak.

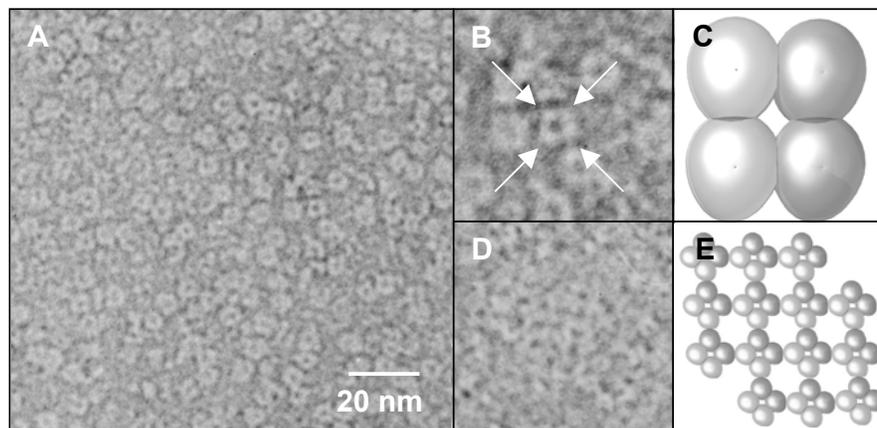


**Abb. 25: Bestimmung des Stokes Radius nach Laurent und Killander.** Die Superdex 200 Säule wurde mit Standardproteinen mit bekanntem Stokes Radius kalibriert. Mit Hilfe der Elutionsvolumina wurden die jeweiligen  $K_{av}$ -Werte ermittelt und  $(-\log K_{av})^{1/2}$  in Abhängigkeit des Stokes Radius aufgetragen. Mit Hilfe der Ausgleichsgeraden kann der Stokes Radius eines Proteins anhand seines Elutionsvolumens bestimmt werden.

#### 4.3.5 Darstellung von Einzelpartikeln im Elektronenmikroskop

Zur direkten Darstellung der räumlichen Struktur des BDV-Matrixproteins wurde rekombinantes Protein der Superdex Fraktionen 17 und 20 (Abb. 21B) für elektronenmikroskopische Studien verwendet (3.13.3). Die Übersicht (Abb. 26A) zeigt eine homogene Proteinlösung mit geringer Tendenz zur Aggregation. Unabhängig von der verwendeten Proteinfraction bilden die Proteine Tetramere in kubischer Anordnung (Abb. 26B), die als Modell in Abb. 26C dargestellt sind. Die Dimension des Tetramers (Kantenlänge 7 nm) stimmt mit der molekularen Masse von vier einzelnen Monomeren überein, basierend auf der Beziehung, die von Zipper *et al.* 1971 publiziert wurde.

Die einzelnen Tetramere fügen sich teilweise zu einer höheren Ordnung in Form eines zweidimensionalen Gitters zusammen (Abb. 26D), das zugehörige Modell ist in Abb. 26E gezeigt.



**Abb. 26: Einzelpartikel im Elektronen-Mikroskop. A)** Übersicht negativ-kontrastierter BDV-M-Partikel. **B)** Ausschnitt-Vergrößerung eines tetrameren BDV-M-Partikels, die Pfeile weisen auf die vier Monomere. **C)** Modell des Tetramers. **D)** Anordnung einzelner Tetramere zu einer gitterförmigen Struktur. **E)** Modell des BDV-M-Gitters.

#### 4.3.6 Limitierte Proteolyse des BDV-Matrixproteins

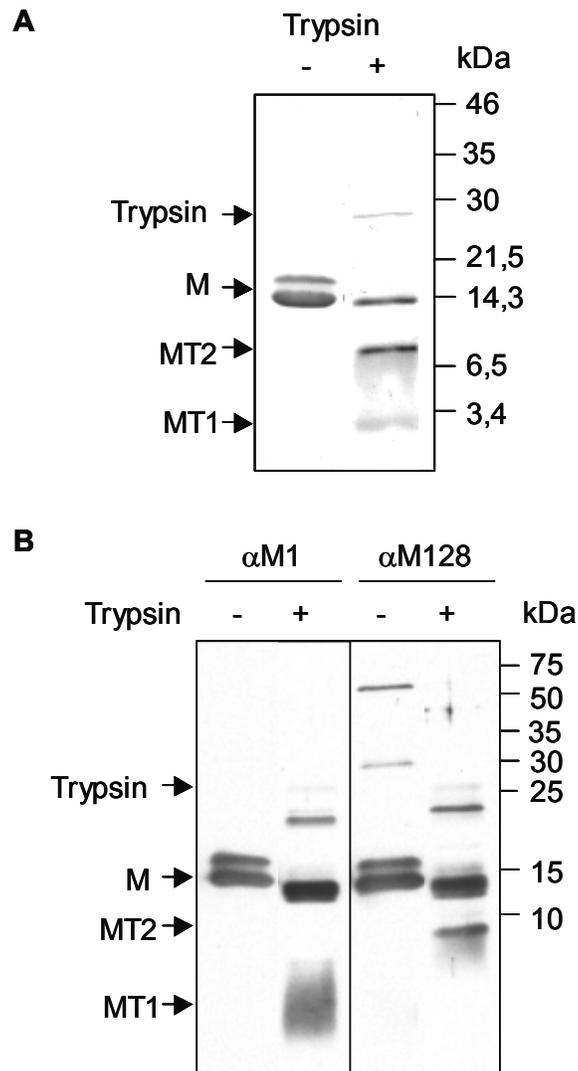
Die limitierte Proteolyse von nativen Proteinen kann zu Topologiestudien verwendet werden. Stark gefaltete und im Inneren des Proteins gelegene Spaltstellen werden tendenziell weniger genutzt, während in Bereichen mit geringer Faltungsdichte und an der Oberfläche exponierte Spaltstellen leichter gespalten werden können. Aufgrund dessen lassen sich z.B. einzelne Protein-Domänen bzw. Loop-Regionen identifizieren.

Das BDV-M besitzt insgesamt 17 Arginin- und Lysin-Reste. Bei vollständiger Spaltung durch Trypsin ergeben sich demzufolge 18 Spaltfragmente (FT1 - FT18), deren Peptidsequenzen und errechneten Molekulargewichte in Tab. 3 dargestellt sind. Bei limitierter Proteolyse sind einige ungespaltene größere Fragmente zu erwarten.

**Tab. 3: Spaltfragmente des BDV-M nach kompletter Spaltung mit Trypsin.** Die entstehenden Fragmente (FT1-FT18) sind mit Aminosäure-Position, Peptidsequenz und errechnetem Molekulargewicht (MW) aufgelistet.

Nr.	Position	Peptidsequenz	MW (Da)
FT1	-6 - 4	ISEFGSMNSK	1099,21
FT2	5 - 11	HSYVELK	874,99
FT3	12 -13	DK	261,28
FT4	14 - 34	VIVPGWPTLMLEIDFVGGTSR	2287,69
FT5	35 - 46	NQFLNIPFLSVK	1419,67
FT6	47 - 53	EPLQLPR	851,99
FT7	54 - 55	EK	275,30
FT8	56	K	137,18
FT9	57 - 94	LTDYFTIDVEPAGHSLVNIYFQIDDFLL TLNSLSVYK	4378,92
FT10	95 - 98	DPIR	499,56
FT11	99	K	137,18
FT12	100 - 104	YMFLR	728,90
FT13	105 - 107	LNK	373,45
FT14	108 - 111	EQSK	490,52
FT15	112 - 124	HAINAAFNVFSYR	1509,67
FT16	125 - 126	LR	287,35
FT17	127 - 138	NIGVGPLGPDIR	1207,38
FT18	139 -142	SSGP	346,34

Durch limitierte Spaltung von BDV-M mit Trypsin (3.13.4) ließ sich neben dem ungespaltenen Produkt eine prominente Bande bei etwa 8-9 kDa (MT2) erkennen, sowie ein kleines Spaltfragment (MT1) von etwa 2-4 kDa (Abb. 27A). Mit Hilfe des Antiserums gegen den N-Terminus des Matrixproteins ( $\alpha$ M1) wurde durch Western Blot Analyse (Abb. 27B) das kleine Spaltfragment MT1 detektiert, vom Antiserum gegen den C-Terminus ( $\alpha$ M128) das große Spaltfragment MT2.



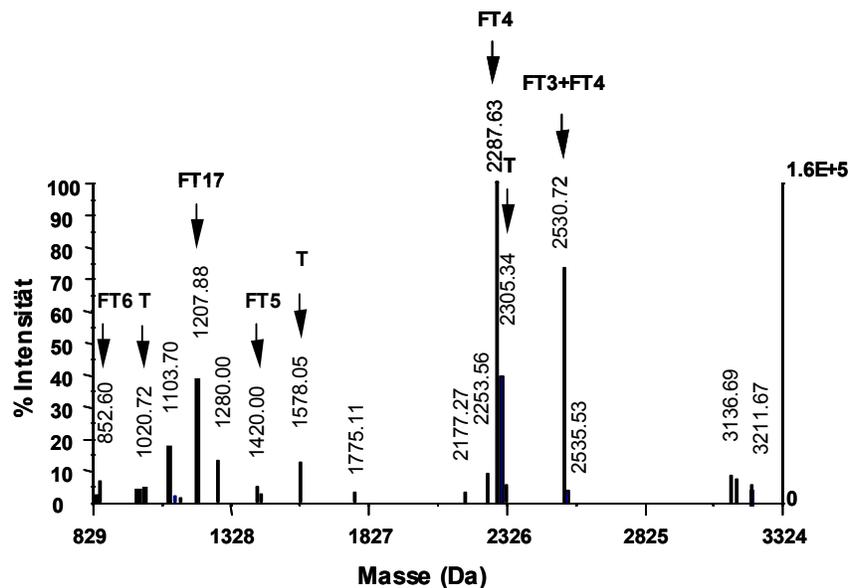
**Abb. 27: Limitierte Proteolyse von BDV-M mit Trypsin.** BDV-M vor (-) und nach (+) Behandlung mit Trypsin, die Pfeile zeigen das ungespaltene Protein (M), und die beiden Spaltfragmente (MT1 und MT2), sowie das zugesetzte Trypsin. **A)** Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE. **B)** Western Blot Analyse mit  $\alpha$ M1, gegen den N-Terminus des BDV-M und  $\alpha$ M128, gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet.

Aufgrund der Größe und der Bindung des jeweiligen Antikörpers wurden die Molekulargewichte möglicher ungespaltener Fragment-Kombinationen errechnet. Da das Antiserum  $\alpha$ M1 die Aminosäuren 2-16 erkennt, kommen für das Fragment MT1 (Abb. 27B) Kombinationen der ersten vier Fragmente FT1 bis FT4 in Frage (Tab. 4).

**Tab. 4: Mögliche Fragmentkombinationen für MT1.**

Fragment	MW (Da)	Fragment	MW (Da)	Fragment	MW (Da)
FT1-FT2	1956,19				
FT1-FT3	2199,45	FT2-FT3	1118,25		
FT1-FT4	4469,12	FT2-FT4	3387,92	<b>FT3-FT4</b>	<b>2530,95</b>
		FT2-FT5	4789,58	FT3-FT5	3932,61

Neben einigen komplett gespaltenen Fragmenten des Matrixproteins (FT4, FT5, FT6, FT17) und des Trypsins (T) ließ sich durch MALDI-TOF (3.12.6, 3.13.4) ein Peptid mit dem Molekulargewicht von 2530,72 Da identifizieren (Abb. 28). Diese Masse entspricht der Fragment-Kombination FT3+FT4, welches ein errechnetes Molekulargewicht von 2530,95 Da besitzt.



**Abb. 28: Bestimmung des Molekulargewichts der BDV-M-Fragmente nach limitierter Proteolyse durch MALDI-TOF.** Neben Fragmenten durch Trypsin-Eigenspaltung (T) finden sich sowohl komplett gespaltene Fragmente (FT4, FT5, FT6, FT17), wie auch ein resistentes Fragment (FT3+FT4) des BDV-M.

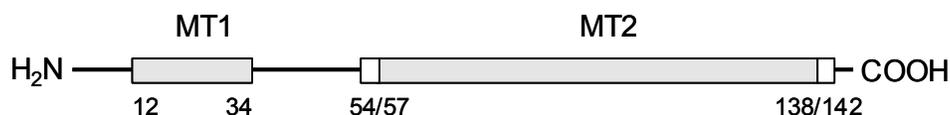
Zur Bestimmung des Fragments MT2 (Abb. 27B), das vom Antiserum  $\alpha$ M128 (gegen AS 128-142) erkannt wird, kommen Kombinationen der Fragmente F6 bis F18 in Frage (Tab. 5).

**Tab. 5: Mögliche Fragmentkombinationen für MT2.** Dem im SDS-Gel beobachteten Molekulargewicht entsprechende Fragmentkombinationen sind fett gedruckt.

Fragment	MW (Da)	Fragment	MW (Da)
FT18-FT10	5445,23	FT17-FT10	5116,91
FT18-FT9	<b>9806,15</b>	FT17-FT9	<b>9477,83</b>
FT18-FT8	<b>9934,32</b>	FT17-FT8	<b>9606,00</b>
FT18-FT7	10191,61	FT17-FT7	<b>9863,29</b>
		FT17-FT6	10697,27

Das genaue Molekulargewicht des Fragmentes MT2 ließ sich durch MALDI-TOF nicht ermitteln, da der Hintergrund an kleinen Peptiden nicht zuließ größere Fragmente zu detektieren.

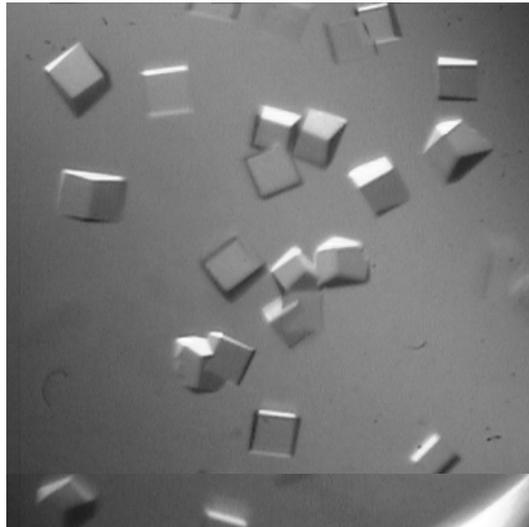
Aus den Ergebnissen der partiellen Trypsinspaltung ergeben sich zwei Protease-resistente Domänen, die in Abb. 29 dargestellt sind.



**Abb. 29: Modell der Protease-resistenten Domänen des BDV-M.** Die kleine Domäne MT1 wurde vom Antiserum  $\alpha$ M1 erkannt und konnte durch MALDI-TOF genau bestimmt werden. Die große Domäne MT2 wurde vom Antiserum  $\alpha$ M128 erkannt, das genaue Molekulargewicht konnte allerdings nicht bestimmt werden, so dass die Enden variabel eingezeichnet sind.

#### 4.3.7 Kristallisation des BDV-Matrixproteins

Für die Kristallisation wurde reines, monodisperses BDV-Matrixprotein verwendet. Das Protein aus der Superdex-Fraktion 20 der Mono S-Fraktionen 8-10 (siehe Abb. 21B) wurde auf eine Konzentration von 5 mg/mL ankonzentriert (3.12.5) und wie in 3.13.5 beschrieben bei 18°C zur Kristallisation eingesetzt. Zuerst wurden 96 verschiedenen Kristallisationsbedingungen (Anhang, Tab. 6) getestet. Unter den Bedingungen 29, 46, 68 und 92 entstanden verschieden geformte Mikrokristalle. Durch Optimierung der Kristallisationsbedingung Nr. 92 konnten mit der Kristallisations-Lösung (10% PEG 8000, 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7,0) größere Kristalle von etwa 0,1 x 0,1 x 0,1 mm erhalten werden (Abb. 30).



**Abb. 30: Proteinkristalle des rekombinanten BDV-M.** Das Bild zeigt einen Tropfen mit BDV-M-Kristallen, die eine Abmessung von ungefähr 0,1 x 0,1 x 0,1 mm haben.

Die Röntgenstruktur-Analyse ergab für die Kristalle die Raumgruppe I432, deren kubische Einheitszelle die Abmessungen  $a=b=c=144,6 \text{ \AA}$  besitzt. Eine Einheitszelle dieser Raumgruppe enthält 48 asymmetrische Einheiten. Vorausgesetzt, dass die asymmetrische Einheit ein Molekül enthält, besitzt diese ein spezifisches Volumen  $V_M$  von  $3,89 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$  (Matthews, 1968) und einen Lösungsanteil von 66%. Die am Synchrotron gemessenen Daten (beamline ID14-1, ESRF = European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble) reichen bis zu einer Auflösung von  $3.1 \text{ \AA}$ .

#### **4.3.8 Lösung des Phasenproblems**

Zur Lösung des Phasenproblems wurden sowohl bestehende Kristalle aus dem nativen BDV-Matrixprotein mit Schwermetall-Salzen angereichert (3.13.6) als auch Selenomethionin-haltiges Protein zur Kristallisation eingesetzt (3.13.6.2). Die entstandenen Kristalle wurden zusammen mit den nativen Kristallen am Synchrotron (MPG/GBF beamline BW6, DESY = Deutsches Elektronen-Synchrotron, Hamburg) vermessen.

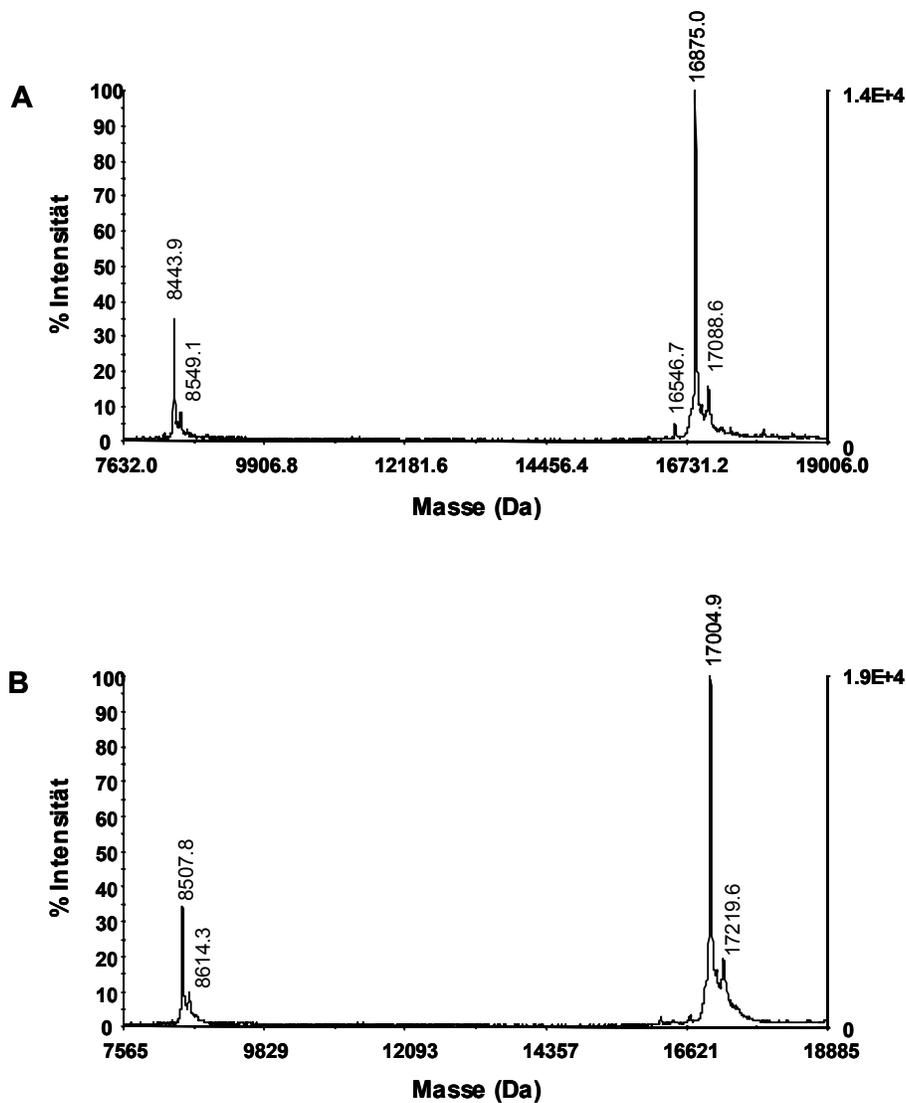
##### **4.3.8.1 Vermessung der Schwermetall-Kristalle**

Anhand der Röntgenstrahlungs-Fluoreszenz wurde der Einbau der Schwermetall-Atome überprüft. Bei den  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ - und  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ -Kristallen zeigte sich ein anomales Signal und eine Streuung bis  $3,8$  bzw.  $3,2 \text{ \AA}$ . Durch Verwendung der erhaltenen Daten ließ sich eine vorläufige Elektronendichte errechnen, die jedoch zur Lösung der dreidimensionalen Struktur nicht geeignet ist.

##### **4.3.8.2 Nachweis des Einbaus von Selenomethionin in das BDV-Matrixprotein durch MALDI-TOF**

Das errechnete Molekulargewicht von BDV-M ( $142 \text{ AS}$ ) und dem zusätzlichen Peptid ( $6 \text{ AS}$ ), welches sich aufgrund der Klonierung am *N*-Terminus befindet, beträgt  $16.878 \text{ Da}$ . Die Messung durch MALDI-TOF

ergab ein Molekulargewicht des nativen Proteins von 16.875 Da (Abb. 31A). Der Hauptpeak (16.875,0 Da) entspricht dabei der Masse des untersuchten Proteins, der kleinere Nachpeak (17.088,6 Da) kommt durch die artifizielle kovalente Bindung von Protein und Sinapinsäure (Matrix-Addukt) zustande, der kleine Vorpeak (16.546,7 Da) durch die unspezifische Abspaltung von Seitengruppen aufgrund der starken Laser-Strahlung. Der Peak im linken Teil des Diagramms (8.443,9 Da) entspricht der Hälfte der Proteinmasse und ist eine doppelt-protonierte Form, die aufgrund dessen doppelt so schnell fliegt.



**Abb. 31: Bestimmung des Molekulargewichts durch MALDI-TOF. A) Natives BDV-M, Superdex-Fraktion 20. B) Selenomethionin-haltiges BDV-M, Superdex-Fraktion 20.**

Das gemessene Molekulargewicht des Selenomethionin-Proteins beträgt 17.005 Da (Abb. 31B), was eine Differenz von 130 Da zur nativen Form bedeutet. Der Unterschied im Molekulargewicht von Methionin zu Selenomethionin beträgt 46,9 Da, was auf einen Austausch von zwei der drei im BDV-M enthaltenen Methionin-Reste gegen Selenomethionin spricht, die allerdings oxidiert vorliegen. Das Selenomethionin ist für eine Oxidation durch Luftsauerstoff wesentlich anfälliger als das Methionin.

#### **4.3.8.3 Kristallisation von Selenomethion-haltigem BDV-Matrix-protein**

Das Selenomethionin-haltige BDV-M wurde zur Kristallisation wie in 3.13.5 beschrieben eingesetzt. Da sich jedoch spontan keine Kristalle bildeten, wurden Mikrokristalle des nativen Proteins als Kristallisationskeime eingesetzt. Es ergaben sich kleine Kristalle, die am Synchrotron vermessen wurden. Diese zeigten zwar ein schwaches Signal bei der Röntgenstrahlungs-Fluoreszenz, ergaben aber keine verwendbaren Messdaten.

## 5 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit charakterisiert. Die Untersuchungen gliederten sich in drei eng miteinander verbundene Themengebiete: 1) die Frage der ungewöhnlichen Glykosylierung, 2) die Topologie und Membranassoziation, sowie 3) die Struktur des BDV-Matrixproteins.

### 5.1 N-Glykosylierung des BDV-Matrixproteins

Zur Untersuchung der intrazellulären Prozessierung und möglichen N-Glykosylierung des BDV-Matrixproteins wurden verschiedene voneinander unabhängige zellbiologische und biochemische Methoden angewandt. Das Matrixprotein stellte sich nach SDS-PAGE als prominente Bande in der Höhe von 15 kDa dar, mit Banden geringerer Intensität bei 30 und 60 kDa, die Dimere und Tetramere des Moleküls repräsentieren. Dabei war die Größe des Matrixproteins unabhängig davon, welches Probenmaterial mit den zwei spezifischen Antikörpern analysiert wurde: Matrixprotein aus einer Viruspräparation, aus BDV-infiziertem Rattengehirn, aus *in vitro* Transkription/Translation und permanent BDV-infizierten Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Virusstämmen infiziert waren (4.1.1). Das Matrixprotein ist bei den untersuchten Stämmen (Stamm He/80, Stamm RW98, Stamm V und Stamm No98) hoch konserviert, auf DNA-Ebene ist es zu etwa 90% identisch, auf Proteinebene sogar zu 99%.

Aufgrund der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche (4.1.2) ist die Abspaltung eines mutmaßlichen N-terminalen Signalpeptids eindeutig auszuschließen. Die computergestützte Analyse zur Vorhersage von Transmembran-Helices und Proteintopologie SOSUI (Hirokawa *et al.*, 1998) bestätigte dieses Ergebnis. Dies stellte die für eine N-Glykosylierung notwendige Translokation in das endoplasmatische Retikulum in Frage.

Die von Kliche *et al.*, 1994 und Stoyloff *et al.*, 1994 und 1998 publizierte *N*-Glykosylierung konnte weder durch Behandlung des *in vivo* synthetisierten Matrixproteins mit verschiedenen Endoglykosidasen (4.1.3.1), noch durch Lektin-Bindungsstudien (4.1.3.2) bestätigt werden. Auch die *in vitro* Translationsexperimente in Anwesenheit von Mikrosomen, die eine *N*-Glykosylierung zulassen, ergaben ebenfalls keinen Hinweis auf ein glykosyliertes Matrixprotein (4.1.3.3).

Daraus resultierte die Frage, ob die von den Autoren vorgeschlagenen alternativen *N*-Glykosylierungsstellen ( $N_{74}IY$ ,  $LN_{88}SLS$ ) in der Zelle generell zugänglich für den Glykosylierungs-Apparat sind. Zur Klärung wurden die alternativen *N*-Glykosylierungsstellen durch Mutagenese in das Konsensus-Motiv für *N*-Glykosylierungen umgewandelt (4.1.4). Doch auch diese mutierten Proteine wurden sowohl im *in vitro* Translations-system in Anwesenheit von Mikrosomen (4.1.4.2) als auch durch solitäre Expression in Zellkultur (4.1.4.1) nicht glykosyliert. Zusammenfassend lässt sich aufgrund dieser Resultate eine *N*-Glykosylierung des Matrixproteins des BDV eindeutig ausschließen.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse widersprechen somit den publizierten Daten von Kliche *et al.*, 1994, Hatalski *et al.*, 1995, Stoyloff *et al.*, 1997 und 1998. Die Frage, warum in vorherigen Studien ein *N*-glykosyliertes Matrixprotein identifiziert wurde, bleibt ungeklärt. Eine plausible Erklärung ist, dass Proteine aus Gehirn und Zellkultur nach der Methode von Schädler *et al.*, 1985 isoliert wurden, wodurch aber kein reines Matrixprotein erhalten wurde. Höchst wahrscheinlich enthielt die Präparation außer BDV-M auch Verunreinigungen aus dem Zellmaterial, wie Kohlenhydrate und Proteoglykane, die in der Gelelektrophorese zusammen mit dem Matrixprotein wanderten und daher den Kohlenhydrat-Anteil vortäuschten. Das Zusammentreffen von Kohlenhydraten und BDV-M bedeutet aber nicht, dass die Kohlenhydrate kovalent mit dem Protein verbunden sind, eventuell hat das basische BDV-M saure *N*-Acetylneuraminsäure-haltige Glykokonjugate gebunden. Wird dieses Material zur Herstellung von Antikörpern verwendet, werden diese nicht nur das BDV-M, sondern unter Umständen auch wiederum Kohlenhydrate erkennen. Ob dies der Fall war, ließ sich nicht mehr überprüfen, da mir

das ursprünglich verwendete Antiserum jener Arbeitsgruppe nicht zur Verfügung stand.

## **5.2 Membranassoziation des BDV-Matrixproteins**

Da Matrixproteine für die Auskleidung der Innenseite der viralen Membran verantwortlich sind, sollte die Membranassoziation des BDV-Matrixproteins charakterisiert und die genaue Topologie geklärt werden. Nach der computergestützten Vorhersage für Transmembran-Helices und Proteintopologie HMMTOP (*hidden Markov model topology predictor*, Tusnady und Simon, 2001) hat die Aminosäureregion 78-98 unter Umständen das Potential einer Membranverankerung des Moleküls als Transmembran-Helix (Anhang, Abb. 32). In Flotationsanalysen konnte jedoch eindeutig gezeigt werden, dass das Matrixprotein innerhalb der BDV-infizierten Zelle sowohl in löslicher wie auch in membranassoziierter, jedoch nicht in integrierter Form vorliegt (4.2.1). Im Polyacrylamidgel zeigt die lösliche und die membranassoziierte Form ein identisches Laufverhalten, was auf ein identisches Molekulargewicht zurückzuführen ist. Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit wird vermutlich als lösliches zytoplasmatisches Protein synthetisiert und wird während der Virusreifung zu einem membranassozierten Protein. Diese Vermutung wurde durch indirekte Immunfluoreszenz bestätigt, bei der sich eine typische zytoplasmatische Lokalisation mit ausgespartem Nukleus zeigte (4.2.2). Der Transport zur Zelloberfläche und die damit eventuell verbundene Interaktion mit anderen Virusproteinen, wie z.B. dem Nukleoprotein und der zytoplasmatischen Domäne des Glykoproteins sind noch gänzlich ungeklärt.

Das BDV-Matrixprotein lässt sich durch den Einfluss hoher Salzkonzentrationen und hoher pH-Werte zum Teil von der Membran lösen (4.2.1). Dies schließt eine hydrophobe Transmembrandomäne als Anker für die Membranassoziation aus und weist es als ein peripheres Membranprotein aus, welches über schwache ionische Wechselwirkungen an die Membran gebunden ist. Diese Ergebnisse werden durch computergestützte Vorhersagen in Bezug auf die Proteintopologie

bestätigt, die das BDV-Matrixprotein als lösliches Protein ohne Transmembran-Helix ausweisen (SOSUI, Hirokawa *et al.*, 1998; TMAP, Persson und Argos, 1994). Ob hydrophobe Peptidomänen des BDV-M mit der Membran interagieren, oder bei Protein-Protein Wechselwirkungen eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt.

Die Membranassoziation des BDV-M an der Innenseite des Viruspartikels bzw. an der dem Zytoplasma zugewandten Seite der zellulären Membranen widerspricht einem *N*-glykosylierten Matrixprotein. Dafür wäre eine Transmembrandomäne notwendig gewesen, wie im Falle des BDV-Glykoproteins gp94, welches auch bei Behandlung mit hohen Salzkonzentrationen und hohen pH-Werten in der Membran inseriert bleibt.

Die funktionshomologen Matrixproteine vom Influenza Virus, dem Ebola Virus und dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV) besitzen deutlich größere Molekulargewichte als das des BDV. Sie werden ebenfalls als lösliche Proteine synthetisiert, interagieren aber wesentlich fester mit der Zellmembran, da sie sich nicht durch die Behandlung mit KCl, EDTA oder basischem pH von der Membran lösen lassen (Chong und Rose, 1993; Kretzschmar *et al.*, 1996). Spezifische hydrophobe Peptid-Domänen sind keine Voraussetzung für die Membranbindung viraler Matrixproteine, wie für das Influenza Matrixprotein gezeigt wurde (Kretzschmar *et al.*, 1996).

### **5.3 Struktur des BDV-Matrixproteins**

Bisher ist nur von wenigen Viren die Struktur des Matrixproteins auf atomarer Ebene bekannt. Hinzu kommt, dass speziell von Negativ-Strang-RNA Viren nur Fragmente des Matrixproteins kristallisierbar waren (Dessen *et al.*, 2000a; Gaudier *et al.*, 2001). Zum Vergleich mit anderen viralen Matrixproteinen, zu denen das BDV-Matrixprotein nur äußerst geringe Sequenzhomologien aufweist, sollte die Struktur bestimmt werden. Da das Matrixprotein eine zentrale Rolle beim Zusammenbau der Viren spielt, ist die Struktur auch für zukünftige Untersuchungen der Wechselwirkungen des Matrixproteins mit dem zytoplasmatischen Teil des Glykoproteins und dem Nukleokapsid wichtig.

Bereits in den gezeigten Western Blot Analysen waren unter denaturierenden Bedingungen der Proteinauftrennung schwache Banden zu erkennen, die eine dimere und tetramere Form des Matrixproteins zeigten. Zur genauen Untersuchung der Struktur wurde das Protein daher bakteriell überexprimiert und gereinigt (4.3.1 und 4.3.2). Beim letzten Schritt der Reinigung unter nicht-denaturierenden Bedingungen - einer Gelchromatographie - lassen sich deutlich zwei unterschiedliche multimere Formen des Matrixproteins erkennen.

Der durch Gelfiltration ermittelte Stokes Radius beträgt  $\sim 35 \text{ \AA}$  (3,5 nm) und stimmt in etwa mit dem des Albumins aus Rinderserum überein, welches ein Molekulargewicht von 67 kDa besitzt (4.3.4). Demzufolge handelt es sich um Tetramere des BDV-Matrixproteins. Es treten außerdem Oktamere auf, die jedoch nur nach längerer Inkubation bei hoher Salzkonzentration beobachtet werden konnten. Die stabile Form ist daher wahrscheinlich das Tetramer. Auch ließen sich nur Kristalle aus der Fraktion der Tetramere gewinnen.

Da aufgrund fehlender Cystein-Reste im Protein keine Disulfid-Brücken möglich sind, interagieren die Untereinheiten der Multimere nicht-kovalent miteinander. Durch massenspektrometrische Untersuchungen (MALDI-TOF-Analysen, 4.3.8.2) wurde daher nur die monomere Form gemessen.

Im Gegensatz dazu wurde von der Arbeitsgruppe H. Ludwig, Berlin durch MALDI-TOF-Analyse von angeblich gereinigtem BDV-M aus Gehirnmaterial eines infizierten Pferdes ein Protein mit dem Molekulargewicht von etwa 68 kDa detektiert (Stoyloff *et al.*, 1997). Da außerdem ein isoelektrischer Punkt des Isolates von 6,5 durch isoelektrische Fokussierung bestimmt wurde, der erheblich vom errechneten isoelektrischen Punkt des BDV-M von 10 abweicht, handelt es sich bei diesem gereinigten Protein höchstwahrscheinlich um ein Glykoprotein zellulären Ursprungs.

Nur in nativen Systemen wie der Gelfiltration und in der nativen Gelelektrophorese sind die hier beschriebenen multimeren Formen des BDV-M deutlich darzustellen (4.3.2.3). Mit Hilfe eines chemischen Quervernetzers ließen sich jedoch die multimeren Formen auch in der denaturierenden SDS-PAGE darstellen (4.3.3). Neben den nativ beobachteten Tetrameren und Oktameren sind außerdem Trimere und

andere multimere Formen zu erkennen, was sich möglicherweise auf unvollständige Vernetzung zurückführen lässt. Die Doppelbande der monomeren Form ist nach Zugabe des Quervernetzers im SDS-Gel nicht mehr nachweisbar. Da durch die Massenanalyse die Reinheit der Präparation gezeigt werden konnte, ist die Doppelbande höchstwahrscheinlich auf unterschiedliche Konformationen des Monomers zurückzuführen. Durch die Addition des Quervernetzers wird eine der beiden möglichen Konformationen bevorzugt.

Die limitierte Proteolyse des BDV-Matrixproteins mit Trypsin deutet auf zwei proteaseresistente Domänen hin (4.3.6). Die Strukturanalyse des Ebola Virus VP40 ergab ebenfalls eine Organisation des Matrixproteins in zwei Domänen (Dessen *et al.*, 2000b), wobei dem C-terminalen Bereich eine Aufgabe bei der Membranassoziation zugeschrieben wurde, dem N-terminalen Bereich eine Funktion bei der Hexamerisierung (Ruigrok *et al.*, 2000b).

Die Darstellung von negativkontrastierten Einzelpartikeln des BDV-M im Elektronenmikroskop zeigt ebenfalls Tetramere (4.3.5), die sich in kubischer Form anordnen. Aufgrund der Vergrößerung lässt sich eine Kantenlänge dieser Quader von etwa 7 nm errechnen. Diese Dimension stimmt nach der Beziehung zwischen Molekulargewicht und Molekülvolumen (Zipper *et al.*, 1971) mit einem Tetramer überein. Die ermittelte Kantenlänge entspricht außerdem exakt dem doppelten Stokes Radius.

Die Anordnung einzelner Tetramere zu netzartigen Aggregaten auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen gibt einen Hinweis darauf, wie das Matrixprotein die Innenschicht der Virushülle auskleidet.

Unter den Negativ-Strang-RNA-Viren besitzt das BDV mit 16,2 kDa das kleinste Matrixprotein. Obwohl es keine offensichtlichen Sequenz-Homologien zu anderen viralen Matrixproteinen gibt, sondern nur einige kurze Abschnitte eine Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz besitzen, ist es von Interesse, ob auf der Ebene der dreidimensionalen Struktur höhere Homologien zu finden sind.

Zur weiteren detaillierten Strukturaufklärung wurden röntgenkristallographische Methoden verwendet, um ein atomares Modell für das BDV-M zu entwickeln. Mit Hilfe dieser Daten sollen künftige Untersuchungen von

Wechselwirkungen zwischen dem Matrixprotein und Nukleoprotein, Glykoprotein und Lipiden erleichtert werden. Dies soll zum Verständnis der allgemeinen Bedeutung von Matrixproteinen lipidumhüllter Viren bei der Bildung von Viruspartikel und der dabei ablaufenden Prozesse an der Plasmamembran beitragen.

Das BDV-Matrixprotein ist unter den *Mononegavirales* das einzige Matrixprotein, das in voller Länge kristallisiert wurde (4.3.7). Bisher wurden die dreidimensionalen Strukturen von Protease-resistenten Teilen des VP40 vom Ebola Virus und M1 vom Influenza Virus durch Röntgenstrukturanalyse und für M1 auch durch Tritium-Bombardement bestimmt (Dessen *et al.*, 2000b; Harris *et al.*, 2001; Shishkov *et al.*, 1999). Die Struktur einiger retroviraler Matrixproteine, wie z.B. von SIV und HIV-1 (Rao *et al.*, 1995; Massiah *et al.*, 1996), wurden ebenfalls durch Röntgenstrukturanalyse und NMR bestimmt.

Interessanterweise bilden retrovirale Matrixproteine Trimere, das VP40 vom Ebola Virus Hexamere und das M1 vom Influenza Virus bildet Dimere (Arzt *et al.*, 2001; Ruigrok *et al.*, 2000b; Scianimanico *et al.*, 2000). Die atomare Struktur von viralen Matrixproteinen und elektronenmikroskopische Bilder von negativkontrastierten Partikel halfen, die Architektur der Schicht aus Matrixproteinen unter der viralen Hüllmembran aufzuklären. Aus den wenigen bisherigen dreidimensionalen Strukturen zeichnen sich zwei verschiedene Prinzipien ab: 1) eine regelmäßige Zusammenlagerung von Oligomeren zu einem Netz und 2) eine wiederholte Addition von gestaffelten Oligomeren, die ein flexibles Band in Form einer Helix bilden. Das Band aus gestaffelten Dimeren tritt beim M1 vom Influenza Virus auf. Das VP40 vom Ebola Virus bildet ein regelmäßiges Netz, wie es auch der Fall für das Matrixprotein von BDV zu sein scheint. Diese beiden Prinzipien sind jedoch nur bei isolierten Matrixproteinen beobachtet worden. Welchen Einfluss Lipide und andere virale Proteine auf die Ausbildung dieser Strukturen haben, ist nicht geklärt.

Mit Hilfe der nativen BDV-M-Kristalle und der aus den Schwermetall-Kristallen erhaltenen Phaseninformation wurde eine vorläufige Elektronendichte berechnet. Die schon in der Elektronenmikroskopie beobachteten

Tetramere bilden im Kristall ein dreidimensionales Netz, das die Selbstassoziation der Tetramere zeigt. Es ergaben sich jedoch unerwartete Schwierigkeiten bei der Interpretation der bisherigen Messdaten. Da sich die einzelnen Untereinheiten teilweise überlagern, war es nicht möglich, weitere strukturelle Berechnungen aufgrund der bisherigen Röntgenbeugungsanalysen durchzuführen. Zur Bestimmung der Umriss einzelner Monomere, sowie Sekundärstrukturelementen und letztendlich der genauen dreidimensionalen Struktur sind noch weitere Phaseninformationen notwendig. Diese können durch die Anreicherung von Kristallen mit einer Reihe weiterer Schwermetall-Verbindungen erzielt werden.

#### **5.4 Resümee**

Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem BDV-Matrixprotein 1) um ein typisches nicht-glykosyliertes Matrixprotein handelt, welches als zytoplasmatisches Protein synthetisiert wird und 2) im Laufe der Virusreifung über schwache Wechselwirkungen mit Lipidmembranen assoziiert. 3) Strukturbiologische Analysen zeigten die nicht-kovalente Organisation des Moleküls zu Tetrameren, die sich wiederum zu einer höheren Ordnung, einem molekularen Netz zusammenfügen. Dies gibt erste Hinweise darauf, wie das Matrixprotein als Strukturprotein die Virushülle von innen auskleidet und somit einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von Viruspartikeln und die Stabilisierung der Virionen hat.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das Genprodukt des ORF III des Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) für ein nicht-glykosyliertes typisches virales Matrixprotein kodiert, das die Innenseite der viralen Hüllmembran auskleidet. Aus diesem Grund sollte das Matrixprotein als M oder p16, aber nicht länger als Glykoprotein gp18 bezeichnet werden.

Das Fehlen einer Glykosylierung wurde durch verschiedene unabhängige Studien belegt: 1) BDV-M zeigte das gleiche elektrophoretische Laufverhalten, unabhängig davon ob es *in vitro* ohne Glykosylierungssystem oder in eukaryotischen Zellen in Anwesenheit eines Glykosylierungs-Apparates synthetisiert wurde. 2) BDV-M, welches in eukaryotischen Zellen synthetisiert wurde, zeigte kein verändertes elektrophoretisches Laufverhalten nach Behandlung mit Endoglykosidasen. 3) Es war keine Bindung von Lektinen an BDV-M nachweisbar, obwohl das Protein durch spezifische Antikörper in Western Blot Analysen detektiert wurde. 4) Die in früheren Publikationen vorgeschlagenen alternativen Glykosylierungsstellen N-I-Y und L-N-S-L-S wurden nicht vom eukaryotischen Glykosylierungsapparat verwendet, auch nicht nachdem sie zur typischen N-Glykosylierungssequenz N-X-T mutiert worden waren.

Wie in Flotationsanalysen gezeigt, assoziierte das Matrixprotein mit zellulären Membranen, ließ sich jedoch durch alkalischen pH und durch hohe Salzkonzentrationen dissoziieren. Seine in der indirekten Immunfluoreszenz gezeigte zytoplasmatische Lokalisation spricht ebenfalls für ein nur peripher mit der Membran assoziiertes Protein und nicht für ein Transmembran-Glykoprotein.

Gelfiltrations-Chromatographie und Elektronenmikroskopie ergaben, dass BDV-M stabile, jedoch nicht kovalent assoziierte Tetramere mit einem Stokes Radius von 35 Å bildet. Weiterhin assoziieren diese tetrameren Untereinheiten spontan zu netzförmigen Strukturen.

Die genaue Struktur des BDV-M soll in naher Zukunft durch Röntgenstrukturanalyse gelöst werden. In dieser Arbeit wurden sowohl native, als auch Derivatkristalle zur Lösung des Phasenproblems hergestellt.

**7 LITERATURVERZEICHNIS**

- Arzt, S., F. Baudin, A. Barge, P. Timmins, W.P. Burmeister und R.W. Ruigrok. 2001. Combined results from solution studies on intact influenza virus M1 protein and from a new crystal form of its N-terminal domain show that M1 is an elongated monomer. *Virology*. **279**:439-446.
- 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.
- Belyaev, A.S., D. Stuart, G. Sutton und P. Roy. 1994. Crystallization and preliminary X-ray investigation of recombinant simian immunodeficiency virus matrix protein. *J Mol Biol*. **241**:744-746.
- Bergmann, J.E., und P.J. Fusco. 1988. The M protein of vesicular stomatitis virus associates specifically with the basolateral membranes of polarized epithelial cells independently of the G protein. *J Cell Biol*. **5**:1707-1715.
- 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.
- 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.
- Bullock, W.O., J.M. Fernandez, und J.M. Short. 1987. *Biotechniques*. **5**:376-378
- Carbone, K.M., S.A. Rubin, A.M. Sierra-Honigmann und H.M. Lederman. 1993. Characterization of a glial cell line persistently infected with borna disease virus (BDV): influence of neurotrophic factors on BDV protein and RNA expression. *J Virol*. **67**:1453-1460.

- Carroll, M.W., und B. Moss. 1997. Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line. *Virology*. **238**:198-211.
- Chong, L.D., und J.K. Rose. 1993. Membrane association of functional Vesicular Stomatitis Virus matrix protein in vivo. *J. Virol.* **67**:407-414.
- Chong, L.D., und J.K. Rose. 1994. Interactions of normal and mutant vesicular stomatitis virus matrix proteins with the plasma membrane and nucleocapsids. *J Virol.* **68**:441-447.
- Creighton, T.E. 1997. Protein Structure, Practical approach series, Oxford University Press, 2<sup>nd</sup> edition.
- Crowley, J.F., I.J. Goldstein, J. Arnarp und J. Lonngren. 1984. Carbohydrate binding studies on the lectin from *Datura stramonium* seeds. *Arch Biochem Biophys.* **231**:524-533.
- 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.
- Dessen, A., E. Forest, V. Volchkov, O. Dolnik, H.D. Klenk und W. Weissenhorn. 2000a. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the matrix protein from Ebola virus. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **56**:758-760.
- Dessen, A., V. Volchkov, O. Dolnik, H.D. Klenk und W. Weissenhorn. 2000b. Crystal structure of the matrix protein VP40 from Ebola virus. *EMBO J.* **19**:4228-4236.
- 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.
- Fuerst T.R., E.G. Niles, F.W. Studier und B. Moss. 1986. Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **83**:8122-8126.
- Furrer, E., T. Bilzer, L. Stitz und O. Planz. 2001. Neutralizing antibodies in persistent Borna disease virus infection: prophylactic effect of gp94-specific monoclonal antibodies in preventing encephalitis. *J Virol.* **75**:943-951.
- Garnier, J., J.F. Gibrat und B. Robson. 1996. GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol.* **266**:540-553.
- Gaudier, M., Y. Gaudin und M. Knossow. 2001. Cleavage of vesicular stomatitis virus matrix protein prevents self-association and leads to crystallization. *Virology.* **288**:308-314.
- Goldstein, I.J., und C.E. Hayes. 1978. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* **35**:127-340.

- 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.
- Gosztanyi, 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.
- Guermeur, Y. 1997. Combinaison de classifieurs statistiques, application à la prédiction de la structure secondaire des protéines. PhD Thesis
- Harris, A., F. Forouhar, S. Qiu, B. Sha und M. Luo. 2001. The crystal structure of the influenza matrix protein M1 at neutral pH: M1-M1 protein interfaces can rotate in the oligomeric structures of M1. *Virology.* **289**:34-44.
- Hatalski, C.G., S. Kliche, L. Stitz und W.I. Lipkin. 1995. Neutralizing antibodies in Borna disease virus-infected rats. *J Virol.* **69**:741-747.
- 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., 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.
- Hirokawa, T., S. Boon-Chieng und S. Mitaku. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins *Bioinformatics* **14**:378-379
- 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.
- Kretzschmar, E., M. Bui und J.K. Rose. 1996. Membrane association of influenza virus matrix protein does not require specific hydrophobic domains or the viral glycoproteins. *Virology.* **220**:37-45.
- Kyhse-Andersen, J. 1984. Electroblothing 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.
- Laurent, T.C., und J.A. Killander. 1964. Theory of Gel Filtration and its Verification. *J. Chromatogr.* **14**:317-330.
- 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.
- Massiah, M.A., D. Worthylake, A.M. Christensen, W.I. Sundquist, C.P. Hill und M.F. Summers. 1996. Comparison of the NMR and X-ray structures of the HIV-1 matrix protein: evidence for conformational changes during viral assembly. *Protein Sci.* **5**:2391-2398.

- Matthews, B. 1968. Some crystal forms of bovine chymotrypsinogen B and chymotrypsinogen A. *J. Mol. Biol.* **33**:491-497.
- Moss, B. 1990. Recombinant DNA virus vectors for vaccination. *Semin Immunol.* **2**:317-327.
- Mullis, K.B., und F.A. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-350.
- Narayan, O., S. Herzog, K. Frese, H. Scheefers und R. Rott. 1983. Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. *Science.* **220**:1401-1403.
- Niemann, H., B. Boschek, D. Evans, M. Rosing, T. Tamura und H.D. Klenk. 1982. Post-translational glycosylation of coronavirus glycoprotein E1: inhibition by monensin. *EMBO J.* **1**:1499-1504.
- Niemann, H., R. Geyer, H.D. Klenk, D. Linder, S. Stirm und M. Wirth. 1984. The carbohydrates of mouse hepatitis virus (MHV) A59: structures of the O-glycosidically linked oligosaccharides of glycoprotein E1. *EMBO J.* **3**:665-70.
- Nowotny, N., J. Kolodziejek, C.O. Jehle, A. Suchy, P. Staeheli und M. Schwemmler. 2000. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J Virol.* **74**:5655-5658.
- Persson, B., und P. Argos. 1994. Prediction of transmembrane segments in proteins utilising multiple sequence alignments *J. Mol. Biol.* **237**:182-192.
- Rao, Z., A.S. Belyaev, E. Fry, P. Roy, I.M. Jones und D.I. Stuart. 1995. Crystal structure of SIV matrix antigen and implications for virus assembly. *Nature.* **378**:743-747.
- Richt, J.A., J.E. Clements, S. Herzog, J. Pyper, K. Wahn und H. Becht. 1993. Analysis of virus-specific RNA species and proteins in Freon-113 preparations of the Borna disease virus. *Med Microbiol Immunol.* **182**:271-280.

- Richt, J.A., A. Schmeel, K. Frese, K.M. Carbone, O. Narayan und R. Rott. 1994. Borna disease virus-specific T cells protect against or cause immunopathological Borna disease. *J Exp Med.* **179**:1467-1473.
- 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., S. Herzog, B. Fleischer, A. Winokur, J. Amsterdam, W. Dyson und H. Koprowski. 1985. Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. *Science.* **228**:755-756.
- Ruigrok, R.W., A. Barge, P. Durrer, J. Brunner, K. Ma und G.R. Whittaker. 2000a. Membrane interaction of influenza virus M1 protein. *Virology.* **267**:289-298.
- Ruigrok, R.W., G. Schoehn, A. Dessen, E. Forest, V. Volchkov, O. Dolnik, H.D. Klenk und W. Weissenhorn. 2000b. Structural characterization and membrane binding properties of the matrix protein VP40 of Ebola virus. *J Mol Biol.* **300**:103-112.
- 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.
- Schädler, R., H. Diringer und H. Ludwig. 1985. Isolation and characterization of a 14500 molecular weight protein from brains and tissue cultures persistently infected with borna disease virus. *J Gen Virol.* **66**:2479-2484.
- 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.

- 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.
- 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.
- Scianimanico, S., G. Schoehn, J. Timmins, R.H. Ruigrok, H.D. Klenk und W. Weissenhorn. 2000. Membrane association induces a conformational change in the Ebola virus matrix protein. *EMBO J.* **19**:6732-6741.
- Shibuya, N., I.J. Goldstein, W.F. Broekaert, M. Nsimba-Lubaki, B. Peeters und W.J. Peumans. 1987. The elderberry (*Sambucus nigra* L.) bark lectin recognizes the Neu5Ac(alpha 2-6)Gal/GalNAc sequence. *J Biol Chem.* **262**:1596-1601.
- Shibuya, N., I.J. Goldstein, E.J. Van Damme und W.J. Peumans. 1988. Binding properties of a mannose-specific lectin from the snowdrop (*Galanthus nivalis*) bulb. *J Biol Chem.* **263**:728-734.
- Shishkov, A.V., V.I. Goldanskii, L.A. Baratova, N.V. Fedorova, A.L. Ksenofontov, O.P. Zhirnov und A.V. Galkin. 1999. The in situ spatial arrangement of the influenza A virus matrix protein M1 assessed by tritium bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**:7827-7830.

- Siegel, L.M., und K.J. Monty. 1966. Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim Biophys Acta*. **112**:346-362.
- Staheli, P., C. Sauder, J. Hausmann, F. Ehrensperger und M. Schwemmler. 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.
- Stoyloff, R., T. Briese, K. Borchers, W. Zimmermann und H. Ludwig. 1994. N-glycosylated protein(s) are important for the infectivity of Borna disease virus (BDV). *Arch Virol*. **137**:405-409.
- Stoyloff, R., A. Strecker, L. Bode, P. Franke, H. Ludwig und F. Hucho. 1997. The glycosylated matrix protein of Borna disease virus is a tetrameric membrane-bound viral component essential for infection. *Eur J Biochem*. **246**:252-257.
- Stoyloff, R., L. Bode, K. Borchers und H. Ludwig. 1998. Neutralization of borna disease virus depends upon terminal carbohydrate residues alpha-D-man, beta-D-GlcNAc of glycoproteins gp17 and gp94. *Intervirology*. **41**:135-140.
- Sutter G., und B. Moss. 1995. Novel vaccinia vector derived from the host range restricted and highly attenuated MVA strain of vaccinia virus. *Dev Biol Stand*. **84**:195-200.
- Tusnady, G.E., und I. Simon. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics*. **17**:849-850.
- Walker, M.P., I. Jordan, T. Briese, N. Fischer und W.I. Lipkin. 2000. Expression and characterization of the Borna disease virus polymerase. *J Virol*. **74**:4425-4428.

- Wang, W.C., und R.D. Cummings. 1988. The immobilized leucoagglutinin from the seeds of *Maackia amurensis* binds with high affinity to complex-type Asn-linked oligosaccharides containing terminal sialic acid-linked alpha-2,3 to penultimate galactose residues. *J Biol Chem.* **263**:4576-4585.
- 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.
- Wolff, T., R. Pflieger, 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.
- Wood, W.B. 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J Mol Biol.* **16**:118-133.
- 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.
- Zimmermann, W., H. Breter, M. Rudolph und H. Ludwig. 1994. Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further about the genome. *J Virol.* **68**:6755-6758.
- Zipper, P., O. Kratky, R. Herrmann und T. Hohn. 1971. An x-ray small angle study of the bacteriophages fr and R17. *Eur J Biochem* **18**:1-9.

**8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

<i>aqua bidest.</i>	destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
ATTC	<i>american tissue type culture collection</i>
BDV	<i>Borna Disease Virus</i>
BDV-M	Matrixprotein des BDV
BHK	<i>baby hamster kidney</i>
Bp	Basenpaare
CCD	<i>charged coupled device</i>
CD	<i>cell determinant</i>
CEF	<i>chicken embryo fibroblasts</i>
C-terminal	carboxy-terminal
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
def	defizient
DF	Durchfluss
dITP	Desoxyinosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSA	<i>Datura stramonium agglutinin</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EH	Endoglykosidase H
Endo H	Endoglykosidase H
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> (und andere)
F	Fraktion
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
FT	Fragment durch Trypsin-Spaltung
G	Glykoprotein
GNA	<i>Galanthus nivalis agglutinin</i>
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HRP	<i>horse raddish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IRES	interne Ribosomen-Eintrittsstelle

K <sub>av</sub>	Verteilungs-Koeffizient
kB	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Polymerase
L90T	Glykosylierungsmutante (Leucin an AS-Position 90 gegen Threonin ausgetauscht)
<i>LacZ</i>	Gen der β-Galaktosidase
LB	<i>Luria Bertani</i>
LMP	<i>low melting point</i>
M	Matrixprotein
M.O.I	<i>multiplicity of infection</i> (Zahl der infektiösen Partikel pro Zelle)
MAA	<i>Maackia amurensis agglutinin</i>
MAD	multiple anomale Dispersion
MALDI-MS	Matrix-unterstützte Laserdesorptions/Ionisations-Massenspektrometrie
<i>malE</i>	Gen des Maltosebindungsproteins
MBP	Maltosebindungsprotein
MBP-M	Fusionsprotein aus Maltosebindungsprotein und BDV-Matrixprotein
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MDCK	<i>madin darby canine kidney</i>
MPG/GBT	Max Planck Gesellschaft / Gesellschaft für Biotechnologie-Forschung
MT1	Protease-resistents BDV-Fragment Nr. 1
MT2	Protease-resistents BDV-Fragment Nr. 2
MVA	modifiziertes Vaccinia-Virus Typ Ankara
MW	<i>molecular weight</i>
NBT/X-Phosphat	<i>nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i>
NP	Nukleoprotein
N-terminal	amino-terminal
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> (offener Leserahmen)
P	Phosphoprotein
PAS	Protein A Sepharose

PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PF	Peptid <i>N</i> -Glykosidase F
PFU	<i>plaque forming units</i>
pl	isoelektrischer Punkt
PNA	<i>Peanut agglutinin</i>
PNGase F	Peptid <i>N</i> -Glykosidase F
RIPA	<i>radio immunoprecipitation assay</i>
RM	<i>rough microsomes</i>
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SeMet	Selenomethionin
SNA	<i>Sambucus nigra agglutinin</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>tris buffered solution</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TNE	Tris-NaCl-EDTA-Puffer
TOF	<i>time of flight</i>
TSS	<i>transformation and storage solution</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute
$V_e$	Elutionsvolumen
Vero <sup>No98</sup>	mit dem BDV-Stamm No98 infizierter Vero-Zellen
$V_o$	Ausschlussvolumen
VSV	Vesikular-Stomatitis-Virus
$V_t$	Säulenvolumen
VT	Volumenteile
WT	Wildtyp
X	BDV-Protein X (p10)
Y76T	Glykosylierungsmutante (Tyrosin an AS-Position 76 gegen Threonin ausgetauscht)

## 9 ANHANG

Tab. 6: Kristallisations-Lösungen 1 bis 96

Nr	Konz	Präzipitantz	Konz [M]	Puffer	Konz [M]	Salz	pH
1	30.0 %	MPD	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl <sub>2</sub>	4.6
2	-	-	0.10	MES/NaOH	0.10	K/Na-Tartrat	6.4
3	0.4 M	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	6.4
4	3.0 M	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10	Tris/HCl	-	-	8.3
5	19.0 %	MPD	0.10	HEPES/NaOH	0.19	Na-Citrat	7.5
6	30.0 %	PEG 4000	0.10	Na Acetat	0.20	MgCl <sub>2</sub>	4.5
7	-	-	0.10	HEPES/NaOH	1.20	Na-Citrat	7.9
8	2.0 M	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.20	Na-Citrat	-	-	5.6
9	30.0 %	PEG 400	0.10	Na-Citrat	0.20	NH <sub>4</sub> -Acetat	5.9
10	1.5 M	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.10	Na Acetat	-	-	5.9
11	2.0 M	(K/Na)-Phosphat	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.6
12	20.0 %	PEG 400	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Citrat	8.9
13	25.0 %	PEG 4000	0.10	HEPES/NaOH	0.20	CaCl <sub>2</sub>	7.0
14	30.0 %	PEG 8000	0.10	MES/NaOH	0.20	MgCl <sub>2</sub>	6.1
15	29.0 %	PEG 4000	0.10	Na-Citrat	0.19	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.9
16	1.0 M	Na-Acetat	-	-	0.20	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.2
17	20.0 %	MPD	0.07	Tris/HCl	0.13	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.5
18	2.0 M	(K/Na)-Phosphat	0.10	Tris/HCl	0.20	NH <sub>4</sub> -Acetat	6.6
19	30.0 %	PEG 8000	0.10	Na-Citrat	0.10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.1
20	30.0 %	MPD	0.10	MES/NaOH	-	-	6.2
21	30.0 %	PEG 400	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl <sub>2</sub>	7.1
22	30.0 %	PEG 4000	0.10	Tris/HCl	0.20	Na-Acetat	8.4
23	1.0 M	K/Na-Tartrat	0.10	Tris/HCl	-	-	9.1
24	-	-	0.10	Tris/HCl	0.20	CaCl <sub>2</sub>	8.4
25	20.0 %	MPD	0.07	Na-Citrat	0.33	NH <sub>4</sub> -Acetat	6.4
26	-	-	0.10	MES/NaOH	2.00	Na-Acetat	6.9
27	30.0 %	PEG 8000	0.10	MES/NaOH	0.20	K/Na-Tartrat	6.5
28	-	-	0.10	HEPES/NaOH	1.00	K/Na-Tartrat	7.7
29	30.0 %	PEG 400	0.10	Na Acetat	0.20	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.8
30	20.0 %	PEG 4000	0.10	HEPES/NaOH	0.10	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.3
31	-	-	0.10	MES/NaOH	2.00	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.8
32	30.0 %	Ethanol	0.10	MES/NaOH	0.20	NaCl	6.2
33	30.0 %	Ethanol	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl <sub>2</sub>	7.0
34	30.0 %	Ethanol	0.10	Tris/HCl	0.20	NH <sub>4</sub> -Acetat	8.2
35	30.0 %	Ethanol	0.10	Na Acetat	0.20	CaCl <sub>2</sub>	4.5
36	30.0 %	Ethanol	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Acetat	7.4
37	29.0 %	Isopropanol	0.10	HEPES/NaOH	0.20	MgCl <sub>2</sub>	6.9
38	30.0 %	MPD	0.10	HEPES/NaOH	-	-	7.3
39	2.0 M	Na-Formiat	0.10	Na Acetat	-	-	5.3
40	30.0 %	Isopropanol	0.10	HEPES/NaOH	0.20	Na-Citrat	7.5
41	20.0 %	PEG 4000	0.10	HEPES/NaOH	10.0%	Isopropanol	7.4
42	1.0 M	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.10	HEPES/NaOH	-	-	7.5
43	30.0 %	PEG 4000	0.10	Tris/HCl	0.20	Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.6
44	30.0 %	PEG 6000	0.10	HEPES/NaOH	0.20	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.2
45	1.5 M	Na-Acetat	0.10	Na Acetat	-	-	6.1
46	1.0 M	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	0.10	Na-Citrat	4.9

47	4.0	M	Na-Formiat	-	-	8.4	
48	1.2	M	Na-Citrat	0.10	HEPES/NaOH	7.9	
49	-	-	-	-	0.40 K/Na-Tartrat	8.2	
50	-	-	0.10	Tris/HCl	2.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	8.2	
51	30.0	%	MPD	0.10	Tris/HCl	0.20 MgCl <sub>2</sub>	8.3
52	30.0	%	Isopropanol	0.10	MES	0.20 Na-Citrat	6.3
53	30.0	%	PEG 4000	0.10	Na-Citrat	0.20 NH <sub>4</sub> -Acetat	6.4
54	30.0	%	PEG 4000	0.10	Na Acetat	0.20 NH <sub>4</sub> -Acetat	5.7
55	30.0	%	PEG 400	0.10	Tris/HCl	0.20 Na-Citrat	8.0
56	28.0	%	PEG 400	0.10	HEPES/NaOH	0.20 CaCl <sub>2</sub>	7.2
57	30.0	%	PEG 8000	0.10	MES	0.20 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.3
58	30.0	%	MPD	0.20	Imidazol/HCl	0.20 NH <sub>4</sub> -Acetat	7.1
59	30.0	%	Isopropanol	0.10	Tris/HCl	0.20 (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.3
60	25.0	%	PEG 4000	0.10	Na Acetat	0.20 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.7
61	30.0	%	MPD	0.10	MES	-	6.1
62	30.0	%	Isopropanol	0.10	Na Acetat	0.20 CaCl <sub>2</sub>	4.5
63	-	-	0.10	Imidazol/HCl	0.50 Na-Acetat	7.6	
64	30.0	%	MPD	0.10	Imidazol/HCl	0.20 NH <sub>4</sub> -Acetat	7.2
65	18.0	%	Isopropanol	0.10	HEPES/NaOH	0.20 Na-Citrat	6.6
66	30.0	%	PEG 8000	0.10	MES	0.20 Na-Acetat	5.9
67	-	-	0.10	HEPES/NaOH	0.80 K/Na-Tartrat	7.6	
68	30.0	%	PEG 400	-	-	0.20 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.7
69	30.0	%	PEG 4000	-	-	0.20 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.0
70	-	-	-	-	2.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.8	
71	1.6	M	(K/Na)- Phosphat	0.10	HEPES/NaOH	-	9.0
72	4.0	%	PEG 400	0.10	Tris/HCl	-	4.8
73	2.0	%	PEG 4000	0.10	Na Acetat	-	4.5
74	1.0	%	PEG 4000	0.10	HEPES/NaOH	1.02 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.6
75	20.0	%	PEG 4000	0.10	Na-Citrat	20.0% Isopropanol	8.8
76	25.0	%	PEG 8000	0.10	Tris/HCl	0.20 (NH <sub>4</sub> )H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.4
77	-	-	0.10	MES	1.40 Na-Acetat	6.8	
78	20.0	%	PEG 8000	0.10	MES	0.20 Mg-Acetat	6.4
79	30.0	%	Isopropanol	0.10	Tris/HCl	0.20 NH <sub>4</sub> -Acetat	8.3
80	30.0	%	MPD	0.10	MES	0.20 Mg-Acetat	6.4
81	22.0	%	MPD	0.09	Na-Citrat	0.19 NH <sub>4</sub> -Acetat	6.3
82	30.0	%	PEG 8000	-	-	0.20 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.0
83	8.0	%	PEG 8000	0.10	Tris/HCl	-	8.5
84	8.0	%	PEG 4000	0.10	Na Acetat	-	4.7
85	20.0	%	PEG 8000	-	-	0.05 K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.4
86	30.0	%	PEG 1000	-	-	-	7.2
87	-	-	-	-	0.20	Mg-Formiat	7.3
88	18.0	%	PEG 8000	0.10	MES	0.20 Zn-Acetat	6.3
89	18.0	%	PEG 8000	0.10	MES	0.20 Ca-Acetat	6.5
90	-	-	0.10	Na Acetat	2.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5	
91	2.0	%	PEG 8000	-	-	1.00 Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.7
92	9.0	%	PEG 8000	-	-	0.86 Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	6.7
93	-	-	0.10	HEPES/NaOH	1.50 Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.7	
94	40.0	%	MPD	0.10	HEPES/NaOH	0.10 Na-Citrat	7.0
95	-	-	0.10	HEPES/NaOH	1.35 Na-Citrat	7.8	
96	2.0	%	PEG 400	0.10	HEPES/NaOH	2.00 (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.6

Alle Lösungen enthalten 0,02% NaN<sub>3</sub>.



## **PRÄSENTATION DER ARBEIT AUF KONGRESSSEN UND TAGUNGEN**

Kraus, I., M. Eickmann, H. Scheffczik, E. Bogner, S. Kiermayer, M. Fluess, J.A. Richt und W. Garten.

Vortrag: Das Matrixprotein des Bornavirus.

Jahrestagung Gesellschaft für Virologie 2001, Technische Universität Dresden

Kraus, I., M. Eickmann, H. Scheffczik, E. Bogner, S. Kiermayer, M. Fluess, J.A. Richt und W. Garten.

Vortrag: Matrix protein of Borna Disease Virus.

Third International Virus Assembly Symposium 2001, Seon, Deutschland

## VERÖFFENTLICHUNGEN

**Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit wurden folgende Publikationen erstellt:**

Kraus, I., M. Eickmann, S. Kiermayer, H. Scheffczik, M. Fluess, J.A. Richt und W. Garten.

Open reading frame III of Borna Disease Virus encodes a nonglycosylated matrix protein.

*J Virol.* 2001. **75**:12098-12104.

Kraus, I., H. Scheffczik, E. Bogner, M. Eickmann, S. Kiermayer, M.T. Stubbs und W. Garten.

Single particle analysis and crystallisation of the matrix protein of Borna Disease Virus.

*FEBS Lett.*, eingereicht

**Weitere Publikationen während der Dissertation:**

Scheffczik, H., I. Kraus, S. Kiermayer, E. Bogner, A. Holzenburg, W. Garten und M. Eickmann.

Multimerization potential of the cytoplasmic domain of the human cytomegalovirus glycoprotein B.

*FEBS Lett.* 2001. **506**:113-116.

---

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name	Ina Kraus
Geburtsdatum	30.07.1974
Geburtsort	Lich

### Schul Ausbildung

1981-1985	Goetheschule Gießen
1985-1986	Gesamtschule Gießen-Ost
1986-1991	Lahntalschule Atzbach
1991-1994	Liebigschule Gießen
1994	Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6)

### Hochschulausbildung

1994-1996	Grundstudium des Studienganges Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg
1996	Diplom-Vorprüfung (Note: gut)
1996-1998	Hauptstudium des Studienganges Humanbiologie an der Philipps-Universität Marburg Hauptfach: Biochemie Nebenfächer: Immunologie und Humangenetik
1998	Diplom-Prüfung (Note: sehr gut)
1998-1999	Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie, Philipps-Universität Marburg, Thema: „Biosynthese von fukosylierten Polylaktosaminen an glykosyliertem Lysozym“ (Note: sehr gut)
1999-2002	Doktorarbeit am Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg, Thema: „Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit“

## **VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen/Herren in Marburg:

Aurich, Dressler, Elsässer, Feuser, Fruhstorfer, Garten, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hasilik, Jungclas, Kern, Kirchner, Klenk, Kober, Koch, Koolman, Löffler, Perst, Röhm, Schäfer, Schulz, Schwee, Seitz, J., Seitz, K.A., Steinmetz, Voigt, von Löw, Weiser

**DANKSAGUNG**

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

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

Herrn Dr. Markus Eickmann danke ich für seine fachlich kompetente und kreative Betreuung.

Bei Martina Weik, Simone Kiermayer, Hanno Scheffczik, Carsten Schöneberg und Amir Reza Vahhabzadeh möchte ich mich für das nette und kooperative 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.

Frau Dr. E. Bogner danke ich für die Hilfen bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen.

Herrn Dr. M.T. Stubbs danke ich für die Unterstützung bei der Kristallisation und Strukturanalyse.

Herrn J. Kahnt danke ich für seine Mühe bei den MALDI-TOF-Messungen.

Mein persönlicher Dank gilt meinen Eltern, die mich bisher in jeglicher Hinsicht liebevoll unterstützt und gefördert haben.

Und ein ganz besonderes Dankeschön an Alexander Stojanowic.

**EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Das Matrixprotein des Virus der Bornaschen Krankheit“ im Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie unter Leitung von Prof. Dr. H.-D. Klenk 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 vorgelegt.

Marburg, den 06.02.2002

(Ina Kraus)