

Isolierung und Charakterisierung von  
zellulären Interaktionspartnern des  
Matrixproteins M1 des Grippevirus  
Influenza A

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Jens Reinhardt**

aus

**Braunschweig**

**August 2001**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1</b>	<b>Klassifizierung von Influenza A, B und C-Viren .....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Epidemiologische Bedeutung des Influenza A Virus: Reservoirs und „mixing vessels“ .....	8
<b>1.2</b>	<b>Aufbau des Influenza A Virus.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Elektronenmikroskopie und molekularer Aufbau .....	10
1.2.1.1	Hämagglutinin .....	11
1.2.1.2	Neuraminidase .....	12
1.2.1.3	M2-Protein.....	12
1.2.1.4	Virale Ribonukleoproteine (vRNPs).....	13
1.2.1.5	NS1-Protein .....	13
1.2.1.6	NS2-Protein/NEP .....	13
1.2.2	Das M1-Protein.....	14
<b>1.3</b>	<b>Infektionszyklus .....</b>	<b>17</b>
1.3.1	Eindringen in die Wirtszelle .....	17
1.3.2	Transkription und Replikation.....	18
1.3.3	Kernexport und Virusassemblierung .....	20
<b>1.4</b>	<b>Fragestellung der Arbeit .....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Chemikalien: .....	23
2.1.2	Enzyme:.....	25
2.1.2.1	DNS-modifizierende Enzyme.....	25
2.1.2.2	Proteinkinasen.....	25
2.1.3	Radiochemikalien .....	25
2.1.4	Sonstiges.....	25
<b>2.2</b>	<b>Medien und Puffer .....</b>	<b>26</b>
2.2.1	Bakterien-Medien .....	26
2.2.2	Hefe-Medien und -Puffer .....	27
2.2.3	Medien für die Zellkultur .....	28
<b>2.3</b>	<b>Stammlösungen.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4</b>	<b>Plasmide .....</b>	<b>30</b>
<b>2.5</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>31</b>
<b>2.6</b>	<b>Antikörper.....</b>	<b>33</b>
2.6.1	Primärantikörper .....	33
2.6.2	Sekundärantikörper .....	33
<b>2.7</b>	<b>Bakterien - und Hefestämme .....</b>	<b>33</b>
2.7.1	<i>Escherichia coli</i> .....	33
2.7.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
<b>2.8</b>	<b>Eukaryontische Zelllinien .....</b>	<b>33</b>
<b>2.9</b>	<b>Virus-Stämme .....</b>	<b>33</b>
<b>3</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische und biochemische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.1.1	Amplifikation spezifischer DNS-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	35
3.1.2	RT-PCR.....	35
3.1.3	Längenauffrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel .....	36
3.1.4	Extraktion spezifischer DNS-Fragmente aus Agarosegelen.....	36
3.1.5	Spaltung von DNS-Molekülen an definierten Sequenzen mittels Restriktionsendonukleasen .....	36
3.1.6	Dephosphorylierung von DNS an 5' – Enden .....	36
3.1.7	Phenolische Extraktion von DNS-Molekülen.....	37
3.1.8	Verknüpfung von DNS-Fragmenten an definierten Enden (Ligation).....	37
3.1.9	Spektralphotometrische Analyse von Nukleinsäuren.....	37

3.1.10	Sequenzierung von Plasmid-DNS .....	37
3.1.11	In vitro Translation und Transkription von Genen .....	38
3.1.12	Gelelektrophoretische Größen-Auftrennung von Proteinen .....	38
3.1.13	Proteinfärbung im Polyacrylamidgel.....	40
3.1.14	Immundetektion von Proteinen (Western Blot).....	40
3.1.15	RNS-Isolierung aus HeLa-Zellen.....	41
3.1.16	RNS-Gelelektrophorese.....	41
3.1.17	Northern Blot.....	41
<b>3.2</b>	<b>Manipulation von <i>Escherichia coli</i>.....</b>	<b>42</b>
3.2.1	Erzeugung elektrokompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien.....	42
3.2.2	Elektroporation von elektrokompetenten <i>E.coli</i> -Bakterien.....	43
3.2.3	DNS-Transfer in chemisch-kompetente <i>E. coli</i> -Bakterien .....	43
3.2.4	Präparation von DNS.....	44
3.2.5	Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen .....	44
3.2.6	Koprazipitationsexperimente .....	44
<b>3.3</b>	<b>Manipulation von Hefezellen.....</b>	<b>45</b>
3.3.1	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : .....	45
3.3.1.1	Hocheffizienz-Primär-Transformation für Two Hybrid-Screens .....	45
3.3.1.2	Transformation von tiefgefrorenen Hefestämmen .....	46
3.3.2	Parallelanzucht von Hefekolonien auf Kulturplatten mit unterschiedlichen Medien (Replika-Plattieren).....	47
3.3.3	Isolierung von Genbank-Plasmid-DNS aus Hefe.....	47
<b>3.4</b>	<b>Virologische Arbeitsmethoden.....</b>	<b>48</b>
3.4.1	Infektion von Kulturzellen mit Influenza A Virus .....	48
3.4.2	Virusanzucht im embryonierten Hühnerei.....	48
3.4.3	Der Hämagglutinationstest (HA-Test) .....	49
3.4.4	Der Plaque-Test .....	50
3.4.5	Aufreinigung von Viren durch Dichtegradienten-Zentrifugation .....	51
3.4.6	Isolierung des M1-Proteins aus aufgereinigten Influenza A Viren .....	52
<b>3.5</b>	<b>Zellkulturtechniken.....</b>	<b>52</b>
3.5.1	Passagieren von Zellen.....	52
3.5.2	Anlegen von Zellstocks.....	53
3.5.3	Transfektion von Zellen .....	53
3.5.4	Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mittels Mikroskopie .....	54
3.5.5	Metabolische Markierung von viralen bzw. zellulären Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]-Promix.....	55
3.5.6	Aufschluss von eukaryontischen Kulturzellen .....	55
3.5.6.1	Durch Detergenzien und Ultraschall.....	55
3.5.6.2	Homogenisierung im hypotonischen Puffer .....	55
3.5.7	Flotationsanalyse im nicht-linearen Saccharosegradienten .....	56
3.5.8	Immunpräzipitation .....	56
3.5.9	Proteinphosphorylierungs-Experimente.....	57
3.5.9.1	Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch gereinigte Kinasen .....	57
3.5.9.2	Phosphorylierung von viralem M1-Protein durch gereinigte Kinasen .....	58
3.5.9.3	Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch MDCKII-Zelllysat .....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern des M1-Proteins von Influenza A Virus .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2</b>	<b>Der Hefe Two Hybrid Screen als Methode zur Identifizierung Protein-Protein-Interaktionspartnern.....</b>	<b>59</b>
4.2.1	Vorbereitungen .....	62
4.2.1.1	Konstruktion eines LexA-M1-Expressionsplasmides.....	62
4.2.1.2	Test des „LexA-M1-Expressionsplasmides auf Funktionalität.....	62
4.2.2	Erzeugung eines Selektionsstammes.....	64
4.2.3	Two Hybrid-Screen: Selektion der Hefestämme, die spezifische Interaktionspartner des M1 Proteins exprimieren .....	65
4.2.3.1	Selektion I: Komplementation der Leucin-Auxotrophie .....	65
4.2.3.2	Selektion II: Nachweis der Galaktose-abhängigen Aktivierung der beiden Reportergene .....	66

4.2.3.3	Selektion III: Rekonstruktion des Phänotyps durch Rücktransformation der Genbibliotheks-Plasmide in den Hefe-Selektionsstamm .....	67
4.2.3.4	Analyse der isolierten Klone durch Sequenzierung der entsprechenden cDNS.....	68
<b>4.3</b>	<b>Biochemische Bestätigung der genetisch gefundenen Interaktion.....</b>	<b>72</b>
4.3.1.1	Konstruktion der GST-Expressionsvektoren .....	72
4.3.1.2	In vitro-Kopräzipitationsansätze.....	75
4.3.1.2.1	Interaktion der Klone des ersten Two Hybrid Screens mit viralen Proteinen im Kopräzipitationsassay.....	76
4.3.1.2.2	Interaktion der Klone des zweiten Two Hybrid Screens mit viralen Proteinen im Kopräzipitationsassay.....	77
4.3.2	Das RACK1-Protein: Struktur und Funktionen.....	80
4.3.2.1	Kopräzipitation von RACK1 und dem M1-Protein von Viren mit aviärer, porciner und humanpathogener Spezifität.....	81
<b>4.4</b>	<b>Zur Funktion von RACK1 in der Zelle .....</b>	<b>83</b>
4.4.1	Untersuchung der gewebespezifischen Expression von RACK1 in humanen Geweben.....	83
<b>4.5</b>	<b>Modelle zur Funktion der RACK1-M1-Interaktion .....</b>	<b>86</b>
4.5.1	Untersuchungen zur M1-RACK1 Interaktion: Spielt RACK1 eine Rolle beim viralen Assemblierungsprozess ?.....	87
4.5.1.1	RACK1 lässt sich nicht in aufgereinigten Virionen nachweisen .....	87
4.5.1.2	RACK1 und M1 zeigen keine Komigration in der Membran-Fraktion Influenza A Virus-infizierter MDCK-Zellen.....	89
4.5.1.3	In der Immunfluoreszenz zeigt sich eine zytoplasmatische Kollokalisierung von RACK1 und dem M1-Protein .....	90
<b>4.6</b>	<b>Phosphorylierung des viralen M1-Proteins durch zelluläre Kinasen.....</b>	<b>91</b>
4.6.1	Das M1-Protein wird durch aufgereinigte PKC, nicht aber durch CKII phosphoryliert .....	92
4.6.2	Phosphorylierung von rekombinantem M1-Protein durch zelluläre Extrakte .....	94
4.6.3	Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch PKC-Isoformen .....	95
<b>4.7</b>	<b>Modifikation der RACK1-Funktion durch die Interaktion mit dem viralen M1-Protein .</b>	<b>97</b>
4.7.1	Untersuchungen zur M1-RACK1-Interaktion: Kartierung der Bereiche, die Protein-Protein-Interaktion vermitteln.....	97
4.7.1.1	Identifizierung von M1-Bereichen, die RACK1-Bindung vermitteln .....	97
4.7.2	Klonierung der vollständigen RACK1 wt-cDNS aus mRNA von HeLa-Zellen.....	101
4.7.3	Bindung des M1-Proteins an das vollständige RACK1 .....	103
4.7.4	Untersuchung zur Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein: Einfluss der Überexpression von RACK1 in der infizierten Zelle.....	104
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>108</b>
<b>5.1</b>	<b>Isolierung von zellulären Interaktionspartner des viralen M1-Proteins durch das HefeTwo Hybrid-System.....</b>	<b>108</b>
<b>5.2</b>	<b>Sequenzanalyse der gefundenen Interaktionspartner des M1-Proteins.....</b>	<b>109</b>
<b>5.3</b>	<b>Biochemische Überprüfung der im Two Hybrid-Screen isolierten M1-Protein-Interaktionspartner.....</b>	<b>110</b>
<b>5.4</b>	<b>Die Fähigkeit, mit RACK1 zu interagieren, ist bei M1-Proteinen von Influenza A Virusstämmen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität konserviert .....</b>	<b>111</b>
<b>5.5</b>	<b>Die Interaktion zwischen dem M1-Protein und RACK1 spielt vermutlich keine Rolle bei der viralen Knospung an der Zellmembran .....</b>	<b>112</b>
<b>5.6</b>	<b>Das M1-Protein wird durch die Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert .....</b>	<b>113</b>
<b>5.7</b>	<b>RACK1 bindet an mindestens zwei Bereiche des M1-Proteins.....</b>	<b>115</b>
<b>5.8</b>	<b>Das vollständige RACK1-Protein zeigt geringere Affinität zum M1-Protein des Influenza A Virus als die im Two Hybrid-Screen isolierten Fragmente.....</b>	<b>117</b>

<b>5.9</b>	<b>Überexpression des RACK1 führt zu einer Reduzierung der M1-Protein-Expression in Influenza A Virus-infizierten Zellen.....</b>	<b>117</b>
<b>5.10</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>6</b>	<b><i>Erklärung</i>.....</b>	<b>121</b>
<b>7</b>	<b><i>Danksagung</i>.....</b>	<b>122</b>
<b>8</b>	<b><i>Literaturverzeichnis</i> .....</b>	<b>123</b>

## 1 Einleitung

Die außerordentlich geringe Größe von Viren wird unter anderem dadurch ermöglicht, dass sie die Stoffwechselleistungen der Wirtszelle für ihre Vermehrung nutzen. Um dieses zu erreichen, müssen eine Vielzahl von viralen und zellulären Komponenten miteinander interagieren. Dies trifft für die Bindung an den Rezeptor ebenso zu wie für die Vorgänge der Virusaufnahme, der Translation der viralen mRNA und die Assemblierung der Viruspartikel. Darüber hinaus sind für eine erfolgreiche Replikation auch Interaktionen notwendig, die regulativ in das Zellgeschehen eingreifen, z.B. zur Überwindung von zellulären Abwehrmechanismen (Zusammenfassungen dazu finden sich in (Knipe, 1996; Ludwig et al., 1999)).

Die Interaktionen zwischen viralen und zellulären Komponenten sind aus verschiedenen Gründen außerordentlich interessant. Beispielsweise lassen sich die Funktionen von zellulären Komponenten modellhaft mit viralen Proteinen untersuchen, die mit ihnen interagieren. So kann der Transport von Nukleinsäuren und Proteinen durch die Kernpore mit Hilfe von viralen Protein studiert werden (z.B. (Malim et al., 1989)). Proteinprozessierung im ER und im Golgi-Apparat wird u.a. am Hämagglutinin (HA) des Influenza A Virus untersucht (Klenk & Garten, 1994; Molinari & Helenius, 2000).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion von zellulären Komponenten mit dem M1-Protein des Influenza A Virus untersucht. Das Influenza-Virus ist der Erreger der klassischen Grippe (Influenza). Obwohl die Prognose bei unkompliziertem Verlauf günstig ist, kann eine Influenza-Virusinfektion zum Tode führen. In Deutschland wird die Zahl der auf Influenza zurückzuführenden Todesopfer auf bis zu 15.000 pro Jahr geschätzt. Neben dem saisonalen epidemischen Auftreten kann es auch zur Entwicklung von Influenza-Pandemien kommen. Im letzten Jahrhundert gab es drei derartige Ausbrüche in den Jahren 1918/1919, 1957 und 1968. Die Pandemien sind verbunden mit dem Auftreten eines bis dahin neuen Influenza A Virus Subtyps, gegen den in großen Teilen der Bevölkerung keine Immunität besteht. Dadurch kommt es zu einer weltweiten Verbreitung des Erregers, die unter Umständen dramatische Ausmaße haben kann. So erkrankten an der „spanische Grippe“ von 1918/1919 weltweit ca. 300 Millionen, von denen mehr als 20 Millionen starben. Auch wenn bis heute unklar ist, warum dieser Virussubtyp diese immense Mortalität verursachte, so besteht kein Zweifel daran, dass sich ein ähnliches Szenario heute wiederholen könnte. Besonders durch

die Intensivierung des weltweiten Reiseverkehrs könnte ein solches Virus mit hoher Kontagiösität innerhalb weniger Tage über den gesamten Erdball verbreitet werden.

## 1.1 Klassifizierung von Influenza A, B und C-Viren

Influenzaviren lassen sich aufgrund unterschiedlicher molekularer Eigenschaften und serologischer Charakteristika ihrer M1- und NP-Proteine in die Typen A, B und C unterteilen. Influenza A und B Viren besitzen acht Gensegmente und werden in einem Genus zusammengefasst. Die Influenza C Viren haben nur sieben Gensegmente. Dies erklärt sich aus der Tatsache, dass bei Influenza C Viren die Funktionen des Rezeptorproteins und die Rezeptor-zerstörende Aktivität durch ein Protein, das Hämagglutinin-Esterase-Fusionsprotein vermittelt wird. Bei Influenza A und B Viren werden beide Funktionen auf zwei Proteine verteilt, die auf unabhängigen Gensegmenten kodiert sind: das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA).

Influenza A Viren lassen sich über diese Oberflächenproteine HA und NA in Subtypen unterteilen, da gegen diese beiden Proteine Antikörper gebildet werden. Antikörper gegen das Oberflächenprotein des einen Subtyps erkennen das eines anderen nicht. Zur Zeit sind 15 serologisch unterscheidbare HA-Typen und neun NA-Typen bekannt. Zur exakten Typisierung eines Influenza A Virus-Isolats wird eine Nomenklatur verwendet, die neben den HA- und NA-Subtypen noch weitere Informationen enthält (Murphy & Webster, 1996). Die Bezeichnung enthält die Spezies, aus der das Virus isoliert wurde, gefolgt vom Ort der ersten Isolierung, der Nummerierung des Isolats und dem Jahr der Isolierung. Anschließend folgt noch der Subtyp in Klammern. Dementsprechend wird ein Influenza A Virus, das 1970 in Iowa als erstes aus einem Schwein isoliert wurde, als A/Swine/Iowa/1/70 (H1N1) bezeichnet. Bei humanen Isolaten wird die Speziesbezeichnung weggelassen.

Influenza B Viren können bei Menschen ebenfalls Grippe-symptome verursachen (Murphy & Webster, 1996). Allerdings treten ernsthafte Fälle mit der Notwendigkeit von Krankenhausbehandlungen bei Influenza A Virus-Infektionen viermal so häufig auf wie bei Influenza B Virus-Infektionen. Diese sind ebenfalls epidemisch. Dementsprechend wird die Grippe-schutzimpfung mit einer trivalenten Vakzine durchgeführt, die neben den beiden aktuell kursierenden Influenza A Virus-Stämmen mit den Subtypen H1N1 und H3N2 auch einen Influenza B Virus-Stamm enthält.

Influenza C Viren verursachen dagegen nur sporadisch auftretende Erkrankungen der oberen Atemwege, die nur selten einen schweren Verlauf haben.

### 1.1.1 Epidemiologische Bedeutung des Influenza A Virus: Reservoirs und „mixing vessels“

Influenza A Viren befallen neben Menschen auch Schweine, Pferde und eine große Anzahl von Vogelarten (Murphy & Webster, 1996). Im Gegensatz dazu werden Influenza B Viren als spezifisch humanpathogen eingeschätzt. Influenza C Viren befallen Menschen und Schweine.

Obwohl Influenza A Viren eine Vielzahl von Tierarten befallen, so haben sich doch im Verlauf der Evolution Wirts-spezifische Linien herausgebildet. Eine Virusübertragung von ist nicht zwischen allen Spezies möglich. Auch wenn noch nicht alle Faktoren verstanden sind, die den Wirtstropismus determinieren, kann als gesichert gelten, dass die Rezeptorerkennung durch das HA dabei eine entscheidende Rolle spielt. So werden beim Menschen hauptsächlich Influenza A Viren der HA-Subtypen H1, H2 und H3 gefunden, während sich bei Vögeln Viren mit allen 15 bekannten Subtypen finden lassen.

Wasservögel stellen das natürliche Reservoir von Influenza A Viren dar. Die Virusvermehrung läuft bei ihnen meist asymptomatisch im Darmepithel ab. Bei der Übertragung dieser Viren auf domestiziertes Geflügel kann es zur Ausbildung von Influenza A Virus-Erkrankungen mit erheblichem wirtschaftlichen Schaden kommen. So führt bei Truthähnen die Infektion mit Influenza A Viren aller Subtypen zur Ausbildung von chronischen Atemwegserkrankungen. Viren der HA-Subtypen H5 und H7 können bei Hühnern zu einer schweren, systemischen Infektion mit Affektierung des Zentralnervensystems führen. Diese klassische Geflügelpest führt innerhalb weniger Tage zum Tod der infizierten Tiere (Murphy & Webster, 1996).

Eine direkte Infektion von Menschen mit Influenza A Viren aus Vögeln ist das erste Mal 1997 dokumentiert worden. Dieser Ausbruch erreichte bei 18 Fällen eine Mortalitätsrate von 30 % (Claas et al., 1998; Shortridge et al., 1998). Da das Virus jedoch nicht ausreichend auf den neuen Wirt adaptieren konnte, kam es nicht zu weiteren Übertragungen von Mensch zu Mensch. Für die Entstehung von neuen Virusstämmen, die zu Pandemien führen können, wird die Reassortantenbildung verantwortlich gemacht. Dieser Mechanismus beruht auf dem segmentierten Genom der Influenzaviren. Wird eine Zelle parallel mit zwei Viren unterschiedlichen Subtyps infiziert, so kommt es zu einer Vermischung der replizierten



Gensegmente beider Viren (Lamb & Krug, 1996; Rott et al., 1976). Dadurch könnten bis zu  $2^8$  ( $- 2$  Elternviren) = 254 unterschiedliche neue Virustypen oder Reassortanten entstehen. Eine derartige Durchmischung der viralen Gensegmente kann jedoch nur in Zellen stattfinden, die von unterschiedlichen Viren gleichermaßen infiziert werden können. Für diese Funktion als virales „Mischgefäß“ (mixing vessel) werden Schweine postuliert, die sowohl durch aviäre als auch durch humanpathogene Viren infizierbar sind (zusammengefasst in (Scholtissek & Naylor, 1988; Shortridge, 1992; Webster et al., 1995)).

## 1.2 Aufbau des Influenza A Virus

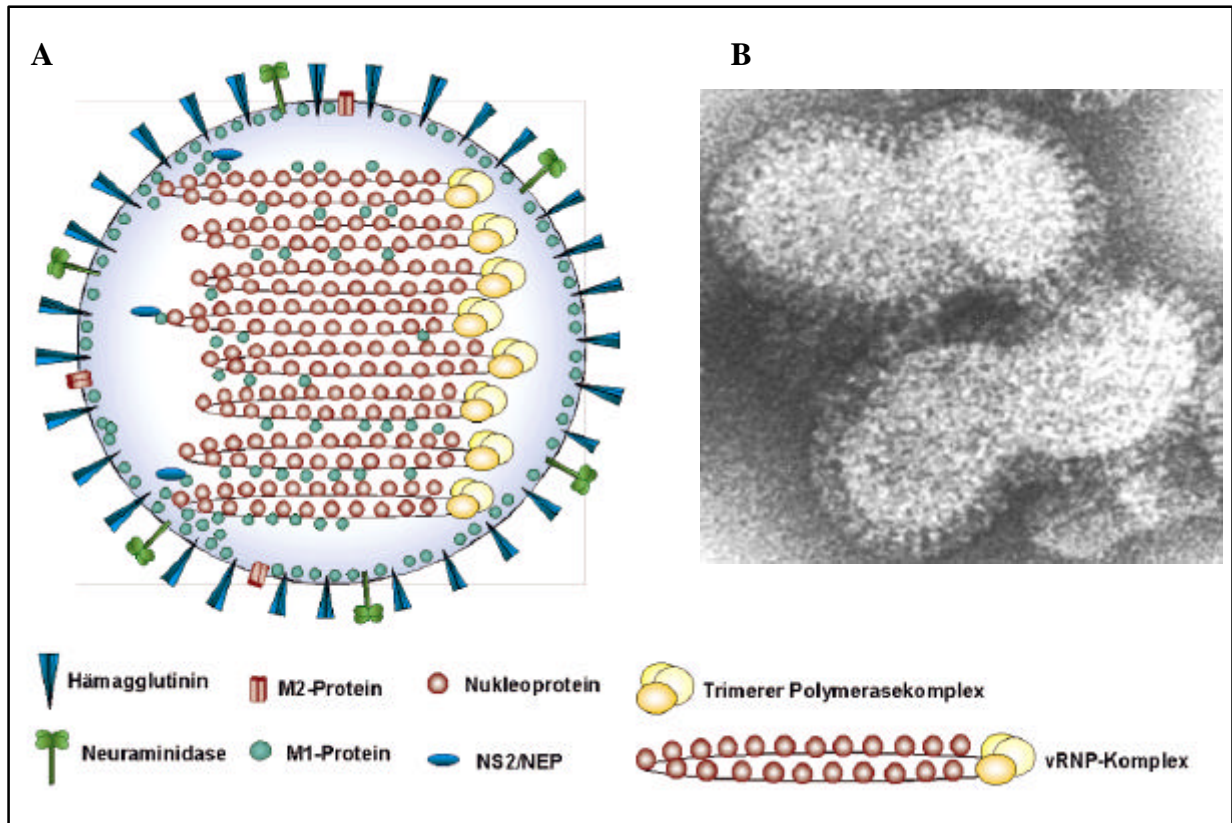
Influenza Viren verfügen über ein segmentiertes, einzelsträngiges RNS-Genom (Pons, 1971; Scholtissek, 1978; Rees & Dimmock, 1981). Die RNS hat eine negative Orientierung. Sie kann daher nicht direkt zur Translation von Proteinen dienen, sondern muss vorher von einer RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RDRP) transkribiert werden. Da Wirtszellen nicht über RDRP verfügen, muss diese vom Virus mit der RNS in die Zelle gebracht werden. Sie ist an die RNS gebunden, die darüber hinaus noch vom Nukleoprotein (NP) in virale Ribonukleoprotein- (vRNP-) Komplexe verpackt ist (Inglis et al., 1976; Lamb & Choppin, 1976). Die acht RNS-Stränge des Influenza A Virus-Genoms kodieren für insgesamt zehn Proteine. Dabei kodieren die Segmente sieben und acht für jeweils zwei Proteine, die durch Spleißen von je einer gemeinsamen mRNS translatiert werden. Die vRNS-Segmente und die von ihnen kodierten Proteinen sind in der folgenden Tabelle mit Hinweisen zu deren Funktion wiedergegeben.

RNS-Segment	kodiertes Protein	Funktion
1	PB2	Transkription und Replikation viraler RNS
2	PB1	
3	PA	
4	HA	Rezeptorbindung und Membranfusion
5	NP	Komplexierung der vRNS und cRNS
6	NA	Rezeptor-zerstörendes Enzym
7	M1-Protein	Membranbindung, vRNP-Bindung, nukleärer Export, Regulation der viralen Transkription/Replikation
	M2-Protein	
8	NS1	posttranslationale Regulation der Genexpression; Antagonist der zellulären Interferon-Antwort
	NS2	

**Tabelle 1: vRNS-Segmente des Influenza A Virus.** Angegeben sind die von den Segmenten kodierten Proteine und ihre Funktionen.

### 1.2.1 Elektronenmikroskopie und molekularer Aufbau

Influenza-Virionen sind pleomorph. Aus Zellkulturen und nach mehrfacher Passagierung in Bruteiern lassen sich sphärische Partikel von 80 – 120 nm Durchmesser isolieren (Choppin & Compans, 1975).



**Abbildung 1: Morphologie der Influenzaviren** A) Schematische Darstellung der viralen Proteine im Virion. Das hier nicht dargestellte NS1 ist als einziges Nicht-Strukturprotein nicht im Viruspartikel nachzuweisen. B) Die elektronenmikroskopische Aufnahme von Influenza B Viren zeigt die virale Membran mit den eingelagerten Glykoproteinen, (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Dr. Gelderblom, RKI Berlin). Influenza A und B Viren sind im EM nicht zu unterscheiden.

Im Gegensatz dazu sind Virus-Partikel, die aus Patienten isoliert sind, in ihrem Erscheinungsbild heterogener. Hier finden sich neben sphärischen auch filamentöse Formen (Chu et al., 1949). Influenzaviren sind von einer Membran umhüllt, die von der Wirtszellmembran abgeleitet ist. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen lässt sich diese Membran deutlich erkennen. In dieser Membran sind drei virale Transmembranproteine eingelagert. Zwei davon, die Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) lassen sich als sogenannte Spikes erkennen (Laver & Valentine, 1969). Das M2-Protein ragt nicht weit genug aus der Membran hervor, um so nachgewiesen werden zu können.

### 1.2.1.1 Hämagglutinin

Das Hämagglutinin (HA) liegt als homotrimerer Komplex auf der Virusoberfläche vor (Wiley et al., 1977). Es ist nach der Fähigkeit der Viren benannt worden, Erythrozyten zu agglutinieren (Hirst, 1941; McClelland & Hare, 1941). Das HA bindet an Sialinsäuren auf der Oberfläche der Wirtszelle und vermittelt so die Virusaufnahme. Außerdem vermittelt es nach einer pH-Wert-abhängigen Konformationsänderung die Fusion der Membranen des endozytierten Virions mit der des Endosoms (zusammengefasst in (Skehel & Wiley, 2000)).

Nach der Transkription der mRNS für das HA-Monomer wird das HA-Polypeptid in das ER geschleust. Das HA verfügt über ein N-terminales Signalpeptid, das beim Transport der entstehenden Polypeptidkette von einer zellulären Signalpeptidase abgespalten wird. Dementsprechend ist das HA als Klasse I Transmembranprotein aufzufassen. Während des Transportes durch den Golgi-Apparat findet die Homotrimerisierung des HA statt. Außerdem wird hier die Ektodomäne des HA an bis zu sieben Stellen glykosyliert. Einige der Glykosylierungen beeinflussen die Rezeptor-Affinität des HA und die virale Vermehrung (Ohuchi et al., 1997; Wagner et al., 2000). Darüber hinaus wird das HA an drei Stellen der Transmembranregion palmitoyliert (Schmidt, 1982). HA wird proteolytisch in die Fragmente HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Klenk & Garten, 1994). Durch diese proteolytische Spaltung wird die pH-abhängige Konformationsänderung ermöglicht, die für die Membranfusion und somit für die Infektiosität der Viren essentiell ist. Damit ist die Expression einer geeigneten Protease ein determinierender Faktor des Gewebstropismus von Influenza Viren. Dies wird dadurch belegt, dass das HA der Geflügelpest-Viren, die eine systemische Infektion verursachen, über eine multibasische Spaltstelle mit der Konsensussequenz R-X-K/R-R verfügt, die von der ubiquitär exprimierten Proteinkonvertase Furin erkannt wird (Stieneke-Grober et al., 1992). Die HA-Moleküle von Viren, die sich nicht systemisch in Geflügel ausbreiten, haben hingegen monobasische Spaltstellen mit nur einem Arginin-Rest. Diese werden nur von extrazellulären Proteasen erkannt, die von Epithelzellen sezerniert werden (zusammengefasst in (Klenk & Garten, 1994)).

Das HA ist eines der Hauptziele bei der Bildung von neutralisierenden Antikörpern. Dabei werden hauptsächlich Strukturen des globulären Kopfes erkannt, besonders im Bereich um die Rezeptorbindestelle. Die Bindestelle selbst kann von Antikörpern nicht gebunden werden, da sie in einer Tasche der Oberflächenstruktur verborgen ist. Durch den evolutionären Druck,

den die Antikörper auf das HA ausüben, haben sich 15 Subtypen entwickelt, die sich durch Kreuzreaktion mit den jeweiligen Antikörpern identifizieren lassen.

#### 1.2.1.2 Neuraminidase

Die Neuraminidase (NA) ist das zweite Subtyp-spezifisierende Oberflächenprotein der Influenza A Viren. Es löst die terminalen Neuraminsäuren von glykosylierten Proteinen (oder Lipiden) an der Zelloberfläche ab und zerstört so die Influenza A Virus-Rezeptoren. Dadurch wird eine erneute Adsorption neugebildeter Virionen an die infizierte Zelle bzw. untereinander verhindert. Weiterhin wird eine Rolle der NA-Enzymaktivität beim Durchdringen von Schleimschichten diskutiert (Lamb & Krug, 1996).

Das vom NA-Gen kodierte Polypeptid ist ein Klasse II-Membranprotein, d.h. es wird mit der N-terminalen Signal- und Verankerungsdomäne in der Membran des ER inseriert. Beim Transport durch den Golgi-Apparat findet die Oligomerisierung des NA zu Homotetrameren statt. Außerdem hat es fünf potentielle Glykosylierungsstellen (Varghese et al., 1983).

#### 1.2.1.3 M2-Protein

Das M2-Protein bildet einen Transmembran-Ionenkanal (Sugrue & Hay, 1991), durch den Protonen aus dem angesäuerten Endosom in das Innere des Virus gelangen. Die daraus resultierende pH-Wertserniedrigung im Virion führt zu einer Konformationsänderung des Matrixproteins, wodurch eine Freisetzung der viralen Nukleokapside (vRNPs) ermöglicht wird (Bui et al., 1996). Das M2-Protein stellt ein Klasse III-Transmembranprotein dar, da sein C-Terminus wie bei Typ I-Membranproteinen im Zytoplasma lokalisiert ist, im Gegensatz zu diesen aber ein abspaltbares Signalpeptid fehlt (Hull et al., 1988). Das M2-Protein bildet ein Homotetramer aus, bei dem die einzelnen Monomere über Disulfidbrücken kovalent verbunden sind (Holsinger & Lamb, 1991). Es wird post-translational durch Phosphorylierung am Serin 64 modifiziert (Holsinger et al., 1995). Allerdings konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierung nicht essentiell für die Virusvermehrung ist (Thomas et al., 1998). Außerdem wird das Cystein 50 palmyliert (Holsinger et al., 1995; Sugrue et al., 1990; Veit et al., 1991).

Das Medikament Amantadin (1-Aminoadamantan-Hydrochlorid) und sein Derivat Rimantadin binden die Transmembran-Domäne des M2-Proteins und inhibieren so die Virusvermehrung, indem sie den Ionenkanal blockieren (Kato & Eggers, 1969; Skehel & Hay,

1978). Mutationen im Bereich der Transmembrandomäne des M2-Proteins vermitteln Resistenz gegen Amantadin bzw. Rimantadin (Belshe et al., 1988).

#### 1.2.1.4 Virale Ribonukleoproteine (vRNPs)

Im Inneren des Virions sind die acht vRNS-Stränge mit der RNS-abhängigen RNS-Polymerase (RDRP) und dem Nukleoprotein (NP) zu Nukleokapsiden (vRNPs) komplexiert (Inglis et al., 1976; Lamb & Choppin, 1976). Die Polymerase dient sowohl der viralen Transkription als auch der Replikation. Sie ist ein Homotrimer aus zwei basischen (PB1 und PB2) und einer sauren Untereinheit (PA) (Horisberger, 1980). Dieser heterotrimere Komplex bindet an die RNS im Bereich des 3'- und 5'- Endes (Murti et al., 1988). Die Enden sind zueinander komplementär und können daher einen RNS-Doppelstrang ausbilden, der durch die Bindung der Polymerase stabilisiert wird. Die Funktionsweise der Polymerase in Transkription und Replikation wird im Kapitel 1.3.2 näher verläutert.

Das NP komplexiert die virale RNS. Es bindet an einzelsträngige RNS, wobei es mit ca. 20 Nukleotiden interagiert (Choppin & Compans, 1975). Interessanterweise komplexiert das NP zwar negativ-strängige vRNS und positiv-strängige cRNS, die bei der Replikation als Zwischenprodukt entsteht, nicht aber die ebenfalls positiv-strängige virale mRNS (Hay et al., 1977; Pons, 1971). Das NP wird phosphoryliert (Petri & Dimmock, 1981; Privalsky & Penhoet, 1977; Privalsky & Penhoet, 1981). Die Funktion dieser posttranslationalen Modifikation ist bisher noch nicht bekannt.

#### 1.2.1.5 NS1-Protein

Das auf dem vRNS-Segment 8 kodierte NS1-Protein kann als einziges virales Protein nicht in Virionen nachgewiesen werden. Das NS1 übernimmt im Infektionsverlauf eine Reihe unterschiedlicher regulatorischer Funktionen. Es inhibiert z.B. das Spleißen von zellulärer mRNS, vermutlich über eine Interaktion mit dem zellulären NS1-bindenden Protein (NS1-BP) (Wolff et al., 1998). Weiterhin reguliert es den Export von mRNS aus dem Zellkern (Fortes et al., 1994). Außerdem inhibiert es die antivirale Interferon-Antwort, indem es die Aktivierung der Proteinkinase R (PKR) verhindert (Lu et al., 1995).

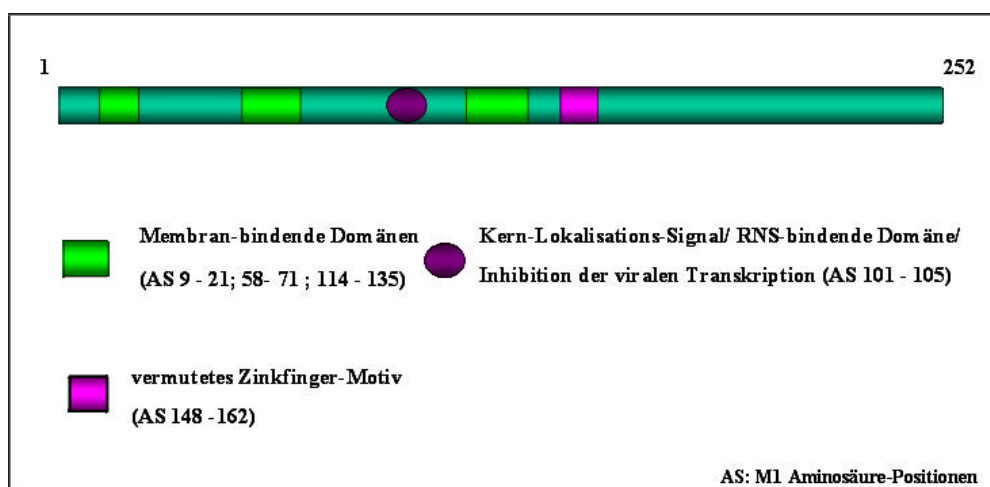
#### 1.2.1.6 NS2-Protein/NEP

NS2 konnte in geringer Kopienzahl im Virion nachgewiesen werden (Yasuda et al., 1993). Es vermittelt vermutlich den Export der vRNPs aus dem Zellkern (O'Neill et al., 1998). Daher wurde eine Umbenennung des Proteins in NEP (nuclear export protein) vorgeschlagen.

### 1.2.2 Das M1-Protein

Bei allen membranumhüllten Viren finden sich sogenannte Matrix-Proteine, die zwischen dem Nukleokapsid und der Membran eingelagert sind. Diese Proteine spielen stets eine Rolle bei der Verpackung des Kapsids in die Membranhülle und bei der Entpackung am Beginn des Infektionszyklus. Da Matrixproteine bei allen membranumhüllten Viren vergleichbare Funktionen und Eigenschaften (wie Membranbindung und Assoziation an das Nukleokapsid) haben, wurde in verschiedenen Ansätzen untersucht, ob sie auch Ähnlichkeiten in Struktur und Sequenz aufweisen. So konnte gezeigt werden, dass sich die dreidimensionalen Strukturen der N-terminalen Domänen der Matrixproteine des HIV (gag) und des Influenza A Virus (dem M1-Protein) ähneln. (Harris et al., 1999). Allerdings findet sich keine Homologie in den korrespondierenden Aminosäuresequenzen, so dass diese Strukturähnlichkeit vermutlich auf einer parallelen Anpassung unterschiedlicher Proteine auf gleiche Funktionen beruht. Da im Rahmen dieser Arbeit das M1-Protein des Influenza A Virus untersucht wurde, wird es im folgenden ausführlich dargestellt.

Das M1-Protein ist auf dem Gensegment sieben kodiert. Das Polypeptid umfasst 252 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 28 kDa. Es liegt in hoher Kopienzahl im Viruspartikel vor (3.000 Moleküle pro Virion), wo es in einer dichten Schicht unter der Membran nachgewiesen werden kann. Da das M1-Protein keine Transmembran-Domäne besitzt, wird postuliert, dass es mit den zytoplasmatischen Domänen der Transmembranproteine HA, NA und M2 interagiert. Diese Hypothese ist nicht bewiesen, sie wird jedoch durch verschiedene experimentelle Hinweise gestützt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des M1-Proteins des Influenza A Virus. Die Lage von charakterisierten und vermuteten Domänen ist eingezeichnet.

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass ein rekombinantes Influenza A Virus, dem die zytoplasmatischen Domänen des HA und des NA fehlen, Virionen bildete, die gegenüber den Wildtyp-Virionen um ein vielfaches vergrößert waren. Außerdem bildeten sie irreguläre Formen aus (Jin et al., 1997). Neben der möglichen Membranassoziation über die viralen Transmembranproteine ist das M1-Protein aber auch in der Lage, direkt an Membranen zu binden. Dies konnte *in vitro* (Bucher et al., 1980) und *in vivo* (Gregoriades & Frangione, 1981) nachgewiesen werden. Dabei wurden drei hydrophobe Bereiche des M1-Proteins als Membran-bindende Domänen identifiziert. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass keine dieser Domänen allein für die Membranbindung essentiell ist (Kretzschmar et al., 1996). Vielmehr weisen neuere Strukturanalysen darauf hin, dass das M1-Protein über seine gesamte Länge mit der Membran assoziiert ist (Shishkov et al., 1999).

Das M1-Protein bindet außerdem an vRNPs (Rees & Dimmock, 1981). Diese Interaktion ist pH-Wert-abhängig, bei Erniedrigung des pH-Werts löst sich das M1-Protein von den vRNPs und ermöglicht so deren Import in den Zellkern (Bui et al., 1996). Die molekulare Grundlage der Interaktion zwischen den vRNPs und dem M1-Protein ist noch nicht verstanden. Vermutlich ist das M1-Protein sowohl mit der RNS als auch mit Proteinen der vRNPs assoziiert (Ye et al., 1999). Es gibt Hinweise darauf, dass das M1-Protein mit dem NP interagieren kann. So assoziiert in MDBK- und MDCK-Zellen überexprimiertes M1-Protein an Zytoskelett-Strukturen nur bei gleichzeitiger Überexpression von NP (Avalos et al., 1997). Allerdings konnten Zhao et al. nach der Kotransfektion von BHK-Zellen keine Bildung von M1-NP-Komplexen beobachten, sondern nur eine Bildung von NP- bzw. M1-Homooligomeren (Zhao et al., 1998).

Das M1-Protein wird in der späten Phase der Infektion synthetisiert. Ein Teil davon wird in den Zellkern transportiert. Das M1-Protein verfügt über ein Kernlokalisierungssignal (NLS) mit der Sequenz RKLKR zwischen den Aminosäuren 101 und 105. Im Zellkern spielt das M1-Protein eine Rolle bei der Regulation der viralen Transkription und beim Export der neu synthetisierten vRNPs. Die genauen Mechanismen dieser Vorgänge sind noch nicht verstanden. Das M1-Protein kann an RNS binden (Wakefield & Brownlee, 1989; Ye et al., 1989). Diese Bindung wird ebenfalls durch die Aminosäuren 101 bis 105 vermittelt (Elster et al., 1997). Eventuell wird dadurch der vRNP-Export vermittelt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das M1-Protein mit Histonen interagiert (Zhirnov & Klenk, 1997). Die Funktion dieser Interaktion ist unklar.

Aus der Aminosäuresequenz des M1-Proteins lässt sich zwischen den Aminosäuren 148 und 162 eine Zinkfingerdomäne postulieren. Allerdings lässt sich Zink in Virionen und bei aufgereinigtem M1-Protein nur in geringem Maße nachweisen (Elster et al., 1997). Zinkfingerdomänen vermitteln Interaktionen mit Nukleinsäuren und mit Proteinen. Da die RNS-Bindung des M1-Proteins durch Zink nicht beeinflusst wird, wird eine Rolle dieser Domäne bei einer Protein-Protein-Interaktion vermutet. Die Expression eines Polypeptides, das den Bereich der Zinkfingerdomäne des M1-Proteins umfasst, hat eine inhibitorische Wirkung auf die Influenza A Virus-Vermehrung *in vitro* (Nasser et al., 1996) und *in vivo* (Judd et al., 1997). Dies könnte auf eine noch unbekannte, aber essentielle Bedeutung der Zinkfingerdomäne des M1-Proteins für die Virusvermehrung hinweisen.

Das M1-Protein des Influenza Virus ist vornehmlich an Serin-Resten und in geringem Maße an Threonin-Resten phosphoryliert (Gregoriades et al., 1984). Vor dem Beginn dieser Arbeit waren jedoch weder die phosphorylierten Aminosäuren des M1-Proteins bekannt noch die Kinasen, die das M1-Protein modifizieren. Die Funktion der Phosphorylierung ist ebenfalls noch nicht aufgeklärt. Proteinphosphorylierungen regulieren häufig die Aktivität von Proteinen oder deren intrazelluläre Lokalisation (Hunter, 1995). Für das M1-Protein konnte gezeigt werden, dass eine hyperphosphorylierte Form des Proteins im Zellkern zurückgehalten wird (Whittaker et al., 1995). Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, dass die Phosphorylierung des M1-Proteins z.T. dessen intrazelluläre Lokalisation reguliert.

Eine Röntgenstrukturanalyse der Aminosäuren 1 – 164 des M1-Proteins bei einem pH-Wert von 4,0 ergab, dass dieser Bereich eine globuläre Struktur ausbildet, die aus zwei Gruppen aus je vier  $\alpha$ -Helices besteht. Diese beiden Domänen sind über eine Schlaufe verbunden. Bei der Kristallisation bildeten diese N-terminalen M1-Bereiche Dimere aus (Sha & Luo, 1997). Bei einer Kristallisierung dieses M1-Proteinfragments bei einem pH-Wert von 7.0 wurde hingegen keine Dimerisierung beobachtet (Arzt et al., 2001). Da bei beiden Kristallisationsexperimenten die Fragmentierung des M1-Proteins spontan bei der Aufreinigung auftrat, wird angenommen, dass der N-terminale Bereich bis Aminosäure 164 eine geschlossene Domäne bildet (Arzt et al., 2001).

Ein Teil der Funktionen des M1-Protein könnte durch Interaktion mit zellulären Komponenten vermittelt werden. Diese Vermutung wird durch folgende Ergebnisse



unterstützt: Der Virusstamm A/Mallard/New York/6750/78 vermehrt sich in Primatenzellen schlechter als in seinem natürlichen Wirt, der Stockente. Eine Virus-Reassortante, die nur das M-Segment dieses Virusstammes und alle anderen Segmente aus dem humanpathogenen A/Udorn/307/72-Stamm trägt, zeigt eine vergleichbare Attenuierung in Primaten. Eine Reassortante, die das M-Segment aus dem Virusisolat A/Pintail/Alberta/119/79 zusammen mit den anderen Segmenten aus dem A/Udorn/307/72 trägt, zeigt jedoch im Primaten keine Attenuierung (Murphy et al., 1989). Daraus kann gefolgert werden, dass die beobachtete Attenuierung des Stockenten-Virus in Primaten eine Funktion des M-Segmentes darstellt. Es ist z.B. denkbar, dass dieses M1-Protein mit Komponenten in Primatenzellen nicht in dem Ausmaß interagieren kann, wie mit Komponenten seiner natürlichen Wirtszelle.

### 1.3 Infektionszyklus

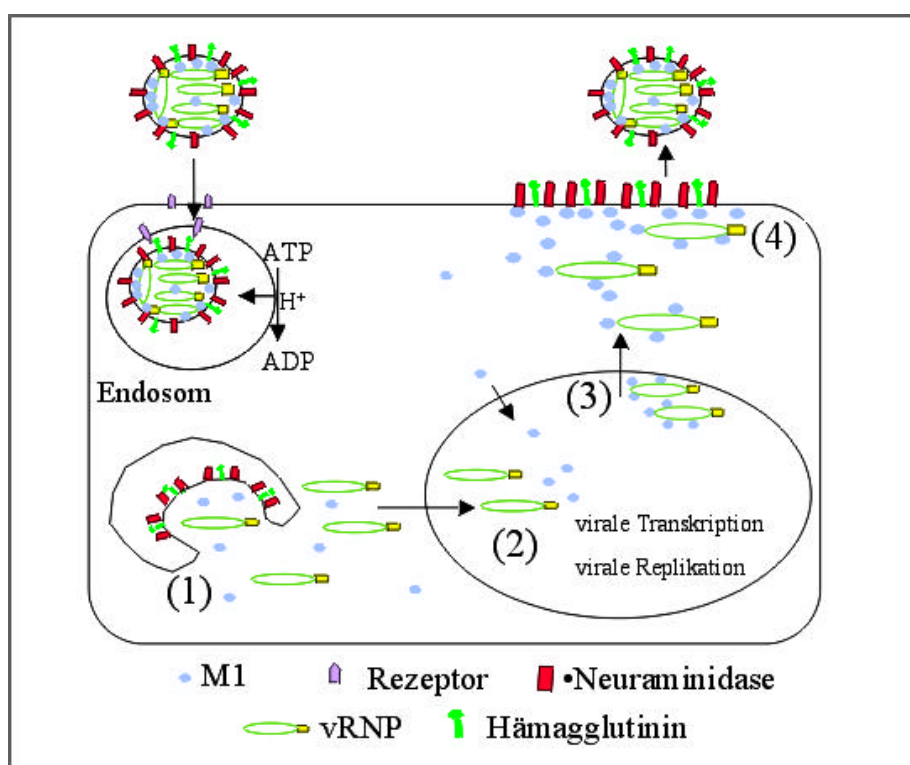
Der Verlauf der Infektion ist von der Bindung der Viruspartikel an der Oberfläche der Wirtszelle bis zum Abschnüren neuer Virionen von der Zelle seit langer Zeit intensiv untersucht worden. Diese Forschungen haben bereits zum Verständnis vieler essentieller Prozesse der Virusreplikation geführt, die im folgenden Abschnitt dargestellt sind.

#### 1.3.1 Eindringen in die Wirtszelle

Nachdem das Hämagglutinin an endständige Neuraminsäuren von Glykoproteinen (oder Glykolipiden) gebunden hat, werden Influenza A Viren durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von der Wirtszelle aufgenommen. Die Erniedrigung des pH-Wertes in den Endosomen führt zu einer Konformationsänderung des HA<sub>2</sub>-Fragments. Es kommt zur Ausbildung einer langen, hydrophoben  $\alpha$ -Helix (Bullough et al., 1994). Der vom HA<sub>1</sub>-Fragment ausgebildete Kopfbereich mit der Rezeptor-Bindetasche wird zur Seite gekippt. Die  $\alpha$ -Helix des HA<sub>2</sub>-Fragments taucht in die Endosomenmembran ein, wodurch deren Verschmelzung mit der viralen Membran eingeleitet wird. Parallel dazu werden Protonen aus dem angesäuerten Endosom durch den vom M2 gebildeten Ionenkanal in das Virusinnere transportiert. Hier führt die Ansäuerung zu einer Dissoziation der Komplexe aus den vRNPs und dem M1-Protein. Für diesen Vorgang wird eine pH-induzierte Konformationsänderung des M1-Proteins verantwortlich gemacht. Die Dissoziation des M1-Proteins von den vRNPs ist notwendig, damit die vRNPs nach der Freisetzung in das Zytoplasma in den Zellkern transportiert werden können (Bui et al., 1996). Amantadin inhibiert die Virusvermehrung durch Blockade des M2-Ionenkanals (Bron et al., 1993). Dadurch wird die Dissoziation des M1-Proteins von den vRNPs verhindert, wodurch diese im Zytoplasma der infizierten Zelle verbleiben (Martin & Helenius, 1991).

### 1.3.2 Transkription und Replikation

Nachdem die vRNPs durch aktiven Transport in den Zellkern transportiert worden sind (Kemler et al., 1994), findet hier zunächst die virale Transkription statt. Die virale Polymerase erkennt die Promotor-Regionen an den konservierten 3'- und 5'-Enden der vRNS. Diese Bereiche sind zueinander komplementär und können eine Doppelstrang-RNS-Helix ausbilden (Hsu et al., 1987).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von Influenza A Viren unter besonderer Berücksichtigung der unterschiedlichen Funktionen des M1-Proteins.** Besonders hervorgehoben sind hier (1) die Freisetzung der vRNPs in das Zytoplasma, (2) das Umschalten von viraler Transkription auf Replikation, (3) der Export der neusynthetisierten vRNPs aus dem Zellkern und (4) die Assemblierung von neuen viralen Partikeln an der Wirtszellmembran.

Allerdings weisen Daten von Fodor et al. und Flick et al. darauf hin, dass nicht die gesamten komplementären Bereiche miteinander zu einem Doppelstrang verbunden sind. Fodor et al. interpretieren ihre Daten in Richtung einer Gabel („Fork“-)-Struktur, bei welcher der innere Bereich der komplementären 3'- und 5'-Sequenz einen Doppelstrang bilden und die äußeren Bereiche einzelsträngig vorliegen (Fodor et al., 1995). Flick et al. konnten zeigen, dass zur effizienten Transkription komplementäre Bereiche sowohl innerhalb des 3'-Endes als auch innerhalb des 5'-Endes notwendig sind. Daher postulieren sie eine Struktur, die sowohl am 3'- als auch am 5'-Ende eine RNS-Schleife bilden, der ein doppelsträngiger RNS-Bereich folgt („cork-screw“- Modell) (Flick et al., 1996).

Zur Transkriptionsinitiation benötigt die virale Polymerase spezielle RNS-Fragmente, die an ihrem 5'-Ende einen spezifisch methylierten Guanosin-Rest aufweisen (m<sup>7</sup>GpppNm-Cap). Diese speziellen Oligonukleotide erzeugt die PB2-Untereinheit der viralen Polymerase, indem sie zelluläre mRNA, die eine derartige „Cap“-Modifikation trägt, 10 bis 13 Nukleotide hinter dem 5'-Ende präferentiell hinter einer Purinbase zerschneidet (Plotch et al., 1981). Dieser Vorgang wird als „cap-snatching“ bezeichnet. Nach der Oligonukleotid-unterstützten Initiation der Transkription wird die virale mRNA bis zu einem Bereich aus fünf bis sieben Uridin-Resten verlängert, der sich ca. 25 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNS befindet. Dort wird ein Poly-A-Schwanz an die mRNA synthetisiert, indem die Polymerase diesen Uridin-Bereich transkribiert, zu dessen Anfang zurückspringt und diesen Vorgang mehrfach wiederholt. Dieses „Stottern“ könnte dadurch verursacht werden, dass die Polymerase, die während der gesamten Transkription am 5'-Ende der vRNS gebunden bleibt, eine weitere Elongation der Transkription verhindert. Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass die Polymerase 5'-Enden der vRNS mit hoher Affinität bindet (Tiley et al., 1994). Durch das „cap-snatching“ und die Poly-A Schwanz-Synthese entsteht virale mRNA, die über alle nötigen Modifikationen verfügt, um aus dem Zellkern exportiert und im Zytoplasma translatiert zu werden.

Die Influenza Virus-Infektion führt zu einer Reduktion der Synthese von zellulären Proteinen. Die Expression des viralen NS1-Proteins führt zu einer Inhibition des Spleißens und des Exports von mRNA (Fortes et al., 1994; Nemeroff et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Wolff et al., 1998). Darüber hinaus wird auch die Translation von zellulärer mRNA im Zytoplasma selektiv inhibiert, während virale mRNA translatiert wird (Garfinkel & Katze, 1993).

Die virale Proteinexpression in der Influenza A Virus-infizierten Zelle kann in eine frühe und eine späte Phase unterteilt werden. Während innerhalb der ersten vier Stunden vornehmlich die Polymerase-Untereinheiten, das NP und das NS1 nachgewiesen werden können, lassen sich die Strukturproteine, zu denen neben den Glykoproteinen HA, NA und M2 auch das M1-Protein gezählt wird, erst in der späten Phase der Expression detektieren (Shapiro et al., 1987). Das M1-Protein hat neben seiner strukturbildenden Funktion auch regulative Aufgaben. Ein Teil des neu synthetisierten M1-Proteins wird in den Zellkern importiert. Dort inhibiert es die virale Transkription (Perez & Donis, 1998; Zvonarjev & Ghendon, 1980) und führt so vermutlich zu einem Umschalten auf virale Replikation.

Die virale Replikation unterscheidet sich in einigen Punkten von der ebenfalls durch die RDRP katalysierten Transkription. Bei der Replikation wird die gesamte virale RNS in ihrer gesamten Länge zuerst in eine cRNS mit positiver Polarität umgeschrieben. Diese dient anschließend als Matrize zur Synthese neuer vRNS mit negativer Polarität. Bei beiden Schritten muss der gesamte RNS-Strang repliziert werden. Der Prozess wird nicht über Cap-tragende Oligonukleotide initiiert und auch nicht mit Anhängen eines Poly-A-Schwanzes terminiert. Die genaue Regulation der viralen Replikation ist noch nicht verstanden. Es gibt allerdings Hinweise dafür, dass das NP die Termination an der Uridin-reichen Sequenz verhindert (Beaton & Krug, 1986). Die neusynthetisierten vRNS-Segmente werden im Zellkern vom NP und den drei Polymerase-Untereinheiten, die alle mittels karyophiler Sequenzen aktiv in den Zellkern transportiert werden, zu neuen vRNPs komplexiert.

### 1.3.3 Kernexport und Virusassemblierung

Da bei Influenzaviren die Replikation im Kern der infizierten Zelle stattfindet, die Tochtervirionen aber an der Zellmembran zusammengesetzt werden, müssen die neusynthetisierten vRNPs in der späten Phase aus dem Zellkern exportiert werden. Für diesen Export ist eine nukleäre Akkumulation des M1-Proteins notwendig (Martin & Helenius, 1991). Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser Export durch das NS2-Protein vermittelt wird (O'Neill et al., 1998). Das NS2 verfügt über ein funktionales Kernexportsignal, das mit Nukleoporinen interagieren kann (O'Neill et al., 1998), bindet aber nicht direkt an vRNPs. Allerdings kann das NS2 an das M1-Protein, vermutlich an dessen C-terminalen Bereich binden (Ward et al., 1995; Yasuda et al., 1993). Somit könnte es als Adapter zwischen den vRNPs und den zellulären Kernexport-Maschinerie dienen. In der Tat führt eine Injektion von anti-NS2-Antikörpern in den Kern einer infizierten Zelle zu einer Blockade des vRNP-Exports (O'Neill et al., 1998). Darüber hinaus wird auch eine Funktion des NP beim vRNP-Export diskutiert (Elton et al., 2001).

Der Zusammenbau der Tochtervirionen findet an der Plasma-Membran der infizierten Zelle statt, wohin die Glykoproteine nach ihrer Synthese durch das Endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat transportiert werden. In polarisierten Zellen, wie dem Lungenepithel, findet dieser Transport zur apikalen Zellmembran statt, an der auch die Abschnürung der Virionen erfolgt (Boulan & Pendergast, 1980). Die Freisetzung der Tochtervirionen an der äußeren Seite dieser Zellschicht ermöglicht den Viren ein schnelles Verlassen des infizierten Wirtes und das Erreichen neuer Wirte in Form einer Tröpfcheninfektion. Durch den Schleim werden die membranumhüllten Viren vor den Einflüssen der Außenwelt zusätzlich geschützt.

Der genaue Prozess der viralen Assemblierung ist noch wenig verstanden. Trotzdem kann als sicher gelten, dass das M1-Protein bei diesem Prozess eine entscheidende Rolle spielt, da es sowohl mit der Plasma-Membran als auch mit den vRNPs interagiert. Eine direkte Interaktion zwischen dem M1-Protein und den zytoplasmatischen Bereichen der Transmembranproteine konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Trotzdem wird angenommen, dass solche Interaktionen die Assemblierung der Virionen initiieren. Dies ist auch im Einklang mit der Situation bei anderen membranumhüllten Viren, bei denen Interaktionen zwischen den Matrix- und den Glykoproteinen gezeigt werden konnten. Dies ist z.B. bei Retroviren, wie dem Rous Sarcoma Virus und bei Paramyxoviren wie dem Sendai Virus der Fall (zusammengefasst in (Lenard, 1996)). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass das M1-Protein eine entscheidende Rolle beim Abschnüren von Influenzavirionen von der Zellmembran spielt (Gómez-Puertas et al., 2000).

Zur Entstehung von infektiösen Influenza Virus-Partikeln muss von jedem der acht viralen RNS-Segmente eine Kopie in das Virion verpackt werden. Bisher ist noch nicht geklärt, ob es einen Mechanismus gibt, um die Bestückung der Virionen mit einem vollständigen Satz vRNPs zu gewährleisten oder ob dieser Einbau rein statistisch erfolgt.

Während und nach der Abschnürung finden zwei für die Infektiösität der Tochtervirionen essentielle Prozesse statt. Zum einen schneidet die Neuraminidase endständige Neuraminsäurereste von der Oberfläche der Wirtszelle ebenso wie von der Oberfläche der Virionen ab und verhindert so eine Agglutination der Virionen mit der Wirtszelle bzw. miteinander. Zum anderen wird durch extrazelluläre Proteasen das HA-Vorläuferprotein in HA<sub>1</sub> und HA<sub>2</sub> gespalten. Erst dadurch kann das HA bei der nächsten Infektion seine Fusionsaktivität entfalten. Bei Influenza A Viren mit einer multibasischen Spaltstelle katalysiert die ubiquitär exprimierte Proteinkonvertase Furin diese Reaktion bereits im Transgolgi-Netzwerk (Klenk & Garten, 1994). Diese Unabhängigkeit der HA-Spaltung von extrazellulären Proteasen stellt die Hauptursache für die schweren systemischen Infektionen dar, die Influenza A Viren des Subtyps H5 und H7 bei Geflügel verursachen. Humanpathogene Influenzaviren haben monobasische HA-Spaltstellen, wodurch sich vermutlich die Restriktion der Virusausbreitung auf die Atemwege mitbegründet. Bei der bisher schwersten weltweiten Influenza-Pandemie, der „spanischen Grippe“ von 1918/19 mit über 20 Millionen Toten, kam es jedoch zu schweren und z.T. ungewöhnlich schnellen

Krankheitsverläufen. Daher wurde vermutet, dass das HA dieses Virus ebenfalls eine multibasische Spaltstelle gehabt haben könnte. Nach der Isolierung von viraler RNS aus Autopsie-Proben des „Armed Forces Institute of Pathology“ und deren Sequenzierung zeigte sich jedoch, dass das HA nicht über eine multibasische Spaltstelle verfügt (Taubenberger et al., 1997; Reid et al., 1999).

Der Maus-adaptierte Influenza A/WSN/33 Virusstamm lässt sich in Zellkultur ohne Zugabe der Protease Trypsin vermehren. Dies beruht auf der Fähigkeit des NA, die im Serum enthaltene Pro-Protease Plasminogen für die HA-Spaltung zu sequestrieren (Goto & Kawaoka, 1998). Diese Plasminogenbindung wird durch ein C-terminalen Lysinrest und den gleichzeitigen Verlust einer Glykosylierungsstelle des NA (bei WSN/33 an der Aminosäure 146) begründet. Es wurde spekuliert, ob der Pandemie-Stamm von 1918/19 ebenfalls derartige Eigenschaften hatte, wodurch die extreme Aggressivität des Erregers zum Teil hätte erklärt werden können. Allerdings liessen sich die entsprechenden Mutationen bei der Neuraminidase des 1918-Influenza A Virus nicht nachweisen (Reid et al., 2000).

#### 1.4 Fragestellung der Arbeit

Das M1-Protein ist ein pleotroper Faktor im Verlauf einer Influenza A Virus-Infektion. Neben der strukturellen Funktion spielt es bei dem Im- und Export der vRNPs in den und aus dem Zellkern ebenso eine Rolle wie beim Umschalten von viraler Transkription auf Replikation. Durch Untersuchungen mit Reassortanten von Influenza A Virus-Stämmen mit unterschiedlichem Wirts- bzw. Gewebstropismus konnte gezeigt werden, dass neben dem RNS-Segment, das für das HA kodiert, auch das M-Segment eine Rolle bei der Restriktion von Influenza A Viren bei der Ausbreitung in bzw. zwischen Wirten spielt. Ein Beispiel dafür ist die bereits erwähnte Attenuierung von unterschiedlichen Virusassortanten in Abhängigkeit von ihren M-Segmenten (Murphy et al., 1989). Auch wenn die molekularen Grundlagen dieser Restriktionen noch nicht verstanden sind, erscheint es plausibel, dass das M1-Protein mit zellulären Komponenten interagieren muß, um ein komplettes Durchlaufen des Infektionszyklus zu ermöglichen.

Die Fragestellung dieser Arbeit war es, zelluläre Komponenten zu identifizieren, die mit dem M1-Protein interagieren. Darüber hinaus wurden die gefundenen Protein-Protein-Interaktionen näher charakterisiert und ihre Bedeutung für den Infektionszyklus des Influenza A Virus untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien und Enzyme

#### 2.1.1 Chemikalien:

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Adenin-Hemisulfat	Sigma, Taufkirchen
Agar	Becton-Dickinson, Heidelberg
“Oxoid-Agar”	Oxoid, Wesel
Agarose (NEEO Ultraqualität)	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roche, Mannheim
Aprotinin	Sigma, Taufkirchen
APS (Ammoniumperoxodisulfat)	Biorad, München
L-Arginin-HCl	Sigma, Taufkirchen
Benzamidin	Sigma, Taufkirchen
Bicin (N,N-Bis-(2-Hydroxyethyl)-Glycin)	Roth, Karlsruhe
Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma, Taufkirchen
Bovines Serumalbumin (35 %)	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva, Heidelberg
DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2]-oktan)	Sigma, Taufkirchen
DEAE-Dextran	Pharmacia, Freiburg
1,2-s,n- Diolein	Sigma, Taufkirchen
DMF (Dimethylformamid)	Roth, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth, Karlsruhe
dNTPs (Desoxynukleotidtriphosphate)	Roche, Mannheim
DTT (Dithiothreitol)	Sigma, Taufkirchen
EDTA (Ethyldinitrilotetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol	Roth, Karlsruhe
FCS (fötale Kälberserum)	Gibco BRL, Eggenstein
Formamid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (Methanol-frei) 10 %	Polysciences, Warrington/PA
Galaktose (< 0,01 % Glukose)	Sigma, Taufkirchen
GF 109203X	Biomol, Hamburg
L-Glutamin	Gibco, Eggenstein
α-D-Glukose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glykogen	Roche, Mannheim
Hefeextrakt	Becton-Dickinson, Heidelberg
Hefe-Stickstoff-Basis-Medium	Becton-Dickinson, Heidelberg
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin- Ethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg
Heringssperma-DNS	Sigma, Taufkirchen
L-Histidin	Sigma, Taufkirchen
IPTG (Isopropyl-β-Thiogalactopyranidose)	Biomol, Hamburg
L-Isoleucin	Sigma, Taufkirchen
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Calbiochem, Bad Soden

Kristallviolett	Riedel de Haen, Seeze
L-Leucin	Sigma, Taufkirchen
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen
Lithiumacetat (LiAc)	Roth, Karlsruhe
LipofectAMIN 2000	Gibco, Eggenstein
L-Lysin	Sigma, Taufkirchen
Lysolecithin	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Oxoid, Wesel
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
MES (2-Morpholinoethansulfonsäure-Monohydrat)	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
L-Methionin	Sigma, Taufkirchen
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	Roth, Karlsruhe
Mowiol 4-88	Calbiochem, Bad Soden
Natriumacetat (NaAc)	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma, Taufkirchen
Natrium-Glycerophosphat	Sigma, Taufkirchen
Natriumdesoxycholat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Vanadat	Aldrich, Steinheim
NP 40	Roche, Mannheim
Phenol	Roth, Karlsruhe
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, Taufkirchen
PEG (Polyethylenglykol) 1000	Roth, Karlsruhe
PEG 3350	Sigma, Taufkirchen
PEG 4000	Serva, Heidelberg
2-Propanol	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma, Taufkirchen
Phosphatidylserin	Sigma, Taufkirchen
Raffinose	Roth, Karlsruhe
Rotiphenol (Phenol/Chloroform/Amylalkohol [25:24:1])	Roth, Karlsruhe
Rotiphoresegel 30 (Acrylamid/Bisacrylamid 29:1)	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Sorbitol	Roth, Karlsruhe
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	KMF, St. Augustin
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Test-Neuraminidase	Chiron-Behring, Marburg
Threonin	Sigma, Taufkirchen
Tricin (N-[Tris(hydroxymethyl)-methyl]-Glycin)	Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin (TPCK-behandelt)	Sigma, Taufkirchen
Tryptophan	Sigma, Taufkirchen
Trypton	Becton-Dickinson, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Tyrosin	Sigma, Taufkirchen
Uridin	Sigma, Taufkirchen
Valin	Sigma, Taufkirchen
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
X-Gal (5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactosid)	Roche, Mannheim



## 2.1.2 Enzyme:

### 2.1.2.1 DNS-modifizierende Enzyme

Alkalische Phosphatase	Roche, Mannheim MBI Fermentas, Litauen
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, Litauen Roche, Mannheim NE Biolabs, Schwalbach
RNAsin	MBI Fermentas, Litauen
T4-DNS-Ligase	Roche, Mannheim MBI Fermentas, Litauen
Expand High Fidelity PCR-System	Roche, Mannheim

### 2.1.2.2 Proteinkinasen

Proteinkinase C (Rattenhirn-Extrakt)	Calbiochem, Bad Soden
Proteinkinase C-Isoformen	Santa Cruz, California, USA
Caseinkinase II	Calbiochem, Bad Soden

### 2.1.3 Radiochemikalien

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	>5000 Ci/mmol
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-ATP	>5000 Ci/mmol
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]dCTP	>5000 Ci/mmol
L-[ <sup>35</sup> S]-Methionin	>1000 Ci/mmol
Promix: [ <sup>35</sup> S]-Methionin und [ <sup>35</sup> S]-Cystein	>1000 Ci/mmol
[ <sup>32</sup> P]-Ortho-Phosphat	8500-9120 Ci/mmol

Die Radiochemikalien wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

### 2.1.4 Sonstiges

Biomax-Röntgenfilme	Kodak, USA
BioImager-Platte	Fuji-Films, Japan
DecaLabel-DNA-Labeling Kit	MBI/Fermentas, Litauen
Dialyseschläuche	Spectrum, California, USA
DNS-Längenstandards	Roche, Mannheim Fermentas, Litauen
DNS-Sequenzier-Kit	PerkinElmer/Applied Biosystems, Weiterstadt
Elektroporationsküvetten	Biorad, München
Filterpapier 3MM (Whatmann)	Neolab, Heidelberg
Glasperlen (Säure-gewaschen)	Sigma, Taufkirchen
Glutathion-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Hybridisierungslösung (DIG-Easy-Hyb)	Roche, Mannheim
Kulturgefäße (Plastik)	Greiner, Solingen Nunclon, Dänemark Sarstedt, Nümbrecht
Multiple Tissue Northern Dot Blot	Clontech; Heidelberg
Nitrozellulose-Membran	Schleicher&Schuell, Dassel
Nylon-Membran (positiv geladen)	Roche, Mannheim
Oligotex direct mRNA-Midi- Kit	QIAGEN, Hilden
Parafilm	American National Can, USA
Protein A-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein G-Sepharose	Pharmacia, Freiburg
Protein-Längenstandard	GibcoBRL, Eggenstein
QIAEXII Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden

QIAPREP Plasmid Mini Kit  
 Quikchange™ Site-Directed Mutagenesis Kit  
 Sephadex G 25 Säulen  
 TNT-coupled Reticulocyte Lysate System

QIAGEN, Hilden  
 Stratagene, Heidelberg  
 Roche, Mannheim  
 Promega, Mannheim

## 2.2 Medien und Puffer

Die nachstehend aufgeführten Puffer wurden mit doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Die zur Einstellung des pH-Wertes verwendete Säure bzw. Base ist nach dem Pufferreagenz angegeben. Alle Prozent-Angaben sind, falls nicht anders erwähnt, Volumenprozent.

### 2.2.1 Bakterien-Medien

LB-Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7.2
2 x YT-Medium	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl pH 7.2
5 x A (Minimal-A Medium)	52,5 g/l $K_2HPO_4$ 22,5 g/l $KH_2PO_4$ 5 g/l $(NH_4)_2SO_4$ 2,5 g/l Natrium-Zitrat
1 x A-Platten	15 g Agar
Nach den Autoklavieren zugegeben	790 ml $H_2O$ 200 ml 5 x A 0,2 % (w/v) Glukose 10 mg/l Vitamin B1 0,812 mM $MgSO_4$
SOC-Medium	20 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl
Nach den Autoklavieren zugeben:	20 mM $Mg^{2+}$ -Stock (1 M $MgCl_2 \times 6 H_2O$ + 1 M $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ) 0,4 % (w/v) Glukose
(sterilfiltriert)	
Bei Bedarf wurden den Medien nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:	
Ampicillin	100 $\mu g/ml$
Kanamycin	30 $\mu g/ml$

Zur Herstellung fester Nährböden wurde den Medien 1.5 % (w/v) Agar zugesetzt.

## 2.2.2 Hefe-Medien und -Puffer

Synthetisches Vollmedium (SC)	6,7 g/l Hefe-Stickstoff-Basis Medium 20 g/l Agar (für Platten) 1 mM NaOH
Nach dem Autoklavieren zugegeben	2 % (w/v) Glukose oder 2 % (w/v) Galaktose + 1 % Raffinose 1 x AA-Mix 0,2 g/l Threonin 30 mg/l Isoleucin 150 mg/l Valin
bei Bedarf zugegeben	20 mg/l Uridin 20 mg/l L-Histidin 100 mg/l L-Leucin 20 mg/l Tryptophan
X-Gal-Platten	65 g/l Hefe-Stickstoff-Basis-Medium 20 g/l Agar 1 mM NaOH
Nach dem Autoklavieren zugegeben:	2 % (w/v) Glukose oder 2 % (w/v) Galaktose + 1 % Raffinose 1 x AA-Mix 0,2 g/l Threonin 0,03 g/l Isoleucin 0,15 g/l Valin 10 mg/l L-Leucin 70 mM Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,0 10 µg X-Gal (20 mg/ml in DMF gelöst)
10 x Aminosäuren (AA-Mix)	0,2 g/l Adenin-Hemisulfat 0,2 g/l L-Arginin-HCl 0,3 g/l L-Lysin-HCl 0,5 g/l L-Phenylalanin 0,3 g/l L-Tyrosin 0,2 g/l L-Methionin
YPAD-Medium	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 0,1 g/l Adenin-Hemisulfat
Nach den Autoklavieren zugegeben	2 % (w/v) Glukose
Glycerinlösung	65 % Glycerin 0,1 M MgSO <sub>4</sub> 25 mM Tris-Cl, pH 7,4
Frost-Lösung 1	1 M Sorbitol 10 mM Bicin-NaOH, pH 8,35 3 % Ethylenglykol 5 % DMSO
Frost-Lösung 2	40 % (w/v) PEG 1000 0,2 M Bicin-NaOH, pH 8,35
Frost-Lösung 3	0,15 M NaCl 10 mM Bicin-NaOH, pH 8,35

Hefe-Aufbruchpuffer	0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA 1 % SDS 2 % Triton X-100
---------------------	--

### 2.2.3 Medien für die Zellkultur

Die Zellkulturmedien wurden im Institut zubereitet oder bezogen über:

MEM (Minimal Essential Medium)	Gibco BRL, Eggenstein
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium)	Gibco BRL, Eggenstein
Medien ohne Methionin und ohne Cystein ( <sup>35</sup> S-Markierung)	Sigma, Taufkirchen
Medien ohne Phosphat ( <sup>32</sup> P-Markierung)	Sigma, Taufkirchen

Für die Zellkultur wurden die Medien frisch komplettiert mit:

10 % FCS  
2 mM Glutamin  
50 Einheiten/ml Penicillin-Streptomycin

Abweichend davon wurde komplettiert für:

- Transfektionsansätze
 

10 % FCS  
2 mM Glutamin
- Infektionsexperimente
 

0,1 % FCS oder 0,2 % BSA  
2 mM Glutamin  
50 Einheiten /ml Penicillin-Streptomycin

## 2.3 Stammlösungen

PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 80,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,4 (HCl)
PBS/BA/Mg <sup>2+</sup> /Ca <sup>2+</sup>	PBS 0,1 g/l MgCl <sub>2</sub> 0,1 g/l CaCl <sub>2</sub> 0,2 % Bovines Serumalbumin
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,15 M NaCl
10 x TBST	0,1 M Tris-HCl, pH 8,0 1,5 M NaCl 0,5 % Tween 20
10 x SDS-Gellaufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 10 g/l SDS
2 x SDS-Ladepuffer	0,1 M Tris, pH 6,8 4 % (w/v) SDS 20 % Glycerin 5 % β-Mercaptoethanol eine Spatelspitze Bromphenolblau
Tris-Tricin-Gelpuffer	3 M Tris-HCl, pH 8,35 3 g/l SDS

Acrylamid/Bis (49,5 / 3)	48 % (w/v) Acrylamid 1,5 % (w/v) Bisacrylamid
Anoden-Laufpuffer	0,2 M Tris-HCl, pH 8.9
Kathodenpuffer	0,1 M Tris 0,1 M Tricin 1 g/l SDS
Semidryblot-Puffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 1,3 mM SDS 20 % Methanol
Proteingel-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 10 % Essigsäure 45 % Ethanol
Proteingel-Entfärbelösung	10 % Methanol 5 % Essigsäure
Proteingel-Fixierlösung	30 % Methanol 10 % Essigsäure
10 x TBE-Puffer	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 10 mM EDTA, pH 8,0
10 x TE	0,1 M Tris, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0
6 x DNS-Ladepuffer	0,1 % (w/v) Bromphenolblau 0,1 % (w/v) Xylenzanol 30 % Glycerin
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Na-Zitrat
RNS-Gel-Laufpuffer (5 x)	100 mM MOPS 25 mM NaAc 5 mM EDTA pH 7,0
Formamid-Auftragspuffer	48 % Formamid 17 % Formaldehyd 11 % Glycerin 0,1 % Bromphenolblau
Transferpuffer	3 M NaCl 8 mM NaOH
Net-N	1 x TE, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % NP 40

RIPA Puffer	50 mM Tris, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % NP 40 0,5 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS
frisch zugegeben:	1 mM PMSF 0,5 % Aprotinin 1 mM Na-Vanadat 5 mM Benzamidin 0,5 mM DTT 10 mM Na-Fluorid 50 mM Natriumglycerophosphat
GST-Präzipitationspuffer	20 mM HEPES, pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 – 0,5 % NP 40
Hypotonischer Puffer	10 mM NaCl 20 mM Tris, pH 7,5 0,5 mM EDTA 1 mM Na-Vanadat 0,5 mM DTT 5 mM Benzamidin
Mowiol	2,4 g Mowiol 4-88 6 ml Glycerin 6 ml dH <sub>2</sub> O
über Nacht quellen gelassen zugegeben und unter Rühren auf 50-60°C erhitzt. Nachdem sich das Mowiol gelöst hatte, wurde es 15 Min. mit 4.000 Upm zentrifugiert und der Überstand mit DABCO (10% (w/v)) versetzt. Aliquots wurden bei -20°C aufbewahrt.	12 ml 0,2 M Tris pH 8,5

## 2.4 Plasmide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Funktion</b>	<b>Referenz</b>
<b>Hefe-Two Hybrid-System</b>		
pSH 18-34	lacZ-Reportergen unter LexA-Transkriptionskontrolle	
pJK 101	lacZ-Reportergen für Repressions-Experiment	
pSH 17-4	Positivkontrolle für die Transkriptionsaktivierung	
pRFHM-1	Negativkontrolle, exprimiert das Drosophila-Protein Bicoid fusioniert an LexA	(Finley & Brent, 1996)
pJG 4-5	Vektor zur Expression von B42-Fusionsproteinen, z.B. cDNS-Genbibliotheken	
pEG 202	Vektor zur Expression von LexA-Fusionsproteinen	
pLexA-M1	Expr. von LexA-M1 Fusionsprotein für Two Hybrid-Screen	diese Arbeit
<b>Klonierung der vollständigen RACK1-cDNA</b>		
pTARGET	Vektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten über Adenin-Überhänge	Promega, Mannheim
pTARGET-RACK1	Vektor mit der vollständigen RACK1-cDNA aus HeLa-Zellen	diese Arbeit
<b>GST-Kopräzipitations-Experimente</b>		
pGEX 5x-1	Vektor zur bakteriellen Expression von GST-Fusionsproteinen,	Pharmacia, Freiburg
pGST-2 I 6	bakt. Expression der cDNS des Striatin-Homologs 2 I 6	diese Arbeit
pGST-2 IV 1	bakt. Expr. des Syndecan-4-Klons 2 IV 4	
pGST-2 V 6	bakt. Expr. der cDNS des Striatin-Klons 2 V 6	

pGST-3 I 7	bakt. Expr. der cDNS des Klons 3 I 7
pGST-3 II 2	bakt. Expr. der cDNS des Klons 3 II 2
pGST-3 III 1	bakt. Expr. der cDNS des RACK1-Klons 3 III 1
pGST-4 IV 1	bakt. Expr. der cDNS des RACK1-Klons 4 IV 1
pGST-4III1	bakt. Expr. des RACK1-Klons 4 III 1
pGST-RACK1	bakterielle Expression von GST-RACK1wt
pGST-WD V	bakt. Expr. der RACK WD-Domäne 5
pGST-WD V + 6	bakt. Expr. der RACK WD-Domänen 5 und 6
pGST-WD 6	bakt. Expr. der RACK WD-Domäne 6
pGST-WD 6 + VII	bakt. Expr. der RACK WD-Domänen 6 und 7
GST-WD VII	bakt. Expr. der RACK WD-Domäne 7
pGST-M1wt	bakt. Expr. des M1-Protein

### Zellkultur-Transfektion

pcDNA 3,1myc/his	Vektor zur Proteinsynthese in Kulturzellen	Invitrogen, Niederlande
pcDNA-GSTmyc	Expr. von GSTmyc in Zellen	
pcDNA-GST-4 III 1myc	Expr. von GST-4 III 1 mit myc-Markierung in Zellen	diese Arbeit
pcDNA-4 III 1myc	Expr. von 4 III 1 mit myc-Markierung	
pcDNA-RACKmyc	Expr. des RACK1wt mit myc-Markierung	

### In vitro-Proteinsynthese

pcDNA-M1 wt	T7-Promotor-vermittelte Expression des M1-Proteins	
pcDNA-M1 (51-252)		
pcDNA-M1 (76-252)	Expression	
pcDNA-M1 (91-252)		
pcDNA-M1 (113-252)		
pcDNA-M1 (120-252)	der jeweils angegebenen	
pcDNA-M1 (136-252)		diese Arbeit
pcDNA-M1 (1-200)		
pcDNA-M1 (1-170)	Aminosäuren des	
pcDNA-M1 (1-148)		
pcDNA-M1 (1-135)		
pcDNA-M1 (1-112)	M1-Proteins	
pcDNA-M1 (1-90)		
pcDNA-M1 Δ91-115		

## 2.5 Oligonukleotide

Für Sequenz-Reaktionen und Polymerase-Kettenreaktionen wurden die folgenden, von Dr. Krause im Institut für Molekulare und Tumorbologie der Philipps-Universität Marburg oder von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellten Oligonukleotide verwendet. Die in Fettdruck dargestellten Sequenzbereiche stellen Erkennungsstellen der jeweiligen Restriktionsendonukleasen dar, Transkriptions-Stop-Sequenzen sind unterstrichen.

Name	RE-Site	Sequenz
B 42 AD		TTG CTG AGT GGA GAT GCC
B 42 3'		TGA TTG GAG ACT TGA CC
T7-Promotor, 5'		AAT ACG ACT CAC TAT AGG G
pTARGET-Sequenz; 3'		GAT ATG ACC ATG ATT ACG CC
M1 Seq 1		TCT TTG CAG GGA AGA ACA CC
M1 Seq 2		AGC AAA TGG CTG GAT GCA G
M1 Seq 3		GGC ATT TTG GAC AAA GCG TC
hRACK 1, 5'	Xma I	gC <b>CCg ggg</b> gCC ATg ACT gAg Cag ATg ACC
hRACK1, 3'	Sal I	gCg <b>gTC gAC</b> AAg CTC TgC CAT AAA CTTC
T(argeT)-RACK 3'	Sfu I	Cgg CgT <b>TCg AA</b> g CgT gTg CCA ATg gTC CAC CTg
GST-RACK1, 5'	Hind III	Cgg <b>AAg CTT</b> CAT gTC CCC TAT ACT Ag
GST-RACK1, 3'	Xba I	Cg <b>TCT AgA</b> gCg TgT gCC AAT ggT CAC
RACK-KpnI, 5'	Kpn I	CgC <b>ggT ACC</b> gCC ATg ACT gAg Cag ATg
RACK-XmaI, 3'	Xma I	gCg <b>CCC ggg</b> TCT AgC gTg TgC CAA Tgg
myc-RACK 5'	Kpn I	gC <b>ggT ACC</b> ATg gAA CAA AAA CTC ATC TCA gAA gAg gAT CTg gCC ATg ACT gAg CAg ATg ACC
myc-RACK 3'	Xba I	CgC <b>TCT AgA</b> TCT AgC gTg TgC CAA Tgg
myc-tag+end, 3'	Sal I	gg CgC <b>gTC gAC</b> TCA ATg CAT ATT CAg ATC CTC
RACK end, 5'		TgC TTC AgC CCT AAC CgC TAC
RACK begin, 3'		gCC ATC TgA ggA gAT AAC CAC
RACK1, WD V 5'	Kpn I	gg <b>ggT ACC</b> AAC CAC ATT ggC CAC
RACK1, WD V 5'	Eco RI	gC <b>gAA TTC</b> AAC CAC ATT ggC CAC
RACK1, WD V 3'	Xho I	gCg <b>CTC gAg</b> CTA gAg ATC CCA TAA CAT ggC C
RACK1, WD 6 5'	Eco RI	gC <b>gAA TTC</b> gAT ggT ggg gAC ATC ATC AAC
RACK1, WD 6 3'	Xho I	gCg <b>CTC gAg</b> CTA TAA ATC CCA gAT CTT gAT gC
RACK1, WDVII 3'	Xho I	gCg <b>CTC gAg</b> AAg CTC TgC CAT AAA CTTC
pGEX-Sequenz. 5'		gTA TAT AgC Atg gCC TTT gCA gg
myc 3' Xho I	Xho I	gCg <b>CTC gAg</b> TCA ATg CAT ATT CAg ATC CTC
4 III 1 myc 5'	Hind III	GGC <b>AAG CTT</b> GCC ATG AAA TAC ACT GTC CAG
M1 5'	Eco RI	gC <b>gAA TTC</b> ATG AGT CTT CTA ACC
M1-Xho I	Xho I	ggC <b>CTC gAg</b> TCA CTT gAA CCg TTg C
M1 Δ 91-115	BamH I	ggC <b>gga TCC</b> ATC ACT CAg TTA TTC TgC
M1 Δ 1-135, 5'	Eco RI	ggC <b>gAA TTC</b> ggg gCT gTg ACC ACT g
M1 Δ 136-, 3'	Xho I	ggC <b>CTC gAg</b> TCA CAT CCT gTT gTA TAT gAg
M1 Δ 91-252, 3'	Xho I	ggC <b>CTC gAg</b> TCA Tgg ATC CCC gTT CCC
M1 Δ 2-50, 5'	Eco RI	CgC <b>gAA TTC</b> AAg ATg CCA ATC CTg TCA CCT CTg ACT
M1 Δ 201-, 3'	XbaI	gC <b>TCT AgA</b> CTA TgC TgC TTg CTC ACT CgA TC
M1 Δ 2-135 5'	Eco RI	CgC <b>gAA TTC</b> AAg ATg ggg gCT gTg ACC ACT gAA g
M1 Δ 2-75; 5'	Eco RI	gC <b>gAA TTC</b> AAg ATg CgT AgA CgC TTT gTC
M1 Δ 113-, 3'	Xho I	g CCg <b>CTC gAg</b> TCA ggC CCC Atg gAA TgT TAT C
M1 Δ 171, 3'	Xba I	GGC <b>TCT AGA</b> TCA GTT TGT TGT CAC CAT TTG
M1 Δ 148, 3'	Xba I	GGC <b>TCT AGA</b> TCA TAC CAG GCC AAA TGC CAC TTC
M1 Δ 2 – 90, 5'	Eco RI	GCC <b>GAA TTC</b> AAG ATG AAT AAC ATG GAC AAA GC
M1 Δ 2-112, 5'	Eco RI	GCC <b>GAA TTC</b> AAG ATG AAA GAA ATC TCA CTC
M1 Δ 141-, 3'	Xho I	GCC GCT <b>CGA GTC</b> AAG TGG TCA CAG CCC C



## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
$\alpha$ -RACK1	monoklonaler Maus IgM, erkennt den Bereich zwischen AS 113 und 317	Biomol, Hamburg
$\alpha$ -Influenza M1	monoklonaler Maus IgG, gegen das gesamte Protein gerichtet	Serotec, USA
$\alpha$ -c-Myc	Kaninchen-Serum, erkennt das hier verwendete 9E10-Myc-tag	Santa Cruz, USA
$\alpha$ -c-Myc	monoklonaler Maus IgG, erkennt ebenfalls das 9E10-Myc-tag	Santa Cruz, USA
$\alpha$ M1	Kaninchen-Serum, gegen das Influenza A Virus-Matrix-Protein	Institut für Virologie, Universität Marburg
$\alpha$ -WSN	Kaninchen-Serum, gegen Influenza A Gesamt-Virus	

### 2.6.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Eigenschaften	Referenz
<b>Western Blot-Detektion</b>		
Kaninchen $\alpha$ Maus-IgG, POD	erkennt Fc-Teil des Maus AK (1:15.000)	Dako, Hamburg
Schwein $\alpha$ Kaninchen-IgG, POD	erkennt Fc-Anteil des Kaninchen-Serums (1:10.000)	Dako, Hamburg
Ziege $\alpha$ Maus IgG, POD	erkennt den Fc-Anteil des IgG.	Dianova, Hamburg
Ziege $\alpha$ -Maus IgM, POD	erkennt die schwere Kette des IgM	Dianova, Hamburg
<b>Indirekte Immunfluoreszenz</b>		
Schaf $\alpha$ Maus-IgG, TR (Texas Red)	erkennt Fc-Anteil muriner IgG	Dianova, Hamburg
Ziege $\alpha$ -Kaninchen-IgG, TR	erkennt Fc-Anteil des Kaninchen-IgG	
Ziege $\alpha$ -Kaninchen-IgG, FITC (Fluoresceinisothiocyanat)	erkennt Fc-Anteil des Kaninchen-IgG	

## 2.7 Bakterien - und Hefestämme

### 2.7.1 *Escherichia coli*

BL 26	[F <sup>34</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub><sup>34</sup> m<sub>B</sub><sup>34</sup>) gal dcm</i> ]
DH5 $\alpha$	[F <sup>34</sup> $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17 (r<sub>K</sub><sup>34</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) supE44</i> $\lambda$ <sup>34</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i> ]
MH3	( <i>trpC araD lacX hsdR galU galK</i> )
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>pro AB lacI</i> <sup>q</sup> $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )].

### 2.7.2 *Saccharomyces cerevisiae*

EGY48	( <i>MATa trp1 ura3 his3 LEU2::pLEX-Aop6-LEU2</i> ),
-------	--

## 2.8 Eukaryontische Zelllinien

Bezeichnung	Ursprung	ATCC-Nummer
MDCKII	immortalisierte Nierenepithelzellen des Hundes	CCL-34
293T	humane, embryonale Nierenzellen, (mit dem großem T-Antigen des SV-40 Virus transformiert)	CRL-1573
HeLa	humane Gebärmutterhals-Karzinom-Zelllinie	CCL-2

## 2.9 Virus-Stämme

In dieser Arbeit wurden die Influenza A Virusstämme A/WSN/33, A/FPV/Ro/34 und A/Swi/Wis/1/67 verwendet. Von den Virusstämmen lagen tiefgefrorene Proben in der im

Institut für Virologie der Universität Marburg gelagerten Stammsammlung von Professor Scholtissek aus Giessen vor.

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische und biochemische Methoden

Die hier aufgeführten molekularbiologischen Methoden sind, wenn nicht anders erwähnt, aus (Sambrook et al., 1989) oder (Ausubel et al., 1992) entnommen.

##### 3.1.1 Amplifikation spezifischer DNS-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNS-Bereich zwischen zwei bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschemata in einem Reaktionsvolumen von 50  $\mu$ l angesetzt:

- 10 ng Matrizen-DNS
- 100 ng ‚sense‘-Oligonukleotid
- 100 ng ‚anti-sense‘-Oligonukleotid
- 5  $\mu$ l 10 x Expand-Polymerase-Puffer
- 1  $\mu$ l dNTP-Mix, 10 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- ad 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O
- 0,75  $\mu$ l Expand Polymerase

Die Hybridisierungstemperatur variiert dabei in Abhängigkeit der Länge und Komplementarität der Oligonukleotide: Die Synthesedauer ist abhängig von der Länge des zu amplifizierenden DNS-Fragmentes. Folgende Parameter stellen einen Anhaltspunkt für das Syntheseprotokoll dar.

• Initiale Denaturierung:	96°C	1 Min.	
• Denaturierung	96°C	10 Sek.	} 25 Zyklen
• Hybridisierung	45 – 75°C	10 Sek.	
• Synthese	72°C	45-90 Sek.	

Nach Beendigung der Synthese wurde der Ansatz in einem analytischen 1 %igem Agarosegel untersucht und gegebenenfalls das amplifizierte DNS-Fragment aus der Agarose extrahiert.

##### 3.1.2 RT-PCR

Bei der RT-PCR zur Klonierung einer kodierenden DNS aus mRNA wird diese zuerst durch eine virale RNS-abhängige DNS-Polymerase (Reverse Transkriptase, ‚RT‘) in cDNS (komplementär-DNS) umgeschrieben. Diese kann dann wie bei einer gewöhnlichen PCR von der DNS-abhängigen DNS-Polymerase eines thermostabilen Bakterienstammes amplifiziert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mittels RT-PCR die kodierende Sequenz des gesamten RACK1 Proteins aus HeLa-mRNS amplifiziert. Dazu wurden 100 ng der mRNS mit 2,5 pmol des hRACK1, 3'-Oligonukleotids versetzt und mit Hilfe der Superscript II- Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Der Reaktionsansatz der reversen Transkription wurde direkt in eine PCR mit den beiden RACK1-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. Bei dieser PCR-Reaktion wurde die Taq-Polymerase (Roche) eingesetzt, da diese am Ende des synthetisierten DNS-Doppelstrangs das Nukleotid Adenosin ergänzt. Dadurch entsteht ein A-Überhang am 3'-Ende des PCR-Produktes. Dieser Überhang ist komplementär zu T-Überhängen an den 5'-Enden im linearisierten pTARGET-Plasmid, wodurch die Ligation vereinfacht ist.

### 3.1.3 Längenauftrennung von DNS-Fragmenten im Agarosegel

Doppelsträngige DNS-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 10 kbp wurden in 0,8 – 2 %igen, horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente dabei 1 x TBE. Die aufzutrennende DNS wurde zuvor mit 1/5 Volumen 6 x DNS-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 50 – 120 Volt. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) zur Gelmasse wurde die DNS während der Elektrophorese angefärbt und hinterher durch UV-Licht sichtbar gemacht.

### 3.1.4 Extraktion spezifischer DNS-Fragmente aus Agarosegelen

Auf dem UV-Durchlichtschirm wurden DNS-Moleküle von Interesse mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des QIAEX II Kits nach den Herstellerangaben extrahiert.

### 3.1.5 Spaltung von DNS-Molekülen an definierten Sequenzen mittels Restriktionsendonukleasen

0,1 - 10 µg DNS wurden mit 5-10 Einheiten Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 – 40 µl verdaut. Restriktionen erfolgten in den entsprechenden Inkubationspuffern bei dem Temperaturoptimum des Enzyms.

### 3.1.6 Dephosphorylierung von DNS an 5' – Enden

Die Religation der komplementären Vektorenden wurde durch Dephosphorylierung der 5' – Enden verhindert. Dazu wurden die Vektor-Restriktionsverdau-Reaktionen mit 0,1 Einheit alkalische Phosphatase aus Kälberdarm versetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die alkalische Phosphatase wurde anschließend mittels phenolischer Extraktion entfernt.

### 3.1.7 Phenolische Extraktion von DNS-Molekülen

Der unter 3.1.6. beschriebene Reaktionsansatz wurde zur Vergrößerung des Volumens mit bidestilliertem Wasser auf 200  $\mu$ l gebracht. Anschließend wurde 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1), pH 7-8 zugegeben und der Ansatz 3 Min. mit dem Vortex durchmischt. Die Proben wurden für 2 Min. bei 14.000 Upm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 2,5 Volumen 100 %igem Ethanol versetzt. Nach 30 Min. Inkubation bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurde die DNS durch Zentrifugation bei 14.000 Upm (für 30 Min.) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 20  $\mu$ l sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Die Bestimmung der DNS-Konzentration erfolgte durch Mengenvergleich im Agarosegel.

### 3.1.8 Verknüpfung von DNS-Fragmenten an definierten Enden (Ligation)

Die T4-DNS-Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittener Vektor-DNS wurden mit einem dreifachen molaren Überschuss des zu inserierenden DNS-Fragments, 1  $\mu$ l 10 x T4-Ligase-Puffer und 1  $\mu$ l T4-DNS-Ligase (1 Einheit) in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l bei  $16^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert. Der halbe Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

### 3.1.9 Spektralphotometrische Analyse von Nukleinsäuren

Da DNS ultraviolettes Licht absorbiert, kann man durch Messung der Extinktion (E) bei einer Wellenlänge von 260 nm die Konzentration der DNS bestimmen. Dabei gelten folgende Beziehungen :

Konzentration (doppelsträngige DNS) =  $50 * E_{260} * \text{Verdünnung der Messlösung}$

Konzentration (einzelssträngige DNS) =  $30 * E_{260} * \text{Verdünnung der Messlösung}$

Konzentration (RNS) =  $40 * E_{260} * \text{Verdünnung der Messlösung}$

Da auch Proteine Licht der Wellenlänge 260 nm absorbieren, ihr Absorptionsmaximum aber bei 280 nm liegt, lässt der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  eine Aussage über den Reinheitsgrad der DNS zu. Bei reiner DNS liegt dieser bei 1,8 bis 2,0.

### 3.1.10 Sequenzierung von Plasmid-DNS

Zur Sequenzbestimmung eines DNS-Strangs wird eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit nur einem Oligonukleotid durchgeführt. Dabei entstehen durch statistischen Einbau von 2',3'-Dideoxynukleotiden (ddNTPs), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert

sind, durch Kettenabbrüche Fragmente mit definierten terminalen Basen. Diese Fragmente, ergeben bei einer Gelelektrophorese eine Leiter, anhand derer sukzessive die Sequenz über die jeweiligen terminalen Basen ermittelt werden kann. In dieser Arbeit wurde zur Erzeugung und Markierung der PCR-Fragmente das ABI PRISM™ Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) verwendet.

Zur Sequenzierung wurden 250 ng Plasmid-DNS mit 10 pmol eines Sequenzier-Primers und 3 µl Terminator-Mix (Fa. Perkin Elmer) in 10 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Sequenz-PCR lief mit den Parametern

96°C	10 Sek.		25 Zyklen
50°C	5 Sek.		
60°C	4 Min.		

Anschließend wurde die PCR-Probe auf 100 µl mit H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 10 µl NaAc (3 M, pH 5,3) und 250 µl Ethanol gefällt und zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNS in 1,5 µl Formamid-Puffer aufgenommen. Die Fragmente wurden auf einem automatischen DNS-Sequenzer (Fa. Perkin Elmer) durch Elektrophorese ihrer Länge entsprechend getrennt. Ein Laser detektierte während der Elektrophorese die Farbstoffe der einzelnen Fragmente. Die Auswertung der Sequenz erfolgte automatisch mit der Software „Sequencing Analysis 3.0“ (ABI PRISM/Perkin Elmer).

### 3.1.11 In vitro Translation und Transkription von Genen

Mit Hilfe des TNT-Quick coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) lassen sich Proteine aus cDNS direkt *in vitro* synthetisieren. Die cDNS liegt dabei in einem Plasmid mit T7 Promoter vor und wird im Retikulozytenlysat zunächst durch Zugabe von T7 Polymerase in mRNA transkribiert. Bei der folgenden Translation der mRNA entstehen durch Zugabe von Aminosäuren, Puffer und [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markierte Proteine. Die *in vitro* Proteinsynthesen erfolgten nach Angaben des Herstellers.

### 3.1.12 Gelelektrophoretische Größen-Auftrennung von Proteinen

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach Denaturierung und Ladungsausgleich (durch β-Mercaptoethanol und SDS) in einer aus Acrylamid- und Bisacrylamid-Untereinheiten bestehenden Matrix nach ihrer Molmasse elektrophoretisch aufgetrennt. Die obere Teil des Gels (Sammelgel) hat eine geringere Polyacrylamid-Konzentration. Er dient zur Konzentration der Proben und führt zur Ausbildung schärferer Banden im Trenngel.

Rezept für SDS-Polyacrylamid-Gele:

	Trenngel			Sammelgel
	10 %	12,5 %	15 %	5 %
Rotiphoresegel 30 % (29:1)	3,3 ml	4,125 ml	5 ml	1,66 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
0,5 M Tris, pH 6,8	-	-	-	1,25 ml
SDS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
APS	0,1 %	0,1 %	0,1 %	0,1 %
TEMED	6 µl	6 µl	6 µl	12 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml			

In einer Mini-Protean 3 Gießvorrichtung (Biorad) wurde zwischen zwei Glasplatten mit einem Abstand von 0,75 mm zunächst das Trenngel und nach dessen Polymerisierung das Sammelgel gegossen. Durch einen Kamm wurden im Sammelgel die Taschen zur Probenbeladung freigehalten. Nach dem Beladen der Taschen wurde die Elektrophorese mit 25 mA pro Gel in vertikalen Laufapparaturen (Biorad) mit 1 x SDS-Gellaufpuffer durchgeführt.

Zur Analyse viraler Proteine kam ein 15 %iges Polyacrylamidgel mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 173:1 zum Einsatz. Dadurch ergab sich eine Auftrennung der beiden viralen Komponenten M1-Protein (27,5 kDa) und NS1-Protein (26 kDa). Das Trenngel setzte sich wie folgt zusammen:

	Trenngel (15 %)
40 % (w/v) Acrylamid	3,76 ml
2 % (w/v) Bisacrylamid	0,433 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml
10 % (w/v) SDS	0,1 ml
TEMED	5,5 µl
APS	0,1 %
H <sub>2</sub> O	ad 10 ml

Das Sammelgel hatte die gleiche Zusammensetzung wie beim herkömmlichen SDS-Gel.

Neben den SDS-Polyacrylamidgelen wurden auch Tris-Tricingele zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen verwendet. Mit Tris-Tricingelen lassen sich Proteine mit einer Größe zwischen zwei und zehn kDa besser auftrennen als in SDS-Polyacrylamid-Gelen.

Die Tris-Tricingele werden ebenso gegossen wie die SDS-Polyacrylamidgele. Die Gelelektrophorese wird bei 90 V durchgeführt. Diese Gele laufen erheblich langsamer als SDS-Polyacrylamidgele.

### Rezept für Tris-Tricingele

	<b>Trenngel</b>	<b>Sammelgel</b>
Acrylamid/Bis (49,5:3)	5 ml	1 ml
Tris-Tricingelpuffer	5 ml	3,1 ml
Glycerin	2 ml	-
H <sub>2</sub> O	3 ml	8,4 ml
APS (10 %)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

#### 3.1.13 Proteinfärbung im Polyacrylamidgel

Mit dem Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau R250 können Proteine durch Komplexbildung im Polyacrylamidgel angefärbt werden. Nach Trocknung des Gels lässt sich die Färbung dokumentieren. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15 Min. in der Proteingel-Färbelösung inkubiert, wodurch der Farbstoff in das gesamte Gel diffundierte. Bei der anschließenden Entfärbung (2 Stunden in Proteingel-Entfärbelösung) wurde der freie Farbstoff aus dem Gel entfernt. Die Bereiche, in denen Proteine mit dem Coomassie schwerlösliche Komplexe gebildet hatten, blieben angefärbt. Die Gele wurden nach kurzer Wässerung in H<sub>2</sub>O auf Filterpapier mit einem Vakuumtrockner getrocknet.

#### 3.1.14 Immundetektion von Proteinen (Western Blot)

Beim Western Blot lassen sich spezifische Proteine mittels Antikörpern nachweisen. Dazu werden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine zunächst in einem elektrischen Feld aus der Gelmatrix auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dies geschah im Semi-Trockenblot-Verfahren mittels einer Semidryblotkammer (Transblot SD, Biorad) gemäß Herstellerangaben. Der Erfolg der Proteinübertragung lässt sich durch eine reversible Ponceau S-Färbung überprüfen. Dazu wurde die Membran 1 – 5 Min. mit 0,1 % Ponceau S (in 7 % Trichloressigsäure) inkubiert und mit destilliertem Wasser entfärbt.

Zum Immunnachweis von Proteinen wurde die Membran zunächst eine Stunde mit Magermilchlösung (3 % Magermilchpulver in TBST) behandelt, um unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu verhindern. Der zu verwendende primäre Antikörper wurde in TBST/BSA (1 % (w/v)) verdünnt. Die geeignete Konzentration muss für jeden Antikörper empirisch ermittelt werden. Die Membran wurde eine Stunde mit 170 µl Antikörperlösung/cm<sup>2</sup> bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBST wurde der ebenfalls in TBST/BSA (1 % (w/v)) verdünnte Sekundärantikörper zugegeben. Dieser erkennt die konstante Region des primären Antikörpers und ist somit Spezies-spezifisch. An den Sekundärantikörper ist das Enzym



Peroxydase aus Meerrettich gekoppelt, welches im anschließenden Detektionsverfahren eine photochemische Reaktion katalysiert. Deren Lichtentwicklung schwärzt einen Röntgenfilm an den Positionen eines immunreaktiven Proteins auf der Membran. Nach gründlichem Entfernen überschüssigen Sekundärantikörpers durch vier- bis sechsmaliges Waschen mit TBST wurde die Membran mit der SuperSignal-Detektionslösung 5 Min. behandelt. Die Membran wurde in Haushaltsfolie für verschiedene Zeiten gegen Röntgenfilme exponiert. Die optimale Expositionszeit muss für jeden Western Blot empirisch ermittelt werden. Nach der Detektion lassen sich die Membranen bei 4°C lagern.

### 3.1.15 RNS-Isolierung aus HeLa-Zellen

Die mRNA wurde aus kultivierten HeLa-Zellen mit dem Oligotex direct mRNA-Midi-Kit (QIAGEN) gemäß der Anleitung isoliert.

### 3.1.16 RNS-Gelelektrophorese

Für das Gel wurden 0,45 g Agarose in 23,3 ml H<sub>2</sub>O durch Aufkochen gelöst. Nach Abkühlen auf 60°C wurden 6 ml Laufpuffer (5 x) und 1 ml 37 %iges Formaldehyd dazugegeben und das Gel in einen vorbereiteten Schlitten gegossen. Die RNS wurde in Auftragspuffer (1,75 µl Formaldehyd, 5 µl Formamid, 1 µl Laufpuffer (5 x)) aufgenommen und 5 Min. bei 65°C denaturiert. Nach dreiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Probe auf das Gel geladen. Die Elektrophorese fand bei 100 V statt.

### 3.1.17 Northern Blot

Da RNS mit komplementären RNS- oder DNS-Molekülen Doppelstränge ausbildet, können spezifische RNS-Moleküle mit Hilfe komplementärer, radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen werden. Dazu wird die RNS auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und nach der Hybridisierung mit der Sonde über die Schwärzung eines Röntgenfilms nachgewiesen. Der Transfer kann entweder durch Auftropfen der gelösten RNS auf die Membran erfolgen, wie es im Fall des MTN (Multiple Tissue Northern Blot, Clontech) geschehen ist, oder nach Gelelektrophorese im Vakuumblot-Verfahren auf die Membran übertragen werden, was bei dem Sonden-Test der Fall war.

Dazu wurde die Membran kurz in Methanol geschwenkt und 10 Min. im Transferpuffer gewaschen. Ein Vakuum-Blotter Model 784 (Biorad) wurde so installiert, dass ein konstanter Sog durch das Gel und die Membran entstand. Durch Anlegen eines Vakuums von 50 mbar

für 1½ Stunden wurde die RNS aus dem Gel auf die Membran transferiert, wobei das Gel durch wiederholte Zugabe von Transferpuffer am Einstrocknen gehindert wurde. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran 10 Min. in P-Puffer neutralisiert. Anschließend wurde die RNS durch UV-Bestrahlung (254 nm für 3 Min.) mit der Membran quervernetzt. Der MTN wurde durch 10 Min. Inkubation in P-Puffer für die Hybridisierung vorbereitet.

Die Membranen wurden mit 20 ml DIG-Hybridisierungslösung bei 50°C im Ofen prähybridisiert. In dieser Zeit fand die radioaktive Markierung der Sonde mit dem DecaLabel-DNA-Labeling Kit (MBI/Fermentas) nach Herstellerangaben unter Zugabe von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP statt. Als Matrize wurde die RACK1-cDNS aus dem Plasmid pTARGET-RACK1wt ausgeschnitten und über Agarosegelelektrophorese und Elution aufgereinigt. Von dieser DNS wurden 100 ng als Matrize für die Polymerasereaktion mit dem Klenow-Fragment eingesetzt, die durch Dekanukleotide zufälliger Sequenz an verschiedenen Stellen der RACK1-cDNS gestartet wurden. Durch den Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP wurden die neusynthetisierten DNS-Fragmente radioaktiv markiert. Nach der Reinigung der Sonden-DNS über Sephadex G 25-Säulen wurde die spezifische Aktivität der Sonde bestimmt. Für eine zufriedenstellende Detektion einer RNS wird eine spezifische Sondenaktivität von 10<sup>7</sup> cpm/ $\mu$ g DNS empfohlen (Sambrook et al., 1989). Die hier synthetisierte Sonde hatte eine spezifische Aktivität von 1,1 x 10<sup>7</sup> cpm/ $\mu$ g DNS. Anschließend wurde die Sonde bei 95°C für 10 Min. denaturiert und auf Eis abgekühlt. Für die Hybridisierung wurden 10  $\mu$ l der Sonde, entsprechend 1 x 10<sup>8</sup> cpm, in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht bei 50°C statt.

Zur Detektion der RNS-Signale wurden die Membranen erst zweimal 5 Min. in Waschlösung I (2 x SSC, 0,1 % SDS) bei Raumtemperatur gewaschen und anschließend in Waschlösung II (0,1 x SSC, 0,1 % SDS) 2 x 15 Min. bei 50°C im Ofen inkubiert. Die Membranen wurden in Plastikfolie eingeschweißt und die Signale durch Exposition gegen eine BioImager-Platte detektiert.

## 3.2 Manipulation von *Escherichia coli*

### 3.2.1 Erzeugung elektrokompenter *E.coli*-Bakterien

Durch dieses Verfahren werden die Bakterien so modifiziert, dass sie durch einen elektrischen Puls Plasmid-DNS aufnehmen können. Zunächst wurden 5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur in 500 ml 2 x YT-Medium angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert, bis eine OD<sub>595</sub> von 0,6 erreicht war. Dann wurde die Zellsuspension 10 Min. auf Eis gekühlt und

bei 4°C für 10 Min. bei 6.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 ml HEPES-Lösung (1 mM, pH 7,0) resuspendiert. Die Suspension wurde mit gleichen Parametern zentrifugiert und die Zellen in 125 ml HEPES (1 mM, pH 7,0) resuspendiert. Nach erneutem Pelletieren der Zellen wurden diese in 25 ml einer 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert, bei 4.200 Upm erneut pelletiert und in der dem Zellvolumen entsprechenden Flüssigkeitsmenge 10 %igen Glycerins resuspendiert. Die Suspension wurde in Aliquots von je 100 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert, bis sie zur Elektroporation verwendet wurden

### 3.2.2 Elektroporation von elektrokompetenten *E.coli*-Bakterien

Zur Elektroporation wurden 100 µl elektrokompetente *E.coli*-MH 3 Zellen auf Eis aufgetaut und anschließend mit 5 µl der aus Hefezellen isolierten Genbank-Plasmid-DNS (aus 3.3.3) gemischt. Diese Probe wurde in einer Elektroporationsküvette eine Minute auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Gene Pulser II (BioRad) ein Elektropuls (2,5 kV; 25 mF; 200 ?) appliziert. Direkt im Anschluss wurden die Bakterien in einem Milliliter SOC-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden sie auf 1 x A –Platten (mit Ampicillin; ohne Tryptophan) ausgestrichen und zwei Tage bei 37°C inkubiert.

### 3.2.3 DNS-Transfer in chemisch-kompetente *E. coli*-Bakterien

Das Einbringen von Plasmid-DNS durch die Zellwand geeigneter („kompetenter“) Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Durch Ausplattieren dieser transformierten Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agarplatten erfolgt eine Selektion der Bakterien, die das eingeführte Plasmid besitzen.

Die kompetenten *E. coli*-Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden 50 µl der Bakterien mit 5 µl eines Ligationsansatzes oder 0,1 ng Plasmid-DNS in einem Polypropylen Reaktionsgefäß (für XL1 Blue wird das Falcon 2059 empfohlen, bei den anderen reicht ein Mikroreaktionsgefäß) für 30 Min. auf Eis inkubiert. Darauf folgten die Inkubation des Gemisches in einem Wasserbad (42°C für 45 Sek. bei XL1 Blue; 37°C für 20 Sek. bei DH5α), und das Abkühlen der Bakterien auf Eis für 2 Min. Der Ansatz wurde mit 0,5 ml vorgewärmten LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 225 Upm und 37°C zur Expression des Antibiotika-Resistenzgens inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert und auf Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Einzelne Klone wurden in Flüssigkultur weitervermehrt. Die Plasmid-DNS dieser Klon-Kulturen wurde isoliert (3.2.4) und mittels Restriktionsspaltung und Sequenzierung überprüft.

### 3.2.4 Präparation von DNS

Zur Präparation der Plasmid-DNS wurden Kits der Firma QIAGEN verwendet: Die Plasmidisolierung im kleinen Maßstab erfolgte mit Hilfe des QIAprep 8 Miniprep Kits. Für die Isolierungen größerer Mengen (>500 µg aus 250 ml Bakterienkultur) wurden QIAfilter Plasmid Maxi Kits nach den Angaben des Herstellers verwendet.

### 3.2.5 Bakterielle Expression von rekombinanten Proteinen

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können fremde (z.B. eukaryontische) Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) in Bakterien exprimiert werden. Oft sind solche Fusionsproteine löslich und können nach der Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose (Pharmacia) gereinigt werden.

Von einer Übernachtskultur wurden 50 ml in 450 ml Antibiotika-haltigem LB-Medium angeimpft und zwei Stunden bei 37°C und 225 Upm inkubiert. Anschließend wurde die GST-Fusionsprotein-Expression durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert und die Bakterien weitere zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Bei allen folgenden Schritten wurden die Proben stets bei 4°C oder auf Eis gehalten, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Die Bakterien wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 5.000 Upm (im JA 10-Rotor) pelletiert und in 25 ml eiskaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung (5 x 15 Sek. bei 40 Watt mit einem Branson Sonifier) zerstört. Um die Proteinausbeute zu erhöhen, wurde das Zellhomogenat mit 1 % Triton X 100 für 30 Min. rotierend inkubiert. Bei der anschließenden Zentrifugation (10 Min bei 15.000 Upm im Beckman SS-20 Rotor) wurden die unlöslichen Zellbestandteile von der Proteinlösung abgetrennt. Durch zweistündige Inkubation mit 75 µl Glutathion-Sepharose wurden die GST-Fusionsproteine gebunden und konnten durch Zentrifugation (2.500 Upm bei 4°C) konzentriert und durch mehrmaliges Waschen mit eiskaltem PBS gereinigt werden. Die Proteine wurden in der Sepharose-gebundenen Form in den Experimenten eingesetzt.

### 3.2.6 Kopräzipitationsexperimente

GST-Fusionsproteine, die an Glutathion-Sepharose gebunden sind, können u.a. verwendet werden, um Interaktionen zwischen ihrem Fusionsanteil und Proteinen aus anderen Quellen, z.B. Zellysat oder *in vitro* Proteinsyntheseansätzen, zu untersuchen. Bindet ein Protein an das GST-Fusionsprotein, so können beide über die gebundene Glutathion-Sepharose präzipitiert werden und lassen sich hinterher in einem Proteingel nachweisen.

Zu 10  $\mu$ l Glutathion-Sepharose mit gebundenem GST-Fusionsprotein wurden 100  $\mu$ l Zellysat oder 20  $\mu$ l eines *in vitro*-Proteinsyntheseansatzes gegeben. Die Probe wurde mit 500  $\mu$ l GST-Präzipitationspuffer versetzt und bei 4°C für zwei Stunden bei langsamer Rotation inkubiert. Anschließend wurde die Glutathion-Sepharose pelletiert (für 3 Min. mit 2.000 Upm bei 4°C) und dreimal mit dem GST-Präzipitationspuffer gewaschen. Bei radioaktiven Proben wurden in dem dritten Waschschrift die Mikroreaktionsgefäße gewechselt, um eventuelle Hintergrundsignale durch am Kunststoff haftende Komponenten zu eliminieren. Die Glutathion-Sepharose mit den daran gebundenen Proteinen wurde nach dem letzten Waschschrift und dem gründlichen Entfernen des Waschpuffers in 20  $\mu$ l 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Die Proteine wurden elektrophoretisch aufgetrennt und bei radioaktiven Proben über Autoradiographie detektiert. Bei nicht-radioaktiven Proben fand eine Western-Immunodetektion ( 3.1.14) statt.

### 3.3 Manipulation von Hefezellen

#### 3.3.1 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*:

##### 3.3.1.1 Hocheffizienz-Primär-Transformation für Two Hybrid-Screens

Bei einem Two Hybrid Screen nimmt mit der Zahl getesteter individueller Klone die Wahrscheinlichkeit zu, auch wenig abundante cDNS-Klone zu berücksichtigen. Daher ist bei der Primärtransformation eine sehr gute Effizienz wichtig. Mit der hier verwendeten Methode können bis zu  $2 \times 10^7$  Klone pro  $\mu$ g DNS erzeugt werden (Agatep, 1998).

Die Zellzahl einer Übernachtskultur wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und 50 ml warmes YPAD-Medium mit  $5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft. Die Kultur wurde bei 30°C bei 200 Upm in einem Schüttelbad inkubiert, bis eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet (5 Min. bei 3000 Upm) und in 25 ml sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 100 mM Li-Acetat-Lösung resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden durch kurze Zentrifugation pelletiert und in einem Endvolumen von 0,5 ml in Li-Acetat resuspendiert (entsprechend  $2 \times 10^9$  Zellen/ml). Je 50  $\mu$ l dieser Zellsuspension wurden pro Transformation eingesetzt, indem sie in ein 1,5 ml Mikro-Reaktionsgefäß gegeben und durch kurze Zentrifugation pelletiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und auf das Zellpellet wurden in folgender Reihenfolge gegeben:

- 240 µl PEG 3350 (50 % w/v)
- 36 µl 1 M Li-Acetat
- 25 µl denaturierte Heringssperma DNS
- 50 µl H<sub>2</sub>O mit 1 µg der zu transformierenden Plasmide

Das Gemisch wurde ca. 1 Min. mit dem Vortex-Gerät bis zur Homogenität gemischt. Anschließend inkubierten die Ansätze eine Stunde bei 30°C, gefolgt von einem 20 – 25-minütigen Hitzeschock bei 42°C. Durch kurze Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert und der Transformations-Mix entfernt. Die Zellen wurden in 1 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und auf SC-Platten ausgestrichen. Zur Selektion wurde dabei die Tatsache genutzt, dass der verwendete Hefestamm für verschiedene Aminosäuren auxotroph ist. Jedes transformierte Plasmid ist in der Lage, eine dieser Auxotrophien zu komplementieren. Dadurch lassen sich die gewünschten Klone über spezifische Aminosäure-Mangelmedien selektieren. Nach zwei bis drei Tagen im 30°C-Brutschrank waren Kolonien auf den Platten zu erkennen.

Bei Primär-Transformationen der HeLa-cDNS-Genbibliothek wurden die Hefetransformanten so auf 24 x 24 cm SC (Gluc) *ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>trp<sup>-</sup>*-Platten pro Transformationsansatz ausgestrichen, dass 5 x 10<sup>4</sup> CFU (Colony forming Units) auf jeder Platte wuchsen. Nach zwei Tagen wurden die erfolgreich transformierten Zellen geerntet. Dazu wurden die Platten für 2 Stunden bei 4°C abgekühlt, um den Agar auszuhärten. Danach wurden die Hefekolonien mit einem sterilen Objektträger von den Platten gekratzt und in einem 50 ml-Zentrifugationsröhrchen vereinigt. Nach zweimaligem Waschen in 1 x TE wurden die Zellen in Glycerinlösung aufgenommen und in Aliquots von je 1 ml eingefroren. Diese Aliquots konnten für die Durchführung der Two Hybrid-Screens aufgetaut und auf geeignetes Selektionsmedium ausgestrichen werden.

### 3.3.1.2 Transformation von tiefgefrorenen Hefestämmen

Vergleichbar zu Bakterien lassen sich auch transformationskompetente Hefestämmen tiefgefroren lagern und zur Transformation auftauen (Schiestl et al., 1993). Diese Stämme erreichen allerdings nicht den Kompetenzgrad frisch zubereiteter Kulturen. Zur Konstruktion eines spezifischen Hefestammes ist die Kompetenz aber ausreichend. Der Vorteil liegt darin, dass ein Vorrat kompetenter Stämme bei –70°C gelagert werden kann.

Die Zellen wurden in 500 ml YPAD-Medium mit einer OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,6 – 1,0 kultiviert. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei

5.000 Upm wurden sie in 250 ml der Frost-Lösung 1 resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 10 ml Frost-Lösung 1 resuspendiert. Die Suspension wurde in Portionen von 0,2 ml aliquotiert und langsam eingefroren. Diese Aliquots können bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

Für die Transformation wurde zu 0,2 ml gefrorener kompetenter Hefezellen 1  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNS und 50  $\mu\text{g}$  Heringssperma-DNS gegeben. Der Transformationsansatz wurde aufgetaut, mit 1,4 ml Frost-Lösung 2 versetzt und eine Minute mit dem Vortex-Gerät gemischt. Danach folgte eine einstündige Inkubation der Probe bei  $30^{\circ}\text{C}$ . Mit einem fünf- Sekunden-Zentrifugationsschritt wurden die Hefezellen pelletiert, in 1 ml Frost-Lösung 3 resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation in 50  $\mu\text{l}$  Frost-Lösung 3 aufgenommen. Anschließend wurden sie auf entsprechenden Hefe-Kulturplatten ausgestrichen und nach dem Antrocknen bei  $30^{\circ}\text{C}$  mit der Unterseite nach oben inkubiert, bis Kolonien erkennbar waren – üblicherweise nach zwei Tagen.

### 3.3.2 Parallelanzucht von Hefekolonien auf Kulturplatten mit unterschiedlichen Medien (Replika-Plattieren)

Bei der „interaction trap“ genannten Two Hybrid Screen-Methode werden zum Nachweis einer spezifischen Interaktion zwei unabhängige Galaktose-induzierte Reportergene verwendet. Zur schnellen Untersuchung, ob eine große Anzahl von Klonen beide Reportergene Galaktose-abhängig aktiviert, wird eine Replikplattierung durchgeführt.

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden zunächst in dokumentierter Reihenfolge auf einer Glukoseplatte ausgestrichen und in der Reihenfolge des Auftragens dokumentiert. Bei ausreichender Koloniegröße wurde ein Samtkissen auf den Agar gepresst, so dass Hefen am Gewebe haften blieben. Der so präparierte Kulturstempel wurde dann nacheinander auf zwei Kulturplatten ohne Leucin und auf zwei X-Gal-Platten gepresst, jeweils einmal mit Glukose- und einmal mit Galaktose-haltigem Medium. Da alle vier Platten die Kolonien in der gleichen Anordnung trugen wie die Ursprungsplatte, ließen sich die positiven Klone den Ausgangskulturen zuordnen.

### 3.3.3 Isolierung von Genbank-Plasmid-DNS aus Hefe

Zur Identifizierung eines gefundenen Interaktionspartners muss die für das interagierende Protein kodierende cDNS aus der Hefe isoliert werden. Diese ist in ein pJG4-5-Plasmid integriert. Da die Hefe auch noch das Reportergen-Plasmid und das für den Köder kodierende

Plasmid enthält, ist eine Methode notwendig, mit der selektiv das gesuchte Plasmid isoliert werden kann. Der *E. coli*-Stamm MH 3 weist eine Auxotrophie für Tryptophan auf, die durch das Plasmid pJG 4-5 komplementiert wird. Nach der Transformation der aus *S. cerevisiae* isolierten Plasmide in diesen *E. coli*-Stamm lassen sich die Bakterien mit dem gewünschten Plasmid auf Medium ohne Tryptophan selektieren.

Die zu untersuchenden Hefestämme wurden in Selektionsmedium angeimpft und über Nacht im 30°C Schüttelbad inkubiert. Aus 1,5 ml dieser Übernacht-Kultur wurden die Hefen durch Zentrifugation (5 Sek.) geerntet und in 200 µl Aufbruchpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde mit 100 µl säuregewaschenen Glasperlen und 200 µl Rotiphenol versetzt und 2 Min. mit dem Vortex-Gerät gemischt. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die obere, wässrige Phase abgenommen. Die DNS wurde durch Ethanolfällung gereinigt und in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde sie durch Elektroporation (3.2.1) in *E. coli* MH 3 transformiert.

## 3.4 Virologische Arbeitsmethoden

### 3.4.1 Infektion von Kulturzellen mit Influenza A Virus

Die zu infizierenden Zellen wurden mit PBS gewaschen und dann je nach Versuch mit einer Influenza A Virus-Suspension infiziert, die je nach experimenteller Fragestellung auf eine MOI (multiplicity of infection, Anzahl der infektiösen Einheiten pro Zelle) zwischen 0,001 und 10 eingestellt war. Dazu wurden die Viren in PBS/BA/Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> verdünnt. Die Zellen wurden im 37°C-Brutschrank für 45 Min. inkubiert, wobei alle 15 Min. durch Schwenken der Virussuspension ein Austrocknen der Zellen verhindert wurde. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Medium mit 0,2 % BSA bzw. 0,1 % FCS überschichtet. Bei der Infektion von Zellen in 35 mm-Kulturschalen wurden 300 µl Virussuspension verwendet, nach dem Waschen wurden 2 ml Medium mit 0,1 % FCS auf die Zellen gegeben. Im Falle aller Viren, die sich nicht vom A/WSN/33- oder vom A/KP/Ro/34-Stamm ableiten, wurde dem Infektionsmedium 1 µg/ml Trypsin zur Hämagglutininspaltung zugesetzt. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

### 3.4.2 Virusanzucht im embryonierten Hühnerei

Das klassische System zur Anzucht von Influenzaviren sind 11 Tage alte, embryonierte Hühnereier, in denen sie sich zu hohen Titern in der Allantoismembran replizieren (Barret &



Inglis, 1984). Die Viren werden in die Allantoisflüssigkeit abgegeben und können mit dieser geerntet werden.

Die 11 Tage alten, embryonierten Hühnereier (SPAFAS; Lohmann) wurden im Bereich der Luftblase mit Jodlösung desinfiziert. Die Infektion mit 100 µl der vorbereiteten Virusverdünnungen (in PBS/BA/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) erfolgte mit einer Spritze, deren Kanüle (0,55 x 25 mm) senkrecht und vollständig in die vorher perforierte Eischale eingeführt wurde. Die Öffnung wurde mit Ponal-Klebstoff (Henkel) verschlossen. Die Eier wurden zunächst für 48 Stunden bei 37°C und 60 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert, um eine optimale Virusvermehrung zu garantieren. Anschließend wurden sie über Nacht bei 4°C inkubiert. Dadurch war die Entnahme der Allantoisflüssigkeit ohne Einblutung aus den embryonalen Gefäßen möglich. Die Entnahme erfolgte nach vorsichtiger Öffnung des Eies im Bereich der Luftblase. Die Virussuspension wurde aliquotiert bei -80°C gelagert.

### 3.4.3 Der Hämagglutinationstest (HA-Test)

Influenzaviren haben die Fähigkeit, an Hühner-Erythrozyten zu adsorbieren. Aufgrund der dabei entstehenden Vernetzung der Erythrozyten (Hämagglutination) wird deren Sedimentation am Boden des Reaktionsgefäßes verhindert. Unter Verwendung zunehmender Virusverdünnungen bei gleicher Erythrozytenkonzentration läßt sich die vorhandene Viruskonzentration schnell und einfach abschätzen (Barret & Inglis, 1984).

In eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit V-förmigen Vertiefungen (Greiner) wurden in die ersten Vertiefungen einer Längsreihe 100 µl Virussuspension pipettiert. In die anderen Vertiefungen der entsprechenden Reihen wurden je 50 µl PBS vorgelegt. Ausgehend von der ersten Vertiefung wurde die Virussuspension durch Überführen von jeweils 50 µl in die folgende Schale jeweils um die Hälfte verdünnt. Aus der letzten Vertiefung wurden 50 µl verworfen. In die so bestückten Vertiefungen wurden 50 µl einer 1% Hühner-Erythrozytenlösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 30 Min. auf Eis ließen sich die agglutinierten Proben an der Ausbildung eines gleichmäßigen Niederschlags erkennen. Im Gegensatz dazu präzipitierten die Erythrozyten in Form eines Punktes in der Mitte des Bodens, wenn keine Hämagglutination stattgefunden hatte. Durch Auszählen der Verdünnungsstufen, die noch zu einer Hämagglutination geführt hatten, ließ sich der Virustiter der Ausgangssuspension in Hämagglutinationseinheiten (HAE) ausdrücken. Eine HAE ist definiert als Virusmenge, die 50 % der in einer Schale vorgelegten Erythrozyten agglutinieren kann. Der reziproke Wert der Verdünnung, die gerade noch agglutinierend wirkt, wird als HA-Titer angegeben.

### 3.4.4 Der Plaque-Test

Während der Hämagglutinationstest lediglich Aussagen zum Titer der zur Hämagglutination fähigen Partikel zulässt, wird im Plaque-Test selektiv die Zahl der infektiösen Viruspartikel in PFU (Plaque Forming Units) pro ml bestimmt (Barret & Inglis, 1984). Die Virusplaques lassen sich in einem Zellkulturrasen durch Kristallviolett sichtbar machen, da nur lebende Zellen gefärbt werden. Die durch die Virusinfektion abgestorbenen Zellen bleiben farblos und heben sich als Plaques deutlich vom noch intakten Zellrasen ab.

MDCK II-Zellen wurden in 35 mm-Kulturschalen bei einer Zelldichte von 90 % bis zur Konfluenz zweimal mit PBS gewaschen und mit 250 µl der Virusverdünnungen überschichtet. Üblicherweise wurden Verdünnungen von  $1/10^3$  bis  $1/10^8$  eingesetzt. Während der Inkubationszeit (45 Min. bei Raumtemperatur) wurde das Plaque-Medium für die Überschichtung der infizierten Zellen vorbereitet:

Plaque-Medium:	50 ml 2 x Medium (inkl. 2 x Glutamin, 0,4 % BSA)
	1 ml DEAE Dextran (1 %)
	1 ml NaHCO <sub>3</sub> (5 %)
	22,9 ml H <sub>2</sub> O (steril)
	100 µl TPCK-behandeltes Trypsin (1 µg/µl)
	bei 42°C im Wasserbad bereitgestellt

Geschmolzener Oxoid-Agar (2 % (w/v) in Wasser) wurde auf 50°C bereitgestellt. Der Agar verhindert die Diffusion freigesetzter Viren im Medium.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die infizierten Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Das vorgewärmte Medium wurde mit 25 ml Oxoid-Agar versetzt und vom resultierenden Gemisch wurden jeweils 2 ml pro Vertiefung auf die Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert, nachdem der Agar bei Raumtemperatur erstarrt war. Nach 2 bis 4 Tagen waren die Plaques durch den Agar zu sehen und konnten entweder gestochen oder gefärbt werden.

Beim Stechen werden klonale Viren eines einzelnen Plaques geerntet und stehen für weitere Selektions- bzw. Reinigungsschritte zur Verfügung. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurde der Virus-haltige Agar über einem Plaque ausgestochen und in ein Mikro-Reaktionsgefäß überführt, in dem 500 µl PBS/BA/Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> vorgelegt worden waren. Die im Agar enthaltenen Viren wurden über Nacht bei 4°C eluiert. Zur Bestimmung des Plaque-Titers

wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt. Dazu wurden zwei Milliliter einer Kristallviolett-Lösung auf den Agar gegeben. Am nächsten Tag wird der Agar mit Hilfe eines Spatels entfernt und überschüssiger Farbstoff mit H<sub>2</sub>O ausgewaschen. Die Plaques der einzelnen Schalen werden ausgezählt und zur Berechnung des Virustiters mit der jeweiligen Verdünnungsstufe multipliziert. Die daraus resultierende Anzahl der infektiösen Partikel (PFU) pro ml Virussuspension dient z.B. zur Einstellung einer reproduzierbaren Viruskonzentration für Infektionsversuche, die als M.O.I. angegeben wird.

### 3.4.5 Aufreinigung von Viren durch Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Aufreinigung von Influenza A Viren aus der Allantoisflüssigkeit infizierter Bruteier macht man sich nacheinander zwei Prinzipien zunutze: Zuerst die Fähigkeit der Viren zur Adsorption an Hühnererythrozyten und anschließend die Dichte der Viren für eine Gradientenzentrifugation.

Virushaltige Allantoisflüssigkeit aus 20 Eiern wurde zunächst 15 Min. bei 4.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hühnererythrozytensuspension versetzt (Endkonzentration 1 %) und 15 Min. im Eisbad inkubiert. Durch Zentrifugation mit 4.000 Upm bei 4°C für 15 Min. wurden die Virus-tragenden Erythrozyten konzentriert. Anschließend wurden die Virionen enzymatisch von den Erythrozyten abgelöst. Da die dazu verwendete Test-Neuraminidase (Behring) für ihre Aktivität Ca<sup>2+</sup>-Ionen benötigt, wurden die Erythrozyten nach dem PBS-Waschschritt in 10 ml PBS/Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> resuspendiert, bevor 1 ml Test-Neuraminidase zugegeben wurde. Die Zellen wurden 1 Stunde bei 37°C unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Die Viren wurden durch Pelletieren der Erythrozyten (bei 4.000 Upm und 4°C für 10 Min.) geerntet. Der Erythrozyten-freie, Virus-haltige Überstand wurde in die Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Dazu wurden zwei lineare Gradienten aus je 14 ml einer 20 %igen und einer 50 %igen Saccharoselösung (w/w) gegossen. Beide wurden mit jeweils 9 ml des Eluats überschichtet. In der Ultrazentrifuge wurden die Gradienten 10 Stunden mit 25.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Über einer Faserlichtlampe, die gegen den Boden des Zentrifugenröhrchens gesetzt wurde, konnte die Virusbande aufgrund ihrer höheren optischen Dichte erkannt und mit einer Kanüle geerntet werden. Die Proben wurden vereinigt und im gleichen Volumen PBS verdünnt. Durch eine einstündige Zentrifugation mit 25.000 Upm bei 4°C im SW 28-Rotor (Beckman) ließen sich die Viren pelletieren. Das Pellet wurde über Nacht in 250 µl TBS resuspendiert. Ein anschließender HA-Test ergab eine Konzentration von 2<sup>9</sup> HA-Einheiten/100 µl Suspension. Daraus resultieren ca. 2<sup>12</sup> Einheiten/ml, also 4 x 10<sup>3</sup> Einheiten/ml.

### 3.4.6 Isolierung des M1-Proteins aus aufgereinigten Influenza A Viren

Die hier verwendete Methode ist ursprünglich zur Isolierung der vRNPs beschrieben worden (Baudin et al., 1994). Dabei wird das M1-Protein von den anderen viralen Bestandteilen separiert.

Von der nach Aufreinigung aus infizierten Hühnereiern erhaltenen Virussuspension wurden 200  $\mu$ l in einem Lysepuffer (1 % Triton X-100, 1 mg/ml Lysolecithin, 1,5 mM DTT, 5 mM  $MgCl_2$ , 100 mM KCl, 5 % Glycerin, gepuffert in 10 mM MES-Tris, pH 5,0) aufgenommen. Nach gründlicher Durchmischung wurde der Ansatz für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe durch Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Dazu wurde aus einer 30 %igen und einer 60 %igen Glycerinlösung (beide in 100 mM NaCl, 1 mM DTT und 50 mM Tris-MES, pH 8,0) ein linearer Gradient gegossen und mit einem 20 %igen Glycerinkissen (in 100 mM NaCl, 1 mM DTT und 50 mM Tris-MES, pH 7,4) überschichtet, auf welches das Viruslysate gegeben wurde. In einer zwölfstündigen Zentrifugation bei 25.000 Upm im SW41-Rotor und 4°C wanderten die viralen Bestandteile in Abhängigkeit von ihrer Dichte durch den Gradienten. Der Gradient wurde anschließend fraktioniert. Von den Fraktionen wurden jeweils 5  $\mu$ l mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung analysiert. In den Fraktionen 1, 2 und 12 (Boden) ließ sich das M1-Protein nachgewiesen. Aufgrund der schwachen Banden wurde die M1-Proteinmenge in diesen Fraktionen auf ca. 100 ng/Bande geschätzt, entsprechend war die Konzentration ca. 20 ng/ $\mu$ l. Von der Fraktion 12 wurden 100  $\mu$ l für die M1- Immunpräzipitation eingesetzt.

## 3.5 Zellkulturtechniken

### 3.5.1 Passagieren von Zellen

In dieser Arbeit wurden adhärent wachsende, permanente Zelllinien u.a. zur Virusvermehrung verwendet. Diese werden in neue Kulturgefäße umgesetzt (passagiert), wenn sie einen konfluenten Zellrasen im Kulturgefäß gebildet haben. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37°C im Brutschrank mit 5 %  $CO_2$  gehalten.

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung (pro 75  $cm^2$ -Flasche) im Brutschrank inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Durch Zugabe von 9 ml des entsprechenden Kulturmediums wurde das Trypsin inaktiviert. Je nach Verdünnung wurden unterschiedliche Anteile der Zellsuspension in neue 75  $cm^2$ -Flaschen

überführt, in die zuvor 15 ml des jeweiligen Mediums vorgelegt worden waren. Nach 3–4 Tagen im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> waren sie zu einem dichten Zellrasen zusammengewachsen und wurden erneut passagiert.

Für die verwendeten Zelllinien gelten folgende Kulturbedingungen:

	<b>Medium</b>	<b>Verdünnung bei Passage</b>
MDCK II	MEM	1 : 15
HeLa	D-MEM	1 : 6
293T Zellen	D-MEM	1 : 6

### 3.5.2 Anlegen von Zellstocks

Eukaryontische Zellen lassen sich einfrieren und dauerhaft bei –196°C lagern. Die dafür vorgesehenen Zellen wurden, ausgehend von einer 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche mit einem konfluenten Zellrasen, mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst wie oben beschrieben. Nach Zugabe von dem für diese Zellart spezifischen Medium wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2000 Upm für 3 Min. pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml des spezifischen Mediums mit 10 % DMSO resuspendiert und in zwei Polypropylen-Kryogefäße überführt. Daraus resultierte eine Zelldichte von 5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kryogefäß, was einer 50 %-konfluenten 75 cm<sup>2</sup>-Flasche entspricht. In einer mit 2-Propanol gefüllten Einfrierbox wurden die Zellen durch langsame, kontinuierliche Temperaturniedrigung bis auf –70°C abgekühlt. Anschließend wurden die in den Kryogefäßen gefrorenen Zellen zur Dauerlagerung in den Stickstofftank transferiert. Zur Wiederinkulturnahme wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und direkt anschließend in eine Zellkulturflasche mit entsprechendem Medium überführt. Nach 24 Stunden im begasten 37°C-Brutschrank wurden die Zellen geteilt und weiter passagiert.

### 3.5.3 Transfektion von Zellen

Über die Methode der Transfektion wird DNS in eukaryontische Zellen eingebracht. Das in dieser Arbeit verwendete Transfektionsreagenz LipofectAMIN 2000 besteht aus Liposomen, die mit der zu transferierenden DNS Komplexe bildet. Wenn die Liposomen mit Zellmembranen verschmelzen, wird die DNS in die Zellen geschleust. Als Positivkontrolle wird der Vektor pEGFP-N1 transfiziert, der das Gen für ein Derivat des Grün-fluoreszierenden Proteins trägt. Erfolgreich transfizierte Zellen sind unter UV-Licht über das autofluoreszierende Protein EGFP (enhanced green fluorescent protein) zu identifizieren.

Abweichend vom Hersteller-Protokoll wurden MDCKII-Zellen wie folgt transfiziert:

Für jede Transfektion wurden 4 µg der jeweiligen Plasmid-DNS in einem Endvolumen von 50 µl MEM (ohne Zusätze) aufgenommen. In einem zweiten Gefäß wurden 10 µl LipofectAMIN 2000 in einem Endvolumen von 250 µl MEM (ohne Zusätze) aufgenommen und 5 Min. inkubiert. Anschließend wurden die beiden Lösungen vermischt und 20 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die MDCKII-Zellen durch Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturflasche gelöst und in 10 ml MEM (10 % FCS/ohne Antibiotika) aufgenommen. Durch Zentrifugation bei 800 Upm für 3 Min. bei Raumtemperatur wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 2,5 ml MEM (10 % FCS/ohne Antibiotika) aufgenommen. Für jeden Transfektionsansatz wurden 250 µl dieser Zellsuspension in eine 35 mm-Kulturschale gegeben. Nach Ablauf der 20-minütigen Inkubation wurde das Transfektionsgemisch in 1 ml MEM (10 % FCS/ohne Antibiotika) aufgenommen und mit der Zellsuspension kombiniert. Die Zellen inkubierten anschließend 24 Stunden bei 37°C.

#### 3.5.4 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mittels Mikroskopie

Proteine lassen sich durch spezifische Antikörpern im Zellinneren detektieren. Der Nachweis wird hierbei über Fluoreszenzfarbstoffe geführt, die an Sekundärantikörper gekoppelt sind. Diese Fluoreszenzfarbstoffe strahlen nach Anregung mit UV-Licht eines definierten Spektralbereiches und lassen so unter dem Mikroskop eine Lokalisationsbestimmung der detektierten Proteine in der Zelle zu.

Die transfizierten Zellen wuchsen auf Deckgläschen in Kulturschalen. Die Zellen wurden mit 2,5 % Formaldehydlösung auf den Deckgläschen fixiert und anschließend mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert, um ein Eindringen der Antikörper in die Zellen zu ermöglichen. Die Primärantikörper wurden in PBS/3 % BSA verdünnt, wobei der optimale Verdünnungsgrad für jeden Antikörper empirisch bestimmt werden musste. Von der Antikörperlösung wurden 20 µl auf einem Stück Parafilm vorgelegt. Das Deckgläschen wurde mit der Zellbewachsenen Seite auf die Antikörperlösung gelegt und auf einem Stück feuchtem Filterpapier in einer geschlossenen Kammer waagrecht an einem dunklen Ort gelagert. Nach einstündiger Inkubation wurde der überschüssige Primärantikörper durch Waschen in PBS entfernt, woran sich eine ebenso lange Inkubation mit 20 µl des Sekundärantikörpers anschloss. Dieser war ebenso in PBS/3 % BSA verdünnt worden. Überschüssiger Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit Wasser, um störendes Salz zu entfernen. Die Deckgläschen wurden danach auf einen Objektträger in einen Topfen Mowiollösung gelegt, wodurch die Proben luftdicht

abgeschlossen wurden. Nach dem Aushärten bei 4°C über Nacht wurden die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop (Diaphot 300, Nikon) analysiert. Die Zellfärbungen wurden mit einer Digitalkamera (SPOT-RT, Visitron Systems) dokumentiert.

### 3.5.5 Metabolische Markierung von viralen bzw. zellulären Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Promix

Durch Zugabe von radioaktivem Methionin und Cystein in das Kulturmedium lassen sich Proteine bei ihrer Neusynthese markieren. In der Form des Promix (Fa. Amersham) liegt ein Gemisch der markierten Aminosäuren gebrauchsfertig vor.

Die zu markierenden Zellen wurden zweimal mit PBS (37°C) gewaschen und mit 2 ml des entsprechenden Kulturmediums (ohne Methionin und ohne Cystein) überschichtet. Dem Medium wurden 100 µCi Promix für jede 35 mm Schale zugesetzt und die Zellen im Brutschrank weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 3.5.6 beschrieben geerntet und lysiert.

### 3.5.6 Aufschluss von eukaryontischen Kulturzellen

#### 3.5.6.1 Durch Detergenzien und Ultraschall

Detergenzien zerstören die Zelle durch Auflösen der Membranen. Bei Ultraschallbehandlung werden die Zellen mechanisch zerstört. Eine Kombination beider Methoden ermöglicht eine nahezu vollständige Lyse der zu untersuchenden Zellen. Die Zellen wurden zunächst zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber in 150 µl NET-N (oder RIPA) Puffer vom Boden der 35 mm Zellkulturschale gekratzt. Die Schale wurde mit weiteren 150 µl Net-N gespült, um restliche Zellen abzuräumen. Die Zelllyse wurde durch Ultraschallbehandlung (5 x 15 Sek im Branson Sonifier) vervollständigt. Durch Zentrifugation (14.000 Upm. bei 4°C) wurden die unlöslichen Zelltrümmer abgetrennt. Das geklärte Lysat wurde für Experimente eingesetzt.

#### 3.5.6.2 Homogenisierung im hypotonischen Puffer

Diese Methode findet Anwendung, wenn Detergenzien sich störend auf nachfolgende Experimente auswirken könnten. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in hypotonischen Puffer von der Zellschale gekratzt. Anschließend wurden

die Zellen mit 30 Stößen im Dounce-Homogenisator (mit Pistill Typ B) zerstört und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (14.000 Upm für 10 Min. bei 4°C) vom Lysat abgetrennt.

### 3.5.7 Flotationsanalyse im nicht-linearen Saccharosegradienten

Mit einer Gleichgewichtszentrifugation in einem Stufengradienten können aus einem Zelllysate membranboundene von zytoplasmatischen Proteine getrennt werden (Sanderson et al., 1993). Diese Methode ist aussagekräftiger als eine einfache Pelletierung der Membranfraktion, bei der auch unlösliche Zellbestandteile pelletiert werden. Bei der Flotation wandern die Membran-Fragmente in einem Gradienten nach oben in die Interphase, während unlösliche Proteinaggregate zusammen mit den löslichen Proteinen am Boden des Zentrifugenröhrchens verbleiben.

Die zu untersuchenden Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend im Lysepuffer (10 % (w/w) Saccharose; 10 mM Tris, pH 7,5; 1 mM EDTA; 100 Einheiten Aprotinin/ml) vom Boden der Schale gekratzt. Durch 60 Stöße im Dounce-Homogenisator (Pistill Typ B) wurden die Zellen lysiert. Die Zellkerne wurden durch Zentrifugation (bei 1.000 Upm und 4°C für 4 Min.) entfernt und das postnukleäre Lysat wurde auf eine 60 %ige (w/w) Saccharosekonzentration eingestellt. Das Lysat wurde in einem SW 60 Röhrchen mit 3 ml einer 55 %igen (w/w) Saccharoselösung überschichtet, auf die anschließend bis zur Füllhöhe des Röhrchens eine 10 %ige (w/w) Saccharoselösung geschichtet wurde. Die Proben wurden dann 18 Stunden bei 40.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Dabei wanderten die Membranbestandteile auf Grund ihrer geringeren Dichte in die Interphase zwischen der 55 %igen und der 10 %igen Lösung. Durch Anstechen des Röhrchens am Boden wurde der Gradient in Fraktionen unterteilt. Die Boden- und die Interphase-Fractionen wurden anschließend auf das Vorhandensein verschiedenener Proteine mittels Immunpräzipitation untersucht.

### 3.5.8 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden die Komplexe aus Proteinen und den sie spezifisch erkennenden Antikörpern dadurch gereinigt, dass Antikörper außerdem an Protein A- oder Protein G-Sepharose binden können. Die so entstehenden Komplexe lassen sich durch niedrigtourige Zentrifugation aufreinigen. Die zur Präzipitation notwendige Antikörperkonzentration ist für jeden Antikörper unterschiedlich. Die Affinität der Antikörper für Protein A- oder G-Sepharose ist bei verschiedenen Tierarten und verschiedenen Antikörpersubtypen unterschiedlich (Harlow & Lane, 1988).



Zur Immunpräzipitation wurde zunächst der Antikörper der Wahl mit 500  $\mu$ l Zellysat (entspricht einem Äquivalent von  $5 \times 10^5$  Zellen) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren unspezifischer Präzipitate für 5 Min. bei 13.000 Upm und 4°C wurden 20  $\mu$ l der Protein A- bzw. G- Sepharose-Suspension zu dem Ansatz gegeben. Die Bindekapazität für Antikörper liegt bei ca. 10 – 20 mg IgG-Antikörper pro ml Sepharose. Die Proben wurden zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Immunkomplexe durch dreimaliges Zentrifugieren bei 2.000 Upm für 3 Min. und Waschen im Zellyse-Puffer aufgereinigt. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Pellets zur Analyse durch Gelektrophorese in 20  $\mu$ l 2 x SDS-Ladepuffer oder für Kinasierungsexperimente im entsprechenden Kinasepuffer resuspendiert.

### 3.5.9 Proteinphosphorylierungs-Experimente

#### 3.5.9.1 Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch gereinigte Kinasen

Bakteriell exprimiertes, rekombinantes GST- bzw. GST-M1-Protein wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert (beschrieben in 3.2.5). Für die PKC-Kinasierungsexperimente wurden 10  $\mu$ l GST-M1 tragende Sepharose mit 50  $\mu$ l hypotonischem Puffer versetzt, zu dem 25  $\mu$ g/ml Phosphatidylserin, 2,5  $\mu$ g/ml 1,2-s,n-Diolein, 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP und 35 Milli-Einheiten PKC gegeben wurden. Für die Kinasierung durch die Caseinkinase II wurden 10  $\mu$ l GST-M1-Glutathionsepahrose mit 500 Einheiten CK II in 20  $\mu$ l CK II – Reaktionspuffer und 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP gemischt. Die Ansätze wurden 15 Min. bei 30°C im Schüttelbad inkubiert, anschließend dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen und in jeweils 20  $\mu$ l 2 x SDS-Ladepuffer aufgenommen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zur Kontrolle der eingesetzten Substratmenge mit Coomassie Brillant Blau gefärbt. Nach dem Trocknen wurde die Substratphosphorylierung durch Exposition gegen einen Röntgenfilm bzw. gegen eine BioImager-Platte detektiert.

Bei PKC ist eine Einheit die Menge an Enzym, die 1 nmol Phosphat in 1 Min. auf ein geeignetes Substrat überträgt. Eine Einheit CK II überträgt dagegen 1 pmol Phosphat pro Minute auf ein geeignetes Substrat. Daraus folgt, dass in dem durchgeführten Versuch von der CK II 500 pmol /Minute übertragen werden konnten, von der PKC nur 0,035 nmol = 35 pmol/Minute.

### 3.5.9.2 Phosphorylierung von viralem M1-Protein durch gereinigte Kinasen

M1-Protein aus Influenza A Virus-Partikeln wurde, wie unter 3.4.6 beschrieben, gereinigt und immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe dienten als Substrat für die Kinasierungs-Experimente. Als Kontrolle dienten Immunkomplexe ohne M1-Protein. Die Kinasierungsansätze wurden gemäß 3.5.9.1 durchgeführt.

### 3.5.9.3 Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch MDCKII-Zelllysate

Für die Untersuchung, ob das M1-Protein durch zelluläre Kinaseaktivität phosphoryliert werden kann, wurden 50 µl Zelllysate, das durch Homogenisation im hypotonischen Puffer erzeugt worden war, mit 10 µl immobilisiertem GST-M1 in Anwesenheit von 10 µg/ml Phosphatidylserin, 1 µg/ml Dioleïn, 0,125 mM CaCl<sub>2</sub>, 6,25 mM MgCl<sub>2</sub> [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP bei 30°C für 15 Min. inkubiert. Der PKC-spezifische Inhibitor GF109203X wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst, entsprechend 2,4 mmol/l. Von dieser Stock-Lösung wurde der Inhibitor in 25 mM Tris-HCl, pH 7,0 auf 100 µM verdünnt. In die Kinasierungsansätze wurde diese Inhibitor-Lösung so eingesetzt, dass Endkonzentrationen von 0,1 – 10 µM erreicht wurden. Nach der Durchführung der Kinasierungsexperimente wurden die Ansätze nach dreimaligem Waschen in RIPA-Puffer gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern des M1-Proteins von Influenza A Virus

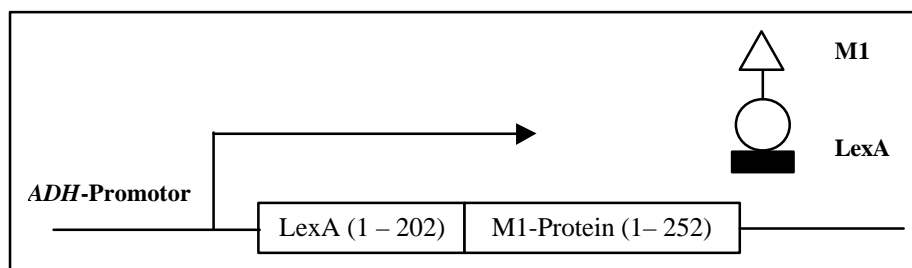
Das M1-Protein ist im Verlauf der Infektion an verschiedenen Prozessen beteiligt. Es gibt Hinweise, dass zumindest ein Teil dieser Prozesse durch die Interaktion des viralen M1-Proteins mit zellulären Komponenten vermittelt oder reguliert wird. Daher ist die zentrale Fragestellung dieser Arbeit, solche zellulären Komponenten zu identifizieren. Dazu wurde ein „interaction trap“ (Interaktions-Falle) genanntes Hefe Two Hybrid System verwendet (Finley & Brent, 1996). Ein wichtiger Vorteil gegenüber dem Einsatz von biochemischen Methoden besteht darin, dass nach der Identifizierung eines Interaktionspartners dessen Proteinsequenz direkt über die Sequenzierung der kodierenden Nukleinsäure ermittelt werden kann.

### 4.2 Der Hefe Two Hybrid Screen als Methode zur Identifizierung Protein-Protein-Interaktionspartnern

Das Hefe-Two Hybrid System ist ein genetischer Test zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen. Das System macht sich die modulare Struktur von Transkriptionsfaktoren zunütze. Viele Transkriptionsfaktoren bestehen im wesentlichen aus zwei unabhängigen Domänen: Die eine vermittelt die Bindung an definierte DNS-Bereiche, die andere bindet die RNS-Polymerase und ermöglicht dadurch den Transkriptionsstart (Hope & Struhl, 1986; Keegan et al., 1986). Die beiden Domänen können die Transkription eines Reportergens auch dann starten, wenn sie unabhängig voneinander an verschiedene Proteine fusioniert sind, die miteinander eine Interaktion eingehen (Fields & Song, 1989). Somit wird die Expression des Reporters zum genetischen Nachweis der Protein-Protein-Interaktion genutzt. Seit der Entwicklung des Two Hybrid Systems von Stanley Fields und seinen Mitarbeitern (Fields & Song, 1989) sind eine Vielzahl von Interaktionspartnern für Proteine durch Genbank-Screening identifiziert worden, z.B. Cyclophilin A und B als Interaktionspartner des HIV-Proteins Gag (Luban et al., 1993).

Zur Durchführung eines Two Hybrid Screens wird zunächst ein Vektor konstruiert, der das Protein, für das ein Interaktionspartner gefunden werden soll, fusioniert an die DNS-bindende Domäne des Transkriptionsfaktors LexA exprimiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die cDNS für das M1-Protein des Influenza A/PR/8/34 Virus in das Plasmid pEG202 so

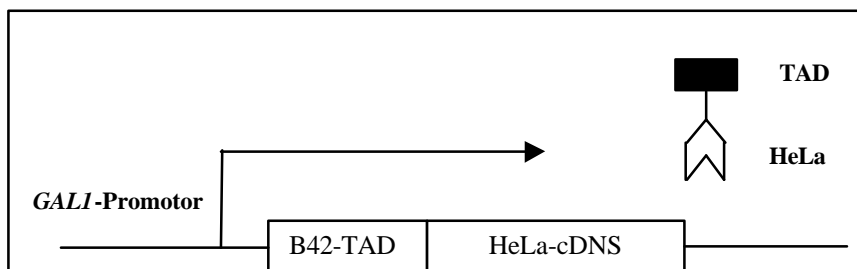
integriert, dass es C-terminal an die Aminosäure 202 der DNS-bindenden Domäne des LexA-Proteins fusioniert wurde. Unter der Kontrolle des *ADH*-Promotors wird das Protein konstitutiv exprimiert (Abbildung 5). Dieses Fusionsprotein wird im folgenden als „Köder“- (engl. „bait-“) Protein und das kodierende Plasmid als plexA-M1 bezeichnet.



**Abbildung 4: Expression des „Köder“-Proteins durch das Plasmid plexA-M1.** Dargestellt ist die Expressionskassette mit der DNS-bindenden Domäne des LexA- und dem Leserahmen des M1-Proteins, sowie eine schematische Darstellung des resultierenden „Köder“-Proteins.

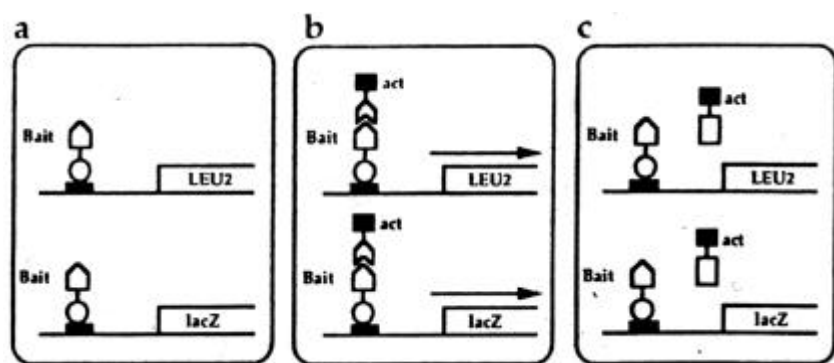
Als Gegenstück zum Köder-Protein wird eine cDNS-Genbibliothek benötigt, die so kloniert ist, dass die Proteine einer Wirtszelle als Fusionsprotein mit der Transkriptions-aktivierenden Domäne (TAD) B42 exprimiert werden (Abb. 6). B42 ist eine zufällig aus Plasmid-DNS identifizierte Sequenz, dessen translatierte Sequenz sauren Charakter besitzt und deshalb transkriptionsaktivierend wirkt (Finley & Brent, 1996). Die in dieser Arbeit verwendete HeLa-cDNS-Genbibliothek war erzeugt worden, indem poly(A)-RNS aus HeLa-Zellen zunächst mit einem Oligo-dT-Primer in cDNS umgeschrieben und nach der anschließenden PCR gerichtet in das Plasmid pJG 4-5 integriert worden war. Die von diesen Plasmiden kodierten Fusionsproteine werden nach Galaktose-Induktion exprimiert. Dadurch können in Glukose-haltigem Medium auch Hefe-Klone vermehrt werden, deren Genbank-Plasmide für toxische Polypeptide kodieren. Die HeLa-cDNS-Genbibliothek wurde von Roger Brent (Boston) zur Verfügung gestellt.

Außerdem wird für einen Two Hybrid Screen ein Hefestamm benötigt, der über ein Reportergen unter der Kontrolle des zu konstituierenden Transkriptionsfaktors verfügt. Die in dieser Arbeit verwendete „Interaktions-Falle“ arbeitet mit zwei Reportergenen: Komplementation einer Leucin-Auxotrophie und Induktion der  $\beta$ -Galaktosidase-Expression.



**Abbildung 5: Expression einer HeLa-cDNS im Plasmid pJG 4-5.** Unter Kontrolle des GAL 1-Promotors wird das Fusionsprotein aus Transkriptions-aktivierender Domäne (TAD) und HeLa-cDNS kodiertem Polypeptid exprimiert (rechts schematisch dargestellt).

Für die Komplementation ist das *LEU2*-Gen unter Kontrolle des *lexA*-Promotors in das Genom des Hefestammes EGY 48 integriert worden. Das *lacZ*-Gen unter *lexA*-Kontrolle ist auf dem Plasmid pSH 18-34 kodiert. Zur Aufspannen der „Interaktions-Falle“ müssen also das Reporter-gen-Plasmid pSH 18-34, das Plasmid plexA-M1 zur Expression des „Köder“-Proteins und die HeLa-cDNS-Genbibliothek in den Hefestamm transformiert werden.



**Abbildung 6: Aktivierung der Reportergene im Selektions-Hefestamm.** Das konstitutiv exprimierte „Köder“-Protein (Bait) bindet an die LexA-Bindestellen der Reportergen-Promotoren. Die von den Genbank-Plasmiden kodierten Fusionsproteine (act) werden nur in Anwesenheit von Galaktose (in b und c) nicht aber von Glukose (a) exprimiert. Die Reportergene werden nur exprimiert, wenn das „Köder“-Protein mit dem Fusionsprotein des Genbank-Plasmids interagiert (b) (Abbildung aus (Finley & Brent, 1996)).

Werden nun das „Köder“-Protein und die HeLa-cDNS-Genbibliothek in Hefezellen exprimiert, so läßt sich eine Interaktion zwischen dem „Köder“ und dem HeLa-cDNS-kodiertem Polypeptid durch eine Aktivierung der Reportergene nachweisen (Abbildung 7, **b**). Eine Aktivierung der Reporter bleibt jedoch aus, wenn Köder und Polypeptid nicht interagieren (Abbildung 7, **c**). Bei Verwendung von glukosehaltigem Medium bleibt die Aktivierung ebenfalls aus, da die Plasmide der Genbibliothek nicht exprimiert werden (Abbildung 7, **a**). Somit läßt sich durch die Aktivität der Reportergene darauf schließen, ob das von der HeLa-cDNS kodierte Polypeptid, das in einem Selektionsstamm exprimiert wird, mit dem „Köder“-Protein interagiert.

## 4.2.1 Vorbereitungen

### 4.2.1.1 Konstruktion eines LexA-M1-Expressionsplasmides

Ausgehend von dem Plasmid pAPR701, in das die gesamte Sequenz des Influenza A Virus M-Segments kloniert worden war, wurde mit den Oligonukleotiden M1 5' und M1-XhoI durch PCR der für das M1-Protein-kodierende DNS-Bereich amplifiziert. Das DNS-Fragment wurde nach Restriktionsverdau in das Plasmid pEG202 ligiert. Dadurch erhielt der Vektor die Kapazität zur Expression der DNS-bindenden Domäne des LexA-Transkriptionsfaktors, an dessen Carboxy-terminalem Ende das M1-Protein fusioniert ist. Die gelungene Klonierung des plexA-M1 wurde zunächst durch Restriktionsverdau und anschließend durch eine Sequenzierung bestätigt.

### 4.2.1.2 Test des „LexA-M1-Expressionsplasmides auf Funktionalität

Das „Köder“-Protein muss mehrere Anforderungen erfüllen, um sich für einen Two Hybrid-Screen zu eignen:

- Es muss stabil exprimiert werden.
- Es muss in den Kern der Hefezelle wandern können.
- Es darf nicht von sich aus die Transkription der Reportergene aktivieren.
- Es darf nicht toxisch für die Hefezellen sein.

Zur Überprüfung der ersten beiden Bedingungen wurde ein Repressionsassay durchgeführt, bei dem die Expression eines Reportergens reprimiert wird, wenn das „Köder“-Protein im Zellkern an LexA-Bindestellen binden kann. Dazu wurde das Testplasmid pJK101 verwendet, das Galaktose-abhängig  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert. Zwischen dem *GALI*-Promotor und einer Expressions-aktivierenden Sequenz (UAS: upstream activating sequence) sind Bindestellen für die DNS-Bindedomäne des LexA-Proteins integriert. Durch dessen Bindung an diese DNS blockiert es die Transkription des Reportergens (Brent & Ptashne, 1984).

Die folgenden Hefestämme wurden durch Transformation der jeweiligen Plasmide in den Hefestamm EGY 48 konstruiert: Der Test-Stamm EGY 48 pJK101/plexA-M1 mit dem Testplasmid und dem Plasmid zur Expression des „Köder“-Proteins, der Stamm EGY 48 pJK101 nur mit dem Testplasmid als Negativkontrolle und der Stamm EGY 48 pJK101/pRFHM 1 mit dem Testplasmid und einem Plasmid zur Expression eines funktionalen LexA-Fusionsproteins als Positivkontrolle.

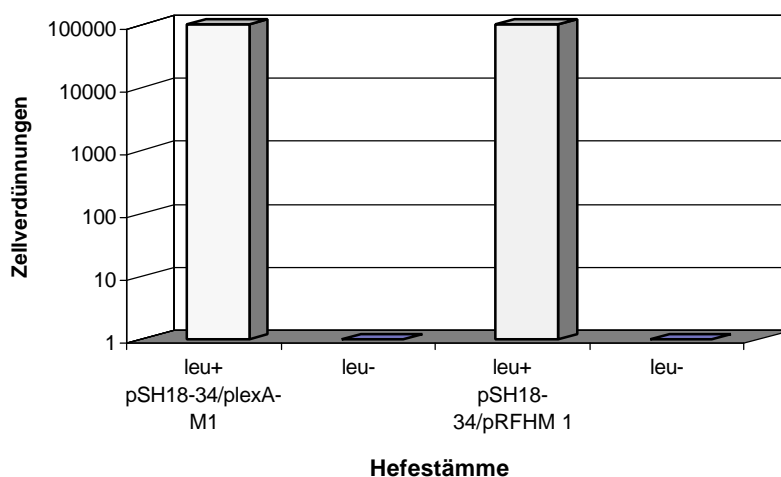
Von den erhaltenen Transformanten wurden je fünf auf eine Galaktose-Mediumplatte mit X-Gal ausgestrichen. Die Negativkontrolle zeigte auf der Galaktose Platte (Gal X-Gal) eine Blaufärbung, die Positivkontrolle blieb weiß. Bei dem LexA-M1-Test wurden im Falle einer Expression des Fusionsproteins und dessen Kernwanderung und DNS-Bindung durch das LexA-M1-Protein ebenfalls weiße Hefekolonien erwartet.

Hefestamm	Inkubationsergebnis	Kommentar
<b>EGY 48 pJK101</b>	blau	Negativkontrolle
<b>EGY 48 pJK101 / plexA-M1</b>	weiß	Test
<b>EGY 48 pJK101 / pRFHM 1</b>	weiß	Positivkontrolle

**Tabelle 2 Auswertung des Repressionstests zur Funktionalität des LexA-M1-Expressionsplasmides.** Durch Transformation der jeweiligen Plasmide wurden die folgenden Hefestämme erzeugt: EGY 48 pJK101, der das Reporterprotein  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, EGY 48 pJK101/plexA-M1 und EGY 48 pJK101/pRFHM 1, das ein funktionales „Köder“-Protein exprimiert. Kolonien der drei Stämme wurden auf Galaktose-haltigem X-Gal-Medium ausgestrichen. Eine Blaufärbung ist nur zu erwarten, wenn das LexA-Fusionsprotein nicht an die lexA-Erkennungssequenz auf dem Plasmid pJK101 bindet.

Die Kolonien des Stammes EGY 48 pJK101/plexA-M1 blieben auf dem Galaktose-haltigen X-Gal Medium weiß. Dadurch wurde die Expression des LexA-M1-Fusionsproteins ebenso wie dessen Bindung an lexA-Erkennungssequenzen auf der DNS im Hefezellkern bestätigt.

Um als „Köder“-Protein geeignet zu sein, darf das LexA-M1-Fusionsprotein die Reporterexpression nicht von sich aus aktivieren. Um dies auszuschließen, wurde der Reporterstamm EGY 48 pSH18-34 nur mit dem Plasmid plexA-M1 transformiert. Parallel wurde ein Kontrollstamm durch Transformation des Plasmids pRFHM 1 erzeugt. Durch dieses Plasmid wird das Reporter-gen nicht aktiviert (Finley & Brent, 1996). Von jedem Stamm wurden vier Klone in Glukose- haltigem SC-Medium ohne Uridin und ohne Histidin (SC(Glu)ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>) 30°C bis zu einer Dichte von etwa  $10^7$  Zellen/ml ( $OD_{600} = 0,5$ ) herangezogen. Von den Zellen wurden Verdünnungsreihen von  $10^0$  bis  $10^{-5}$  in sterilem H<sub>2</sub>O angesetzt. Je 10  $\mu$ l dieser Verdünnungen wurden auf eine SC(Gal/Raf) ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>-Platte (Abbildung 7, leu<sup>+</sup>) und auf eine SC(Gal/Raf)ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>leu<sup>-</sup>-Platte (Abbildung 7, leu<sup>-</sup>) aufgetropft. Die Platten wurden im 30°C-Brutschrank über mehrere Tage beobachtet. Parallel dazu wurden die beiden Stämme auf eine SC(Gal/Raf)ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>-X-Gal-Platte ausgestrichen, um die Expression des lacZ-Gens zu testen (Daten hier nicht gezeigt).



**Abbildung 7: Wachstum des Teststammes EGY 48 pSH18-34/plexA-M1 in Abhängigkeit von Leucin.** Hefezellen der angegebenen Stämme wurden in Verdünnungen von 1:1 bis 1:10.000 auf SC(Gal/Raf)ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>-Platten mit und ohne Leucin (leu<sup>+</sup> bzw. leu<sup>-</sup>) aufgetropft. Nach drei Tagen wurde kontrolliert, bis zu welcher Verdünnung die Zellen auf den jeweiligen Medien gewachsen waren. Dabei diente der Stamm EGY 48 pSH18-34/pRFHM 1 als Positivkontrolle.

Beide Stämme wuchsen auf den SC(Gal/Raf) ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>-Platten bis zur höchsten untersuchten Verdünnung (Abbildung 7, leu<sup>+</sup>). Das „Köder“-Protein ist also nicht toxisch für die Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten sie auf den SC(Gal/Raf)ura<sup>-</sup>his<sup>-</sup>leu<sup>-</sup>-Platten nur in der 1:1 Verdünnung ein schwaches Wachstum (Abbildung 7, leu<sup>-</sup>). Dieses ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass einige langlebige Zellen durch die Inhaltsstoffe abgestorbener Hefen weiterwuchsen. Daraus folgte, dass der Stamm EGY 48 pSH 18-34/plexA-M1 das Reportergen nicht aktiviert und somit auxotroph für Leucin ist. Darüber hinaus fand keine Blaufärbung auf den X-Gal-Platten statt. Das zweite Reportergen wurde ebenfalls nicht aktiviert (Daten nicht gezeigt).

Diese Vorexperimente bewiesen, dass das LexA-M1-Fusionsprotein exprimiert und in den Hefezellkern importiert wird. Dort ist das „Köder“-Protein nicht in der Lage, von sich aus die Expression der Reportergene zu initiieren. Das plexA-M1 Plasmid wurde nun eingesetzt, um zelluläre Interaktionspartner aus einer cDNS-Genbibliothek zu identifizieren.

#### 4.2.2 Erzeugung eines Selektionsstammes

Zur Erzeugung eines Selektionsstammes wurde eine in den Vektor pJG 4-5 integrierte HeLa-cDNS-Genbibliothek in den Hefestamm EGY 48 pSH18-34/plexA-M1 transformiert. Um für einen Two Hybrid Screen eine möglichst große Zahl unabhängiger Klone zu erhalten, sollte



die Effizienz bei dieser Primärtransformation möglichst hoch sein. Es werden mind.  $10^5$  CFU/ $\mu$ g DNS empfohlen (CFU = colony forming units). Bei der ersten Primärtransformation wurde nur eine Effizienz von  $4 \times 10^3$  CFU/ $\mu$ g Plasmid-DNS erreicht. Trotz der geringen Effizienz wurde eine Selektion durchgeführt. Parallel wurde die Transformationseffizienz weiter erhöht, bis eine Transformationseffizienz von  $5 \times 10^5$  CFU/ $\mu$ g Plasmid-DNS erreicht wurde.

Die Kolonien der jeweiligen Primärtransformationen wurden vereinigt und die Zelldichte der Hefesuspensionen bestimmt. Im ersten Fall ergab sich dabei eine Dichte von  $2 \times 10^9$  CFU/ml bei einer Gesamtzahl von  $1,4 \times 10^5$  individuellen Kolonien ( $1 \times 10^4$  Kolonien  $\times$  14 Kulturschalen). Im zweiten Fall wurde eine Zelldichte von  $2 \times 10^8$  CFU/ml bei einer Gesamtzahl von  $1,6 \times 10^6$  individuellen Kolonien bestimmt.

#### 4.2.3 Two Hybrid-Screen: Selektion der Hefestämme, die spezifische Interaktionspartner des M1 Proteins exprimieren

Die hier angewandte Methode zur Selektion der positiven Klone bestand aus drei Schritten:

- Zuerst wurden aus den Primärtransformationen die Zellen isoliert, die auf Galaktosehaltigem Medium ohne Leucin (SC(Gal/Raf)  $ura^- his^- trp^- leu^-$ ) wachsen können.
- Dann wurden diese Klone daraufhin untersucht, ob sie beide Reportergene Galaktoseabhängig aktivieren können.
- Anschließend wurde das Genbibliotheks-Plasmid aus den selektierten Klonen isoliert. Das Genbibliotheks-Plasmid wurde wieder in den Hefestamm EGY48/pSH18-34/plexA-M1 transformiert und erneut auf unabhängige Aktivierung der beiden Reportergene getestet.

Durch dieses Vorgehen können falschpositive Klone ausgeschlossen werden, die z.B. auf Mutationen in einem der Reportergene (oder deren regulativen Elementen) oder die Paralleltransformation eines Hefestammes mit mehreren Genbibliotheks-Plasmiden zurückzuführen sind.

##### 4.2.3.1 Selektion I: Komplementation der Leucin-Auxotrophie

Im ersten Selektionsschritt wurden alle Klone isoliert, die auf Galaktosehaltigem Medium in Abwesenheit von Leucin wachsen können. Da das LEU2-Gen unter der Kontrolle des *lexA*-

Promotors liegt, ist zu erwarten, dass nur solche Klone wachsen, bei denen das LexA-M1 mit dem an die saure Aktivator-domäne fusionierten Polypeptid interagiert. Von jedem Primärtransformationsansatz wurden fünf 150 mm-Kulturschalen mit Galaktose-haltigem Medium ohne Leucin mit jeweils  $1 \times 10^6$  CFU bei 30°C inkubiert. Ausgehend von gleicher Anzahl von Klonen in jeder Kolonie der Primärtransformation, waren damit von jeder der  $1,4 \times 10^5$  individuellen Kolonien der ersten Transformation 36 Klone und von jeder der  $1,6 \times 10^6$  Kolonien der zweiten Transformation ca. 4 Klone auf den Platten vertreten. Durch diese mehrfache rechnerische Überrepräsentation der einzelnen Kolonien wurde das Risiko minimiert, cDNS-Klone, die in der Primärtransformation unterrepräsentiert sind, nicht zu erfassen. Bei der Selektion wurde zur Nummerierung der Klone ein Code aus drei Zahlen verwendet: Die erste (arabische) Ziffer benennt den Tag der Entnahme, die zweite (römische) die Platte, von der ein Klon stammt. Die dritte (wieder arabische) Zahl wurde entsprechend der Anzahl an gepickten Klonen gegeben.

Aus der ersten Selektionsrunde gingen 31 Kolonien der ersten Primärtransformation und 40 Kolonien der zweiten Primärtransformation als positiv hervor.

#### 4.2.3.2 Selektion II: Nachweis der Galaktose-abhängigen Aktivierung der beiden Reportergene

In der zweiten Selektionsrunde wurde untersucht, welche der insgesamt 71 Kolonien beide Reportergene in Abhängigkeit von Galaktose aktivieren konnte. Alle Kolonien wurden zunächst in Glukose-haltigem Medium vermehrt und auf Glukose-haltigen Platten vereinzelt. Von jeder Kolonie wurden vier Klone auf Glukose-haltige Platten umgesetzt. Nach ihrem Anwachsen für zwei Tage bei 30°C wurden sie mittels Replikplattierung auf Platten mit den folgenden Medien ausgebracht:

- Glukose-haltiges Medium ohne Leucin
- Galaktose-haltiges Medium ohne Leucin
- Glukose-haltiges Medium mit X-Gal
- Galaktose-haltiges Medium mit X-Gal

Anschließend wurde untersucht, welche der Klone auf Leucin-freiem Medium Wachstum nur in Abhängigkeit von Galaktose, nicht aber von Glukose zeigten. Wenn diese Klone außerdem auf X-Gal-Medium nur in Galaktose-Abhängigkeit eine Blaufärbung zeigten, wurden sie als positiv betrachtet.

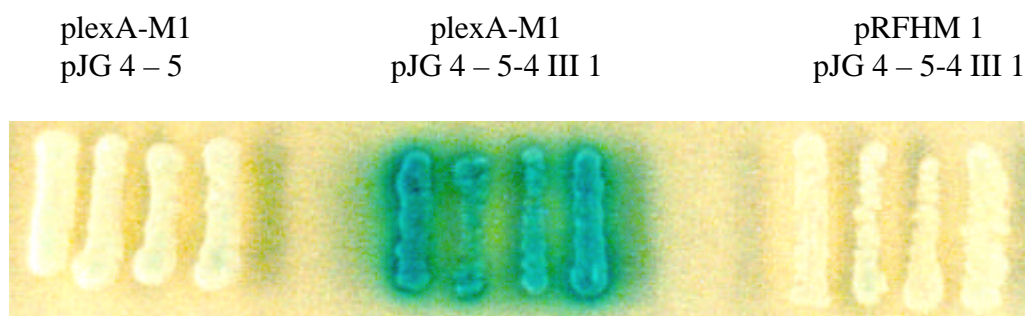
Aus der zweiten Selektionsrunde gingen von den 31 Kandidaten der ersten Primärtransformation 19 als Positive hervor. Von den 40 Kolonien der zweiten Primärtransformation wurden 29 positiv bewertet.

#### 4.2.3.3 Selektion III: Rekonstruktion des Phänotyps durch Rücktransformation der Genbibliotheks-Plasmide in den Hefe-Selektionsstamm

In der dritten Selektionsrunde wird überprüft, ob sich die Aktivierung der Reportergene mit den Genbibliotheks-Plasmiden der positiven Hefe-Kolonien reproduzieren läßt. Dazu wurden die Genbibliotheks-Plasmide der selektierten Klone isoliert und anschließend erneut in den ursprünglichen Hefestamm EGY 48 pSH18-34/plexA-M1 transformiert. Parallel dazu wurden die Plasmide auch in den Hefestamm EGY 48 pSH18-34/pRFHM 1 transformiert, der das Fusionsprotein LexA-Bicoid exprimiert. „Bicoid“ aus *Drosophila melanogaster* wurde hier als Negativkontrolle eingesetzt. Je vier Klone des rekonstruierten Hefestammes und des Kontroll-Hefestammes wurden jeweils auf

- Glukose-haltiges Medium ohne Leucin
- Galaktose-haltiges Medium ohne Leucin
- Glukose-haltiges Medium mit X-Gal
- Galaktose-haltiges Medium mit X-Gal

ausgestrichen. Es galten wieder dieselben Bewertungskriterien, die in Selektion II (4.2.3.2.) beschrieben sind.



**Abbildung 8: Nachweis der Reportergen-Aktivität auf X-Gal-Medium.** Die selektierten Genbank-Plasmide wurden in den Ausgangs-Hefestamm EGY 48 pSH18-34/plexA-M1 und in den Kontrollstamm EGY 48 pSH18-34/pRFHM 1 transformiert. Je vier Klone des Ausgangsstammes, des rekonstruierten Stammes (hier EGY 48 pSH18-34/plexA-M1/pJG4-5 –4 III 1) und des Kontrollstammes mit nicht-spezifischem Köderprotein (EGY 48 pSH18-34 /pRFHM 1/pJG4-5-4 III 1) wurden auf Reportergenaktivität untersucht (hier  $\beta$ -Galaktosidasegen-Expression).

Von den Klonen der ersten Primärtransformation wurden am Ende der dritten Selektionsrunde 10 Klone positiv bewertet. Aus der zweiten Primärtransformation gingen noch einmal 12 Klone hervor. Die in diesen 22 Hefestämmen exprimierten Polypeptide interagierten

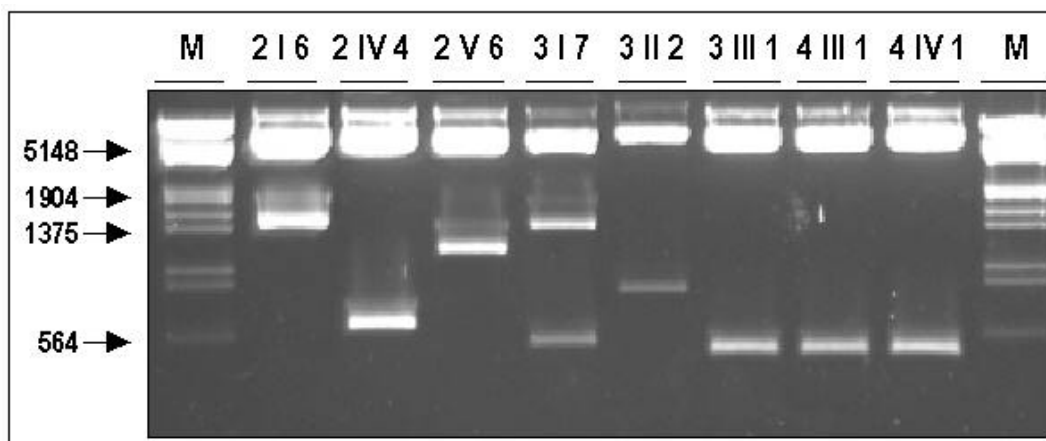
spezifisch mit dem M1-Protein. Der Verlauf der Selektion lässt sich wie folgt zusammenfassen:

	getestete Transformanten	Selektion I	Selektion II	Selektion III
Screen 1	$1,4 \times 10^5$	31	19	10
Screen 2	$1,6 \times 10^6$	40	29	12

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Zwischenschritte des Two Hybrid-Screens.** Angegeben sind die jeweilige Anzahl der Kolonien, die getestet oder am Ende der jeweiligen Selektionsrunde als positiv bewertet worden sind.

#### 4.2.3.4 Analyse der isolierten Klone durch Sequenzierung der entsprechenden cDNS

Die Genbank-Plasmide der 22 positiv bewerteten Hefestämme wurden mit dem Oligonukleotid B 42, AD, das im Bereich der aktivierenden Domäne bindet, und mit dem Oligonukleotid B 42, 3' sequenziert. Dadurch standen die Sequenzinformationen von beiden Enden der cDNS zur Verfügung. Die resultierenden cDNS-Sequenzen wurden über das HUSAR-Programm (Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources) auf der Internet-Homepage des Deutschen Krebsforschungszentrums (dkfz; <http://genome.dkfz-heidelberg.de>) mit den Datenbank-Einträgen verglichen. Dazu wurde das blastn-Programm verwendet. Parallel wurde durch einen Kontrollverdau mit Eco RI/Xho I die Größe der jeweils im Vektor enthaltenen cDNS bestimmt.



**Abbildung 9: Restriktionsverdau einiger Genbank-Plasmide der im Two Hybrid-Screen selektierten Hefestämme.** Aus den selektierten Stämmen wurden die pJG 4-5-Plasmide isoliert und mit den zur Konstruktion der Genbank verwendeten Enzymen Eco RI und Xho I verdaut. Die resultierenden DNS-Fragmente wurden auf einem 1 % Agarosegel aufgetrennt. Die Größen einiger Längenmarkerbanden sind neben den Pfeilen angegeben.

Der Klon 3 III 1 enthielt eine ca. 0,5 kBp lange cDNS (Abbildung 9). Diese kodierte für die carboxyterminalen 141 Aminosäuren des Proteins RACK1, dem Rezeptor der aktivierten Proteinkinase C (Ron et al., 1994). Das RACK1-Protein wurde ursprünglich aus Rattenhirnen über seine Eigenschaft isoliert, die aktivierte Form der PKC zu binden. Das humane Homolog ist auf der Aminosäure-Ebene mit denen der Ratte und des Huhnes identisch (Guillemot et al.,

1989; Ron et al., 1994). RACK1 ist ein 317 Aminosäuren großes Protein, dessen Struktur aus sieben sog. WD Repeat Domänen besteht. WD-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen. Der Klon wurde weiter untersucht.

<b>Bezeichnung des Klons</b>	<b>Ergebnis der Sequenz-Vergleiche (mit Angabe der entsprechenden Zugangsnummer zur Sequenz in der Medline)</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>3 III 1</b>	AS 176 – 317 des <b>RACK 1</b> -Proteins der Ratte (141 AS); <b>M 24194</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>4 III 1</b>	AS 138 – 317 des <b>RACK 1</b> -Proteins der Ratte (179 AS); <b>M 24194</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>4 IV 1</b>	AS 178 – 317 des <b>RACK 1</b> -Proteins der Ratte (129 AS); <b>M 24194</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>5 I 5</b>	AS 188 – 317 des <b>RACK 1</b> -Proteins der Ratte (129 AS); <b>M 24194</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>2 I 6</b>	AS 249- ca. 383 des <b>Striatin</b> der Ratte (130 AS); <b>X 99326</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>2 V 6</b>	AS 97-335 des <b>Striatin</b> der Ratte (238 AS); <b>X 99326</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>2 IV 4</b>	AS 72-198 des hum. <b>Amphiglycan/Syndecan-4</b> (126 AS); <b>X 67016</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>1 II 6</b>	humaner cDNS-Klon 202964 5' (unbekanntes Protein); <b>HS 240201</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>3 II 2</b>	keine Sequenz erhalten	<b>Weiter untersucht</b>
<b>3 I 7</b>	humaner cDNS-Klon 261695 5'; <b>HS 545262</b>	<b>Weiter untersucht</b>
<b>1 III 2</b>	GA-reiche Sequenz mit Homologie zu Alu-Sequenzen	nicht weiter untersucht
<b>1 III 4</b>	hnRNP A1 im verschobenen Leserahmen	nicht weiter untersucht
<b>1 III 5</b>	hnRNP A1 im verschobenen Leserahmen	nicht weiter untersucht
<b>1 III 8</b>	hnRNP A1 im verschobenen Leserahmen,	nicht weiter untersucht
<b>5 V 9</b>	hnRNP A1 im verschobenen Leserahmen	nicht weiter untersucht
<b>4 IV 2</b>	ribosomales Protein L 26 im verschobenen Leserahmen	nicht weiter untersucht
<b>1 II 3</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht
<b>2 II 9</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht
<b>3 I 8</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht
<b>3 II 3</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht
<b>3 II 4</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht
<b>3 II 5</b>	cDNS in 3'-5'- Orientierung	nicht weiter untersucht

**Tabelle 4: Im Two Hybrid-Screen isolierte Genbank-Plasmide mit dem Ergebnis ihrer Sequenzierung.**  
In Fettdruck sind die homologen Proteine mit ihren Genbank-Zugangsnummern angegeben.

Das cDNS-Fragment des Klons 4 III 1 mit einer Länge von ca. 500 Bp (Abbildung 9) enthielt ebenfalls eine RACK1-kodierende Sequenz. Hier umfasste das synthetisierte Polypeptid die Aminosäuren 138 – 317 des RACK1-Proteins. Die Klone 4 IV 1 und 5 I 5 enthielten ebenfalls ca. 500 Bp lange cDNS-Fragmente (Abbildung 9) mit bei beiden Genbank-Plasmiden identischen Sequenz für ein Polypeptid mit den carboxyterminalen 129 Aminosäuren (AS 188 – 317) des RACK1.

Der Klon 2 I 6 enthielt ein cDNS-Fragment von 1,4 kBp Länge (Abbildung 9). Ein Vergleich der Sequenz vom 5'-Ende der cDNS mit den Daten der Genbank ergibt auf der Nukleotid- wie auch auf der Aminosäureebene (Aminosäuren 250 – ca. 383) eine ca. 83 %ige Übereinstimmung mit der kodierenden Sequenz für das Striatin der Ratte (Castets et al., 1996). Striatin war ursprünglich aus Rattengehirnen isoliert worden, wo es in Motorneuronen und im Striatum vorkommt. Es gehört zur Familie der WD-Repeat Proteine und bindet außerdem Calmodulin in Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ . Die Sequenzierung des 3'-Endes der cDNS ergab über

700 Nukleotide eine 95 %ige Identität mit der mRNA des humanen TGF-(transforming growth factor)  $\beta$ -Rezeptors. Da die Hin- und Rücksequenzen der cDNS sich nicht überschneiden, konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die beiden Sequenzen ineinander übergingen. Dieser Klon wurde weiter untersucht.

Der cDNS-Klon 2 V 6 enthielt eine cDNS mit einer Länge von ca. 1,2 kBp (Abbildung 9). Der Sequenzvergleich ergab auf der Nukleotid-Ebene ebenfalls einen hohen Identitätsgrad von über 90 % zur cDNS des Striatin der Ratte. Dieser ließ sich über 700 Nukleotide verfolgen und erreichte auf der Proteinebene beginnend bei der AS 97 über 238 Aminosäuren einen Identitätsgrad von 92 %. Auch dieser Klon wurde weiter getestet.

Die cDNS des Genbankplasmids pJG-2 IV 4 hatte eine Länge von ca. 0,7 kBp (Abbildung 9). Die 5'- und 3'-Sequenzen des Fragments überlappten und so ließ sich in der cDNS durch Vergleich mit der Genbank die kodierende Sequenz des Proteins Amphiglycan (David et al., 1992) ab der Aminosäure 72 bis zum Stop-Signal nach der AS 198 identifizieren. Amphiglycan ist ein Transmembranrezeptor, der auf Lungenepithelzellen sowie auf Fibroblasten exprimiert ist. Das Protein wird auch als Syndecan-4 bezeichnet, da es aufgrund seiner Struktur und Funktion ein Mitglied der Syndecan-Familie darstellt. Daher wird es im folgenden als Syndecan-4 bezeichnet (Woods & Couchman, 1994). Der Interaktionspartner wurde weiter untersucht.

Die im Klon 3 I 7 enthaltene cDNS zerfiel beim Restriktionsverdau in zwei Fragmente von ca. 1,3 bzw. 0,5 kBp Länge (Abbildung 9). Die Sequenzierung ergab eine Ähnlichkeit mit einer nicht näher charakterisierten humanen cDNS. Der Klon wurde weiter untersucht.

Der Klon 3 II 2 enthielt ein ca. 0,7 kBp langes cDNS-Fragment (Abbildung 9). Es ließ sich zunächst in mehreren Versuchen nicht sequenzieren. Trotzdem wurde dieser Klon weiter untersucht.

Das Genbank-Plasmid pJG-1 II 6 enthielt ein cDNS-Segment von ca. 0,9 kBp. Aus der Sequenzierung in der 5'-Richtung ergab sich ein Identitätsgrad von 96 % mit einer EST-Sequenz eines humanen cDNS-Klons. Ein dadurch kodiertes Protein ist bis zu diesem Zeitpunkt noch nicht identifiziert. Dieser Klon wurde weiter untersucht.

Die cDNS im Klon pJG-1 III 2 hatte eine Länge von ca. 0,85 kBp. Die ersten 90 Nukleotide hinter der Eco RI-Schnittstelle bestehen aus einer Abfolge der Nukleotide G und A, die von einer Serie von Thymidinresten gefolgt ist. Die GA-Abfolge kodiert für ein Polypeptid aus sich abwechselnden Arginin- und Glutamatresten. Ein Sequenzvergleich zeigte Ähnlichkeiten zu den sog. Alu-Sequenzen auf. Dabei handelt es sich um nicht-kodierende Bereiche des Erbgutes. Der Klon wurde nicht weiter untersucht.

Der Klon pJG-1 III 4 enthielt eine cDNS von ca. 0,8 kBp. Der Sequenzvergleich ergab auf der Nukleotid-Ebene eine Homologie zum heterogenen nukleären Ribonukleoprotein A1 (hnRNPA1). Allerdings war der Leseraster der cDNS bei der Integration in das Genbank-Plasmid verschoben worden, so dass nur ein Polypeptid von 52 Aminosäuren synthetisiert wurde. Die cDNS-Sequenzen der Genbank-Plasmide pJG-1 III 5, pJG-1 III 8 (beide ca. 0,8 kBp) und pJG-5 V 9 (0,75 kBp) hatten ebenfalls eine Sequenzähnlichkeit mit dem hnRNPA1 bei verschobenen Leseraster. Dadurch kodierten sie für Polypeptide von 57, 49 bzw. 42 AS Länge. Die 42 Aminosäuren des kürzesten Polypeptids (5 V 9), die sich auch am C-Terminus der anderen drei Klone finden, zeigten im Protein-Datenbank-Vergleich über das Programm „blastp“ keine signifikante Ähnlichkeit mit bekannten Proteinen. Diese vier Genbank-Plasmide wurden nicht weiter untersucht.

Das Genbank-Plasmid pJG-4 IV 2 enthielt eine cDNS von ca. 0,8 kBp Länge. Der Sequenzvergleich ergab einen hohen Identitätsgrad zur mRNA des ribosomalen Proteins L 26, allerdings war auch hier der Leseraster bei der Integration der cDNS verschoben worden. Das dadurch exprimierte Polypeptid umfasste 84 AS. Ein Vergleich der Sequenz mit den Gen-Datenbank-Einträgen zeigte keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen. Dieser Klon wurde nicht weiter untersucht.

Der Klon pJG-1 II 3 enthielt ein ca. 1 kBp langes cDNS-Fragment. Aus dessen Sequenzierung in Leserichtung ergab sich, dass kurz hinter der Eco RI- Schnittstelle eine Xho I Stelle lag, die von einer Thymin-reichen Region gefolgt wurde. Daraus wurde gefolgert, dass in diesem Klon eine cDNS in der falschen Orientierung vorlag. Die Sequenzen der Genbank-Plasmide pJG-1 II 9 (zwei Fragmente von 250 und ca. 100 Bp), pJG-3 I 8 (0,3 kBp) pJG-3 II 3, pJG-3 II 4 und pJG-3 II 5 zeigten einen vergleichbaren Aufbau und wurden deshalb ebenfalls als cDNS in verkehrter Orientierung angesehen. Diese Klone wurden nicht weiter untersucht.

Nach der Sequenzierung wurden von den 22 Klonen, die im Two Hybrid-Screen als Interaktionspartner des M1-Proteins identifiziert worden waren, 12 Klone von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen, weil sie eine Verschiebung oder eine umgedrehte Orientierung des Leserasters der integrierten cDNS aufwiesen. Die cDNS-Sequenzen der anderen 10 Genbank-Plasmide wurden weiter untersucht.

### 4.3 Biochemische Bestätigung der genetisch gefundenen Interaktion

Im Two Hybrid-System wird eine Protein-Protein-Interaktion indirekt durch eine Reportergenaktivierung nachgewiesen. Zur Bestätigung dieser Interaktion muss die direkte Bindung der beiden Proteine biochemisch nachgewiesen werden. Dazu wurde hier ein *in vitro* Kopräzipitationsansatz gewählt, bei dem die M1-Interaktionspartner an das Protein Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert und exprimiert werden. GST dient zur Affinitätsreinigung der Fusionsproteine durch Glutathion-Sepharose. Zum Nachweis einer direkten Bindung an den Interaktionspartner muss das M1-Protein spezifisch mit den untersuchten GST-Fusionsproteinen, nicht aber von GST präzipitiert werden.

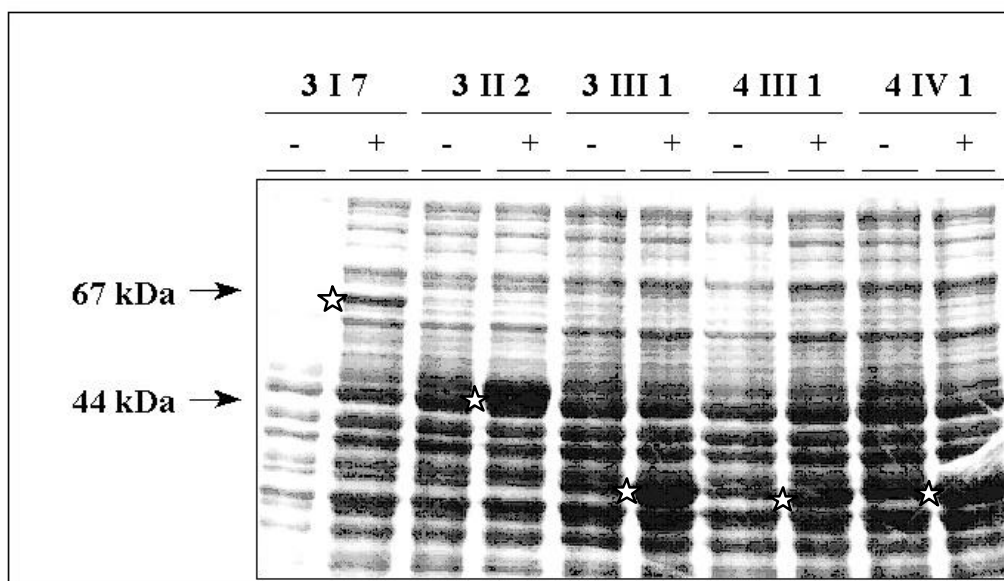
#### 4.3.1.1 Konstruktion der GST-Expressionsvektoren

Die cDNS-Fragmente, die für die M1-interagierenden Proteine kodieren, wurden zunächst über einen Eco RI/Xho I- Verdau aus dem pJG 4-5 Vektor ausgeschnitten und in den Vektor pGEX 5x-1 integriert. Nachdem die gelungenen Integrationen über Sequenzierung bestätigt worden waren, wurde untersucht, ob die Fusionsproteine stabil exprimiert werden. Die Plasmide wurden dazu in den *E.coli*-Stamm BL 26 transformiert. Die Synthese der erwarteten Fusionsproteine nach Induktion der Expression mit 1 mM IPTG wurde im SDS-Polyacrylamidgel überprüft. Nach einer Coomassie-Brillant-Blau-Färbung wurde das induzierte Fusionsprotein durch den Vergleich des Proteinbandenmusters mit dem einer nicht-infizierten Kultur identifiziert.

Die ca. 0,5 kbp langen cDNS-Moleküle der RACK1 Klone wurden in das Plasmid pGEX 5x-1 integriert. Die entstandenen Expressionskonstrukte wurden pGST-3 III 1, pGST-4 III 1 und pGST-4 IV 1 genannt. Für das GST-3 III 1-Protein wurde eine Größe von ca. 40 kDa erwartet, da die 141 Aminosäuren des RACK1-Polypeptids ungefähr 15 kDa entsprechen, zu denen noch die 25 kDa des GST-Fusionsanteils zu rechnen sind. Ein entsprechendes Protein ließ sich im Coomassie-gefärbten Gel nachweisen (Abbildung 10, Spur3 III 1 +). Das Fusionsprotein GST-4 III 1 enthielt 179 Aminosäuren des RACK1-Proteins, entsprechend ca.



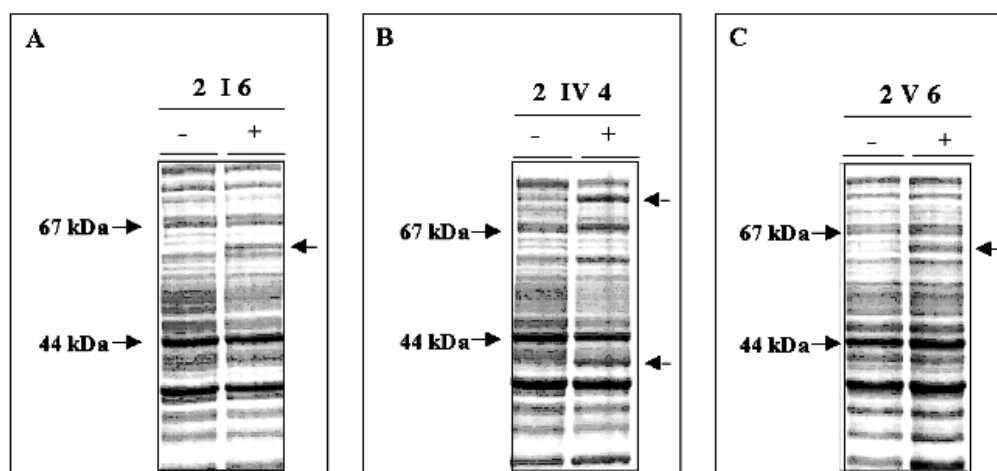
20 kDa, wodurch sich die errechnete Größe des Proteins von ca. 45 kDa ergab. Nach der Induktion ließ sich ein ca. 40 kDa-Polypeptid nachweisen (Abbildung 10 Spur 4 III 1 +). Die cDNS 4 IV 1 kodierte für 129 Aminosäuren mit ca. 14 kDa. Daraus ergab sich für das Fusionsprotein GST-4 IV 1 ein kalkulierte Größe von 39 kDa. Im Coomassie-gefärbten SDS-Proteingel ließ sich nach der Induktion dieses Polypeptid nachweisen (Abbildung 10, Spur 4 IV 1 +). Die induzierten Proteine sind mit Sternen markiert.



**Abbildung 10: Expression der GST-Fusionsproteine mit den cDNS-Sequenzen der im zweiten Two Hybrid Screen isolierten Genbank-Plasmide.** Bakterienkulturen mit den Expressions-Plasmiden für die Fusionsproteine GST-3 I 7, -3 II 2, -3 III 1, -4 III 1 und -4 IV 1 wurden mit 1 mM IPTG induziert (+) und zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Pelletierung wurden die Bakterien in 2 x SDS-Ladepuffer lysiert. Die Proteine wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Parallel dazu wurden Proben von nicht-induzierten Kulturen (-) als Vergleich aufgetragen. Die induzierten Polypeptide sind mit Sternen markiert. Die Punkte markieren die Positionen der 67 kDa- und 44 kDa- Längenmarker.

Die cDNS des Klons 3 I 7 zerfiel nach dem Restriktionsverdau mit Eco RI /Xho I in zwei Fragmente von 1,3 und 0,5 kDa Länge. Die cDNS wurde durch partiellen Verdau aus dem Plasmid ausgeschnitten und in das bakterielle Expressionsplasmid integriert. Der so erzeugte Vektor wurde pGST-3 I 7 genannt. Der Sequenzvergleich der cDNS hatte eine Homologie zu einer humanen cDNS für ein bisher nicht identifiziertes Protein ergeben. Von einer 1,8 kbp langen DNS könnte ein bis zu 600 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer Masse von ca. 66 kDa kodiert sein. Zusammen mit dem GST-Fusionsanteil ergäbe sich ein Protein von bis zu 91 kDa. Nach der IPTG-Induktion ließ sich im Proteingel ein ca. 67 kDa-Protein nachweisen (Abbildung 10), was auf einen offenen Leseraster schließen ließ, der für 380 Aminosäuren kodiert.

Durch Integration der cDNS des Klons 3 II 2 in den bakteriellen Expressionsvektor wurde das Plasmid pGST-3 II 2 erzeugt. Die unbekannte Sequenz der 0,7 kBp langen cDNS könnte maximal 233 Aminosäuren kodieren. Das resultierende GST-Fusionsprotein könnte somit eine Größe von bis zu 50 kDa erreichen. Nach der Transformation des Vektors in Bakterien und deren Induktion mit IPTG ließ sich ein 44 kDa großes Protein nachweisen (Abbildung 10). Daraus ließ sich auf einen offenen Leserahmen mit einer Kodierungskapazität von ca. 170 Aminosäuren schließen.



**Abbildung 11: Expression der GST-Fusionsproteine mit den cDNS-Sequenzen der im ersten Two Hybrid Screen isolierten Genbank-Plasmide.** Die cDNS-Fragmente der im ersten Two Hybrid Screen isolierten Genbank-Plasmide wurden in das Plasmid pGEX 5x-1 integriert. *E.coli*-BL 26 Kulturen mit diesen Expressionsvektoren wurden mit 1 mM IPTG induziert und zwei Stunden bei 37°C im Schüttler inkubiert. Aliquots der lysierten Bakterien vor (-) und nach (+) der Induktion wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Durch Pfeile sind auf der linken Seite die Positionen der Längenmarker und auf der rechten die der induzierten Proteine markiert. Die exprimierten GST-Fusionsproteine enthalten die cDNS-Fragmente der Proteine Striatin (A und C) und Syndecan-4 (B).

Der Vektor pJG-2 I 6 enthielt ein cDNS-Fragment von 1,4 kBp Länge, das nach Eco RI/Xho I-Verdau in den Expressionsvektor integriert wurde, wodurch das Plasmid pGST-2 I 6 entstand. Aus der Gelanalyse ergab sich, dass in den IPTG-induzierten Zellen ein 60 kDa-Protein synthetisiert wurde (Abbildung 11, A), das in der nicht-induzierten Kontrollspur fehlte. Der GST-Anteil des Fusionsproteins umfasst ca. 25 kDa, so dass der Striatin-Anteil etwa 35 kDa ausmacht. Werden für jede Aminosäure eines Polypeptids ca. 110 Da veranschlagt, entspricht das ca. 318 Aminosäuren. Der Sequenzvergleich hatte ergeben, dass der Striatin-Leserahmen ab der Aminosäure 250 in der Sequenz enthalten war. Demnach wären die Aminosäuren 250 bis 568 des Striatins exprimierbar. Das Striatin der Ratte umfasst 780 AS. Da die 3'-Sequenzierung für die letzten 700 Basenpaare eine Sequenz mit hohem Identitätsgrad für den Transforming Growth Factor  $\beta$  ergeben hatte und die Sequenzierung nicht den gesamten cDNS-Bereich abgedeckt hatte, kann allerdings keine sichere Aussage über den C-terminalen Bereich des Fusionsproteins getroffen werden.

Durch Integration der 1,2 kBp-cDNS des anderen Striatinklons in den Expressionsvektor entstand das Konstrukt pGST-2 V 6. Diese cDNS kodiert für das Striatin-Protein ab der Aminosäure 97. Nach IPTG-Induktion wurde von diesem Klon ebenfalls ein ca. 60 kDa-Protein synthetisiert (Abbildung 11, C). Abzüglich der 25 kDa des GST ergibt sich auch bei 35 kDa die Kapazität für ca. 318 Aminosäuren von AS 97 – ca. 415. Daraus folgt für die beiden Striatin-Klone ein überlappender Bereich der Aminosäuren 250 – ca. 415.

Die cDNS des Syndecan-4-Klons hat eine Kodierungskapazität für die 126 carboxyterminalen Aminosäuren (von 72 bis 198). Das entspricht einer Polypeptidkette von ca. 14 kDa, die zusammen mit dem GST-Anteil ein 39 kDa großes Fusions-Protein ermöglichen. Die Syndecan-4-cDNS wurde in den bakteriellen Expressionsvektor integriert. Der so entstandene Vektor pGST-2 IV 4 wurde in Bakterien transformiert. Nach IPTG-Induktion ließ sich im Coomassie-gefärbten SDS-Gel das postulierte 39 kDa-Protein nachweisen, allerdings wurde auch ein Polypeptid von ca. 80 kDa exprimiert (Abbildung 11, B). Dabei könnte es sich um ein SDS-stabiles Dimer handeln. Die Ausbildung derartiger Dimere ist für Syndecan-4 beschrieben worden (zusammengefasst in (Carey, 1997)).

Die 0,9 kBp lange cDNS des Klons pJG-1 II 6 hat eine Kodierungskapazität für ca. 300 Aminosäuren mit einer Masse von ca. 33 kDa. Nach ihrer Integration in den Expressionsvektor folgte daraus für das Konstrukt pGST-1 II 6 die Möglichkeit, ein Protein von maximal 58 kDa zu exprimieren. Nachweisen ließ sich nach IPTG-Induktion im Lysat der entsprechend exprimierten Bakterien jedoch nur ein ca. 25 kDa-Protein. Da diese Größe dem GST-Anteil des Fusionsproteins entspricht, wurde gefolgert, dass das Fusionsprotein nicht stabil exprimiert wurde. Allerdings war die Integration des cDNS-Fragments in das Plasmid nicht durch eine Sequenzierung bestätigt worden, so dass ein Fehler bei der Klonierung nicht ausgeschlossen werden konnte. Dieser Klon wurde nicht weiter untersucht.

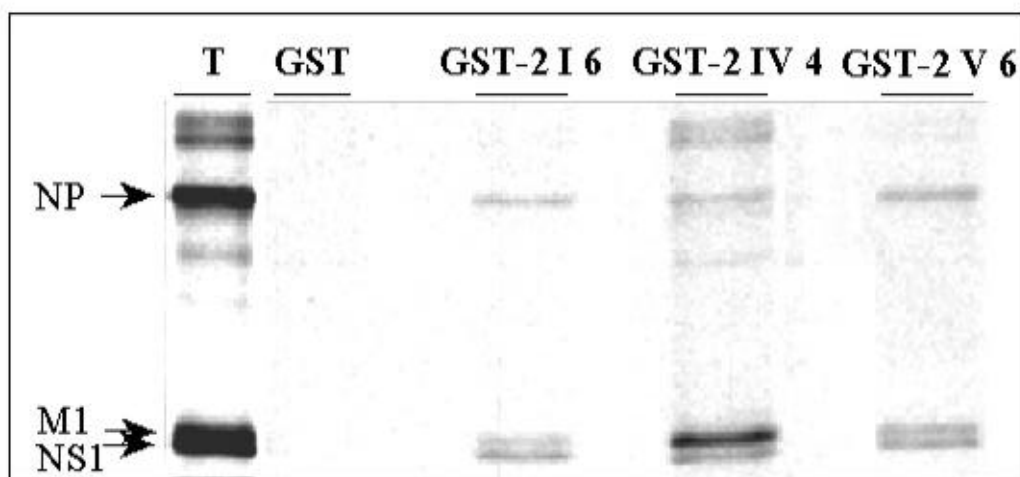
#### 4.3.1.2 In vitro-Kopräzipitationsansätze

Zum Nachweis der Interaktion der bakteriell exprimierten Fusionsproteine mit dem M1-Protein wurde das M1-Protein in seiner nativen Form eingesetzt. Dazu wurden MDCKII-Zellen mit Influenza A Virus infiziert und zum späten Zeitpunkt der Infektion, wenn das M1-Protein in großer Menge synthetisiert wird, in Net-N Puffer und mit Ultraschall lysiert. Um das M1-Protein in den Präzipitationsansätzen direkt nachweisen zu können, waren die Zellen

vor der Lyse zwei Stunden mit  $^{35}\text{S}$ -Promix metabolisch markiert worden. Auf den Gelen wurde zur Kontrolle Lysat von Virus-infizierten bzw. Mock-infizierten Zellen aufgetrennt (Abbildung 13 und Abbildung 14, Bahnen mit der Kennzeichnung T). Diese Spuren dienen der Zuordnung der präzipitierten Proteine. In den Lysaten der infizierten Zellen waren nach Gelelektrophorese hauptsächlich drei virale Proteine nachweisbar: das M1-Protein mit einer Größe von 27,5 kDa (M1), unterhalb davon das NS1-Protein mit ca. 26 kDa (NS1) und deutlich höher das NP-Protein mit einer Masse von 56 kDa (NP). Oberhalb des NP war noch eine virusspezifische Doppelbande zu erkennen, die eine Größe von ca. 70 bis 77 kDa aufwies. Aufgrund ihrer Größe wurde angenommen, dass es sich um unterschiedlich glykosylierte Formen des noch ungespaltenen Hämagglutinins (HA) handelte. Das HA hat mit ca. 560 Aminosäuren ein kalkuliertes Molekulargewicht von 62 kDa. Die Kopräzipitationsansätze wurden bei geringer Stringenz (d.h. 0,05 % Triton X-100) durchgeführt und gewaschen. Nach der Elektrophorese wurden die an die GST-Fusionsproteine gebundenen Komponenten der Zelllysate mittels Autoradiographie detektiert. GST-Protein (Abbildung 13 und Abbildung 14, Spuren mit der Kennzeichnung GST) ohne Fusionsanteil diente als Kontrolle der Spezifität der gefundenen Interaktion. Radioaktiv markiertes Lysat aus Mock-infizierten Zellen diente als Kontrolle der Virus-Spezifität der präzipitierten Komponenten.

#### 4.3.1.2.1 Interaktion der Klone des ersten Two Hybrid Screens mit viralen Proteinen im Kopräzipitationsassay

Zunächst wurden zwei Klone mit Homologie zum Striatin der Ratte (2 I 6 und 2 V 6) und einer mit Homologie zum Syndecan-4 (2 IV 4) getestet. Das GST-Syndecan-4-Fusionsprotein präzipitierte aus dem Lysat von infizierten Zellen das M1-Protein (Abbildung 13, Spur GST-2 IV 4). In geringerem Maße wurden auch das NS1- und das NP-Protein präzipitiert, was auf eine Interaktion des präzipitierten M1-Proteins mit viralen Bestandteilen wie den vRNPs zurückzuführen sein könnte. Dagegen konnte nur eine schwache Kopräzipitation von GST-2 I 6 und GST-2 V 6 mit dem M1-Protein und in etwa gleichem Maße mit den anderen viralen Komponenten NS1 und NP beobachtet werden (Abbildung 13, Spuren GST-2 I 6 und GST-2 V 6).



**Abbildung 12: Test der im ersten Two Hybrid Screen gefundenen Klone auf Interaktion mit dem viralen M1-Protein im GST-Kopräzipitationsassay.** Die cDNS der Klone wurden als GST-Fusionsproteine bakteriell exprimiert und diese durch Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt. Diese Matrix wurde mit dem Lysat radioaktiv markierter Zellen, die mit Influenza A Virus-infiziert worden waren, inkubiert. An GST-Fusionsproteine gebundene Proteine ließen sich nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel mittels Autoradiographie nachweisen. An die Glutathion-Sepharose waren das nicht-fusionierte GST (Spur GST), die Striatin-Fusions-Proteine (Spuren GST-2 I 6 und GST-2 V 6) bzw. das GST-Syndecan-4-Fusionsprotein (Spur GST-2 IV 4) gekoppelt worden. Parallel wurden 5 % des in die GST-Kopräzipitationsansätze eingesetzten Zelllysats mit aufgetrennt (Spur T). Am linken Rand sind das Nukleoprotein (NP), das Matrixprotein (M1) und das NS1-Protein (NS1) mit Pfeilen markiert.

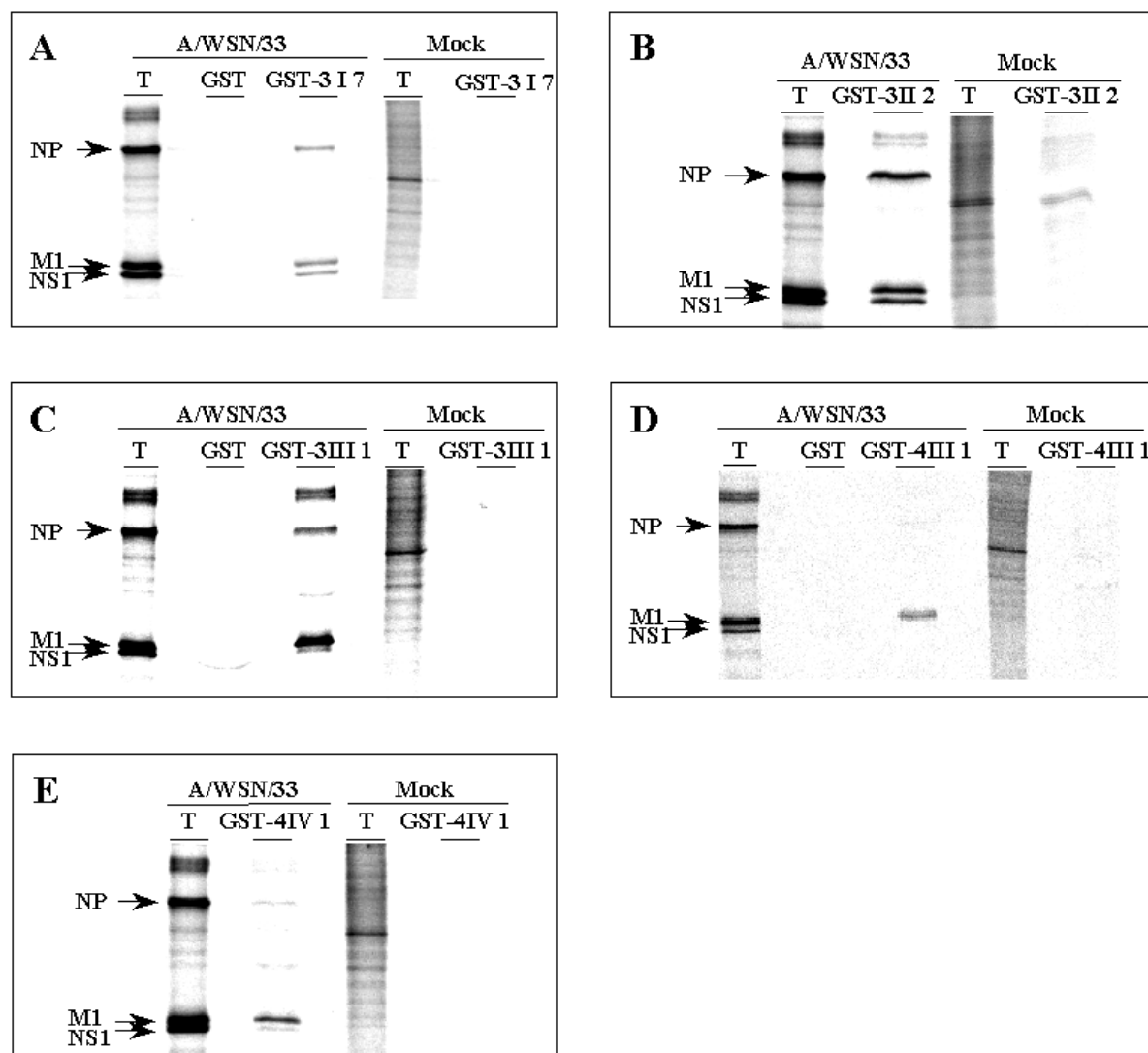
In der Kontrollpräzipitation mit GST allein ließen sich keine viralen Proteine detektieren. Daraus folgte, dass die Proteine in den Bahnen der einzelnen Präzipitationsansätze auf spezifische Interaktionen mit den Fusionsanteilen zurückzuführen waren und nicht auf unspezifische Bindung an das GST oder die Glutathion-Sepharose.

#### 4.3.1.2.2 Interaktion der Klone des zweiten Two Hybrid Screens mit viralen Proteinen im Kopräzipitationsassay

Es wurden fünf Klone getestet, von denen drei für unterschiedlich lange, carboxyterminale Anteile des RACK1-Proteins kodieren (3 III 1, 4 III 1 und 4 IV 1). Der Klon 3 I 7 zeigte einen hohen Identitätsgrad zu einer noch nicht näher spezifizierten humanen mRNA. Bei einem Klon (3 II 2) war bis zu diesem Zeitpunkt noch keine Sequenzbestimmung gelungen.

Die cDNS des Genbank-Plasmids pJG-3 I 7 wurde als GST-Fusionsprotein exprimiert und mit Lysaten aus infizierten (A/WSN/33) bzw. Mock-infizierten (Mock) Zellen inkubiert. Die Autoradiographie (Abbildung 13, A) ergab nur eine schwache Kopräzipitation der viralen Proteine M1, NS1 und NP mit GST-3 I 7. Das GST-Protein ohne Fusionsanteil (GST) präzipitierte unter gleichen Bedingungen keine viralen Komponenten. Die Inkubation des Fusionsproteins mit Mock-infiziertem Lysat führte ebenfalls zu keiner Proteinfällung.

Das Fusionsprotein des Klon GST-3 II 2 präzipitierte aus dem Influenza A Virus-infizierten Zelllysate die Proteine M1, NS1 und NP zu etwa gleichen Teilen (Abbildung 13, B). Darüber hinaus wurde auch das HA nachgewiesen. Da das Fusionsprotein auch aus dem Mock-infizierten Zelllysate ein ca. 45 kDa großes Protein präzipitierte, wurde angenommen, dass das noch unbekannte Protein eine starke Affinität zu unterschiedlichen Proteinen hat und nicht spezifisch mit dem M1-Protein interagiert.



**Abbildung 13: Test der im zweiten Two Hybrid Screen gefundenen Klone auf direkte Interaktion mit dem M1-Protein des Influenza A Virus im GST-Kopräzipitationsansatz.** Die bakteriell exprimierte GST-Fusionsproteine wurden an Glutathion-Sepharose gebunden und aufgereinigt. Anschließend wurden sie mit dem radioaktiv markierten Lysat von Influenza A Virus- (Spuren A/WSN/33) oder mock- (Spuren Mock) infizierten Zellen inkubiert. Die nach dem anschließenden Waschen an der Sepharose verbliebenen Proteine wurden in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Ein Äquivalent von 5 % der eingesetzten Lysate wurde parallel aufgetrennt (Spuren T). Die Positionen der viralen Proteine NP, M1 und NS1 sind durch Pfeile angezeigt. Bei den untersuchten GST-Fusionsproteinen handelt es sich bei A) GST-3 I 7 um das Polypeptid einer noch nicht spezifizierten humanen cDNS. B) Die Sequenz des GST-3 II 2 – Fusionsanteil war nicht ermittelt worden. Bei C) GST-3 III 1, D) GST-4 III 1 und E) GST-4 IV 1 handelt es sich um C-terminale Bereiche des RACK1. Nicht-fusioniertes GST diente als Negativkontrolle (Spuren GST).

Das Fusionsprotein des Klons 3 III 1 kodiert für die WD-Domänen 5 – 7 des RACK1-Proteins. Im Präzipitationsansatz mit dem Lysat Virus-infizierter Zellen (A/WSN/33) ließ sich eine starke Fällung des M1-Proteins zeigen (Abbildung 13, C: GST-3 III 1). Das NS1, das NP und die beiden potentiellen HA-Banden sind ebenfalls nachweisbar, eventuell durch Präzipitation von vRNP-Komplexen. Aus dem Lysat der Mock-infizierten Zellen wurden keine Komponenten präzipitiert. Der Klon 4 III 1 kodiert für den längsten im Two Hybrid Screen gefundenen Leserahmen des RACK1-Proteins, der einen großen Teil der WD-Domäne 4 sowie die Domänen 5 bis 7 umfasst. Mit dem daraus resultierenden Fusionsprotein GST-4 III 1 ließ sich im Kopräzipitationsansatz das M1-Protein aus dem Lysat infizierter Zellen spezifisch präzipitieren (Abbildung 13, D). Aus Mock-infizierten Zellen wurden dagegen keine Bestandteile präzipitiert. Auch das Fusionsprotein 4IV 1 präzipitierte das M1-Protein mit hoher Spezifität gegenüber den anderen viralen Proteinen, ohne zelluläre Bestandteile aus der Mock-Kontrolle zu fällen (Abbildung 14, E).

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Kopräzipitationsexperimente wurde entschieden, die RACK1-M1-Protein Interaktion weiter zu analysieren. Bei den drei untersuchten Klonen fand sich die größte Spezifität für das M1-Protein. Darüber hinaus war die Tatsache, dass im Two Hybrid-Screen vier unabhängige Klone mit RACK1-cDNS identifiziert worden waren, eine zusätzliche Motivation.

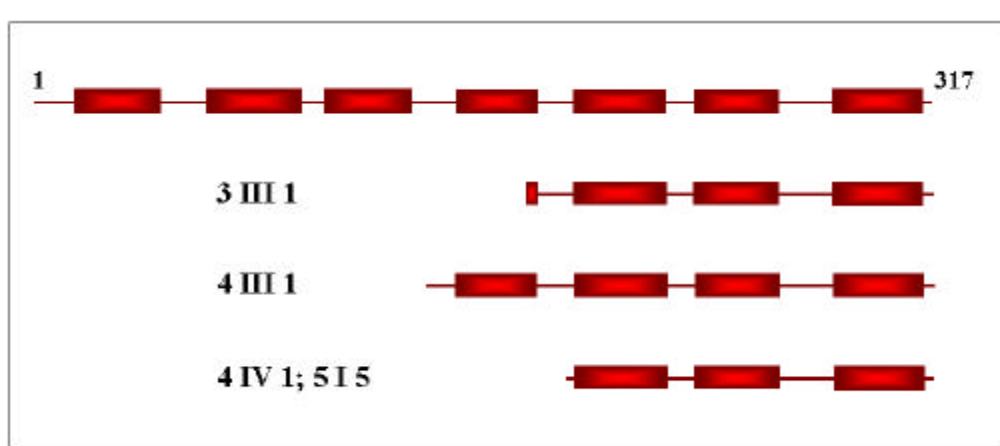
Das Syndecan-4 hatte ebenfalls eine starke Affinität zu dem M-1-Protein des Influenza A Virus gezeigt. Eine weitere Analyse dieses Interaktionspartners ist daher erwägenswert. Das Syndecan-4 ist ein Transmembranprotein und die im Two Hybrid-Screen isolierte cDNS schließt die extrazelluläre Domäne ebenso ein wie den Transmembrananker und den zytoplasmatischen Teil des Proteins. Daher müsste zunächst sichergestellt werden, dass die Interaktion mit dem M1-Protein nicht in der extrazellulären Domäne lokalisiert ist, denn das M1-Protein ist im Verlauf der Infektion nicht außerhalb der Zelle lokalisiert. Es wurde entschieden, die Klone 3 I 7 und 3 II 2 nicht weiter zu verfolgen, da bei ihnen keine spezifische Interaktion mit dem M1-Protein nachzuweisen war. Vielmehr zeigten sie eine in etwa gleich hohe Affinität zu den viralen Proteinen M1, NS1 und NP. Aus dem gleichen Grund wurden auch die beiden Striatin-Klone 2 I 6 und 2 V 6 nicht weiter untersucht.

#### 4.3.2 Das RACK1-Protein: Struktur und Funktionen

RACK1 wurde ursprünglich durch seine Fähigkeit isoliert, an die aktivierte Form der Proteinkinase C (PKC) zu binden (Ron et al., 1994). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass RACK1 die aktivierte PKC im Zytoplasma bindet und an Membranen relokalisiert (Ron et al., 1999). Es wird davon ausgegangen, dass die aktive PKC dadurch Membran-gebundene Substrate leichter phosphorylieren kann. Wie sich gezeigt hat, interagiert RACK1 mit einer Vielzahl weiterer zellulärer Komponenten. Zu diesen gehören die Phosphotyrosin-Kinase Src (Chang et al., 1998), die Integrin- $\beta$ -Untereinheit (Liliental & Chang, 1998) und die gemeinsame  $\beta$ -Kette des IL5/IL3/GM-CSF-Rezeptors (Geijsen et al., 1999), verschiedene Pleckstrin-Homologie-Domänen (Rodriguez et al., 1999) und die cAMP-spezifische Phosphodiesterase PDE4D5 (Yarwood et al., 1999). Mit Ausnahme der RACK1-Src-Interaktion, wodurch die Src-Kinaseaktivität inhibiert wird, ist die Funktionen der Bindung der Proteine an RACK1 noch weitgehend unbekannt.

RACK1 ist ein Homolog der  $\beta$ -Untereinheit des trimeren G-Proteinkomplexes. Obwohl der Identitätsgrad auf Aminosäureebene für die Gesamtsequenz nur 22 % erreicht, findet sich doch eine signifikante strukturelle Ähnlichkeit: Beide Proteine tragen sieben WD-Domänen (Ron et al., 1994). Diese 38 – 51 Aminosäuren umfassenden Domänen finden sich in Proteinen mit unterschiedlichsten Funktionen und dienen vermutlich der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktionen (Neer et al., 1994). WD-Domänen werden häufig von den Resten Tryptophan (W) und Aspartat (D) beendet. Das G $\beta$ -Protein hat eine Propellerstruktur aus sieben Rotorblättern, die von den WD-Domänen gebildet werden (Smith et al., 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit in der Sequenz und der Gestaltung der Domänen wird angenommen, dass RACK1 ebenfalls eine solche Propellerstruktur ausbildet. RACK1 ist außerordentlich stark konserviert. Die Homologe von Mensch, Ratte und Huhn sind auf Aminosäure-Ebene identisch (Guillemot et al., 1989; Ron et al., 1994) und selbst das Homolog aus der Bäckerhefe hat noch einen Identitätsgrad von 50 % (Hoffmann et al., 1999). Diese enorme Sequenzstabilität wird als Hinweis dafür gewertet, dass RACK1 essentielle Funktionen in der Zelle erfüllt.





**Abbildung 14: Struktur der im Two Hybrid-Screen isolierten RACK1-Klone.** Die von den Genbank-Plasmiden pJG-3 III 1, pJG-4 III 1, pJG-4 IV 1 und pJG-5 I 5 exprimierte RACK1-Polypeptide sind schematisch relativ zum vollständigen RACK1 dargestellt. Die sieben WD-Domänen des RACK1wt und die jeweils exprimierte WD-Domänen der einzelnen Polypeptide sind als rote Rechtecke eingezeichnet.

Keiner der vier als M1-Interaktionspartner identifizierte RACK1-Klone umfasst den gesamten RACK1-Leserahmen. Alle beginnen in der kodierenden Sequenz und reichen über das Stop-Kodon von RACK1 hinaus. Der längste Klon 4 III 1 beginnt vor der WD-Domäne IV, der Klon 3 III 1 beginnt kurz vor dem Ende der Domäne IV und die beiden sequenzidentischen Klone 4 IV 1 und 5 I 5 beginnen kurz vor dem Anfang der WD-Domäne V.

#### 4.3.2.1 Kopräzipitation von RACK1 und dem M1-Protein von Viren mit aviärer, porciner und humanpathogener Spezifität

Influenza A Viren haben ein weites Wirtsspektrum, das neben dem Menschen viele Säugetiere und auch Vögel umfasst (Lamb & Krug, 1996). Bei einem Sequenzvergleich der M-Segmente von 42 Influenza A Virusstämmen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität und geographischer Herkunft ergab sich, dass die M1-Proteine einen Identitätsgrad von über 92 % zwischen den Stämmen aufweisen (Ito et al., 1991). Trotzdem lassen sich vier unterschiedliche Evolutions-Linien ausmachen. Die erste Linie umfasst nur das stark divergente M-Segment des Stammes Equine/Prague/56. Die zweite besteht aus M-Segmenten von Stämmen, die Möwen infizieren. Die dritte Linie lässt sich in zwei Untergruppierungen aufteilen. In der ersten finden sich humanpathogene Stämme, während die zweite aus Stämmen mit einer Spezifität für Schweine besteht. Die vierte Linie wird aus Stämmen gebildet, die aus Vögeln isoliert worden sind. Da sich bei Virusstämmen mit Spezifität für unterschiedliche Wirte verschiedene Linien des M1-Proteins entwickelt haben, stellte sich die

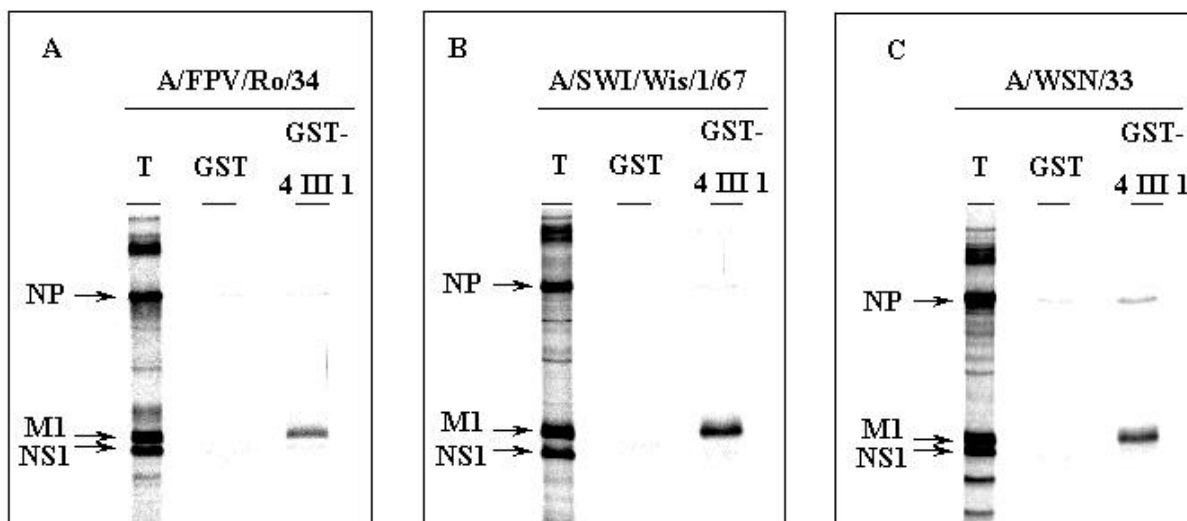
Frage, ob die M1-Proteine unterschiedlicher Influenzavirus-Stämme in der Lage seien, mit den jeweiligen RACK1-Proteinen der verschiedenen Wirtszellen zu interagieren.

Um diese Frage zu untersuchen, wurden Influenza A Virus-Stämme analysiert, die der Linie 4 und den beiden Untergruppierungen der Linie 3 zugeordnet worden waren (Ito et al., 1991). Neben dem bereits verwendeten Stamm A/WSN/33, der aus einem humanpathogenen Isolat hervorgegangen war, wurde der Erreger der klassischen Geflügelpest, A/FPV/Ro/34 als Geflügel-spezifischer Stamm ausgewählt. Außerdem wurde der Schweine-Influenzaerreger A/Swi/Wis/1/67 untersucht, dessen M-Segment nicht sequenziert worden war. Auf Grund des Zeitpunktes und des Ortes seiner Isolierung wird der Stamm trotzdem in die Gruppe der Viren der klassischen Schweinegrippe eingeordnet.

Mit den Viren dieser Stämme wurden MDCKII-Zellen mit einer MOI von 10 infiziert. Die Zellen wurden sechs Stunden nach Infektion mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin metabolisch markiert und acht Stunden nach Infektion in Net-N lysiert. Diese Zelllysate wurden in Kopräzipitations-Experimente eingesetzt.

RACK1 ist ein stark konserviertes Protein. Die bereits 1989 isolierte entsprechende cDNS aus Hühnern kodiert für ein Protein, dessen Aminosäuresequenz identisch ist zu der von Menschen (Guillemot et al., 1989) und Ratten (Ron et al., 1994). Das homologe Protein aus Schweinen (GenBank- Nummer AF146043) zeigt ebenfalls diese identische Aminosäuresequenz. Daher konnte für alle Experimente das im Two Hybrid Screen isolierte, humane RACK1-Polypeptid 4 III 1 eingesetzt werden.

Bakteriell exprimiertes und an Glutathion-Sepharose immobilisiertes GST-4 III 1 wurde für die einzelnen Experimente mit den jeweiligen Lysaten inkubiert. Parallel wurde auch unfusioniertes GST als Negativkontrolle mit den Lysaten inkubiert. Das RACK1-Polypeptid 4 III 1 präzipitiert das M1-Protein von allen drei Virusstämmen hochspezifisch (Abbildung 15). In keinem der Experimente war das M1-Protein der jeweiligen Viren durch GST gefällt worden.



**Abbildung 15: In vitro-Kopräzipitation des M1-Proteins von Virusstämmen unterschiedlicher Wirtsspezifität mit dem RACK1-Polypeptid 4 III 1.** MDCKII-Zellen wurden mit Influenza A Virusstämmen mit Spezifität für **A)** Geflügel (A/FPV/Ro/34), **B)** Schweine (A/Swi/Wis/1/67) und **C)** Menschen (A/WSN/33) infiziert. Die Lysate der  $^{35}\text{S}$ -Methionin-markierten Zellen wurden mit GST bzw. GST-4 III 1, das an Glutathion-Sepharose gebunden war, inkubiert (Spuren GST-4 III 1). Die Präzipitate wurden auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und die markierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Parallel wurden je 5 % des eingesetzten Zelllysats auf dem Gel mit aufgetrennt (Spuren T). Die Positionen der viralen Proteine NP, M1 und NS1 sind durch Pfeile markiert. Nicht-fusioniertes GST diente als Negativkontrolle (Spuren GST).

Demnach ist, ebenso wie das M1-Protein und das RACK1, auch die Interaktion der beiden Proteine zwischen den unterschiedlichen Wirten konserviert.

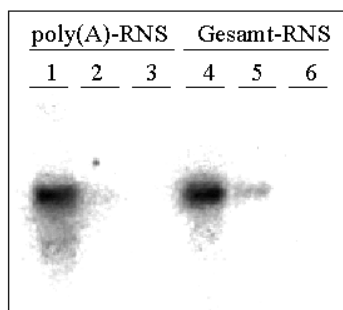
## 4.4 Zur Funktion von RACK1 in der Zelle

### 4.4.1 Untersuchung der gewebespezifischen Expression von RACK1 in humanen Geweben

Da über das humane RACK1-Protein bisher nur sehr wenig bekannt war, wurde zunächst untersucht, in welchen Gewebetypen das RACK1 exprimiert ist. Dabei stellte sich auch die Frage, ob sich eine Korrelation mit Gewebetypen ergab, in denen sich Influenza A Viren vermehren. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde der kommerziell erhältliche „Multiple Tissue Northern Dot Blot“ (MTN; Clontech) mit mRNA aus verschiedenen Geweben eingesetzt. Der Vorteil eines Dot-Blots liegt darin, dass auf engem Raum die RNS-Proben aus verschiedenen Geweben parallel auf die Anwesenheit einer speziellen RNS untersucht werden können.

Da bei Dot Blot-Analysen keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob ein gegebenes Signal auf eine einzelne untersuchte RNS-Spezies zurückzuführen ist, oder ob die Sonde mit mehreren RNS hybridisiert, wurde die Sonde zunächst getestet. Dazu wurde ein Northern Blot

mit poly(A)-RNS und Gesamt-RNS aus HeLa-Zellen hergestellt. Zur Detektion der RACK1-mRNS wurde mit dem DecaLabel-DNA-Labeling Kit eine radioaktiv markierte DNS-Sonde erzeugt. Dabei diente das RACK1-cDNS-Fragment als Matrize. Die Membran wurde über Nacht mit 10  $\mu$ l der Sonde (entsprechend  $1,1 \times 10^8$  cpm) hybridisiert.

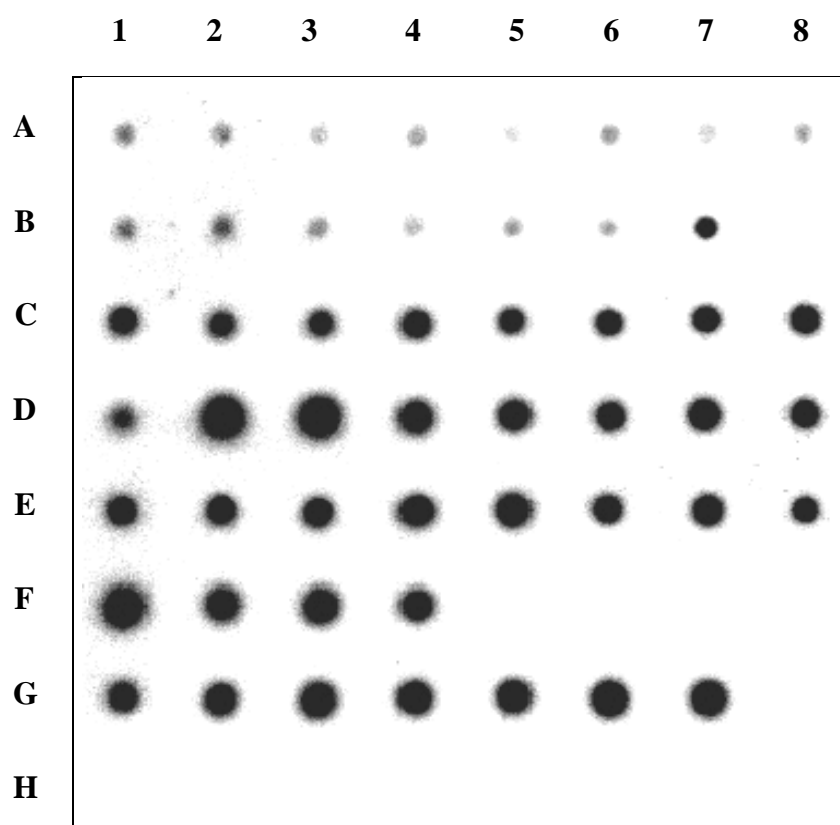


**Abbildung 16: Northern Blot zum Test der Spezifität der radioaktiv markierten DNS-Sonde.** Auf einem Formamid-Agarosegel wurden von einer poly(A)-RNS-Präparation aus HeLa-Zellen (Spur 1 bis 3) 195 ng (1), 19,5 ng (2) bzw. 1,95 ng (3) sowie von einer gesamt-RNS-Präparation aus HeLa-Zellen (Spuren 4 bis 6) 1  $\mu$ g (4), 0,1  $\mu$ g (5) bzw. 10 ng (6) elektrophoretisch getrennt. Nach Übertragung der RNS auf eine positiv geladene Membran und eine einstündige Prähybridisierung wurde die Membran mit einer radioaktiv-markierten, RACK1-spezifischen Sonde über Nacht hybridisiert. Das radioaktive Signal wurde nach mehrmaligem Waschen der Membran durch Exposition auf einer BioImager-Platte detektiert.

Die Sonde detektierte nur eine einzelne RNS-Bande. Bei der Poly(A)-RNS (Abbildung 16, Proben 1 bis 3) war nur bei der höchsten Konzentration von 195 ng RNS (Probe 1) ein deutliches Signal zu erkennen. Bei der Gesamt-RNS (Proben 4 bis 6) war ein etwa vergleichbares Signal bei 1  $\mu$ g RNS detektierbar (Probe 4) und eine sehr schwache Bande bei 100 ng (Probe 5). Damit ließ sich mit dieser Sonde im Northern Blot eine einzelne mRNS detektieren. Somit war die Sonde geeignet, um RACK1-mRNS im „Multiple Tissue Northern Dot Blot“ (MTN) zu detektieren.

Bei dem MTN ist die mRNS aus 43 verschiedenen Geweben erwachsener Menschen und von sieben Gewebetypen aus humanen Föten aufgetragen. Dabei wurden die RNS-Mengen gegen vier als gleichwertig exprimiert angesehene mRNS-Spezies normalisiert. Darüber hinaus sind auf der Membran acht Negativkontrollen aufgetragen, um sicherzustellen, dass keine unspezifische Bindung der Sonde detektiert wird. Die einzelnen Gewebetypen sowie die Negativkontrollen sind der Tabelle unter der Autoradiographie des MTN zu entnehmen (Abbildung 18). Nachdem durch den Test-Northern Blot gezeigt werden konnte, dass die Sonde nur mit der RACK1-RNS hybridisierte, wurde der MTN nach einer einstündigen Prähybridisierung mit  $1 \times 10^8$  cpm der RACK1-Sonde über Nacht hybridisiert. Das Ausmaß der Hybridisierung wurde durch Exposition des Blot gegen Röntgenfilm und BioImager-Platte dokumentiert.

## I



## II

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	Gehirn	Amygdala	Nucleus caudatus	Kleinhirn	Cerebraler Cortex	Vorderlappen	Hippocampus	Medulla oblongata
B	Hinter-Hauptslappen	Putamen	Substantia Nigra	Schläfenlappen	Thalamus	Hypothalamuskern	Rückenmark	
C	Herz	Aorta	Skelettmuskel	Dickdarm	Blase	Gebärmutter	Prostata	Magen
D	Hoden	Eierstöcke	Bauchspeicheldrüse	Hirnanhangsdrüse	Nebenniere	Schilddrüse	Speicheldrüse	Brustdrüse
E	Niere	Leber	Dünndarm	Milz	Thymus	periphere Leukozyten	Lymphknoten	Knochenmark
F	Appendix	Lunge	Luftrohre	Plazenta				
G	fetales Gehirn	fetales Herz	fetale Niere	fetale Leber	fetale Milz	fetaler Thymus	fetale Lunge	
H	Hefegesamt-RNS,	HefetRNS, 100 ng	<i>E.coli</i> rRNS, 100 ng	<i>E.coli</i> DNS, 100 ng	Poly r(A), 100 ng	humane C <sub>0</sub> t 1 DNS,	humane DNS, 100 ng	humane DNS, 500 ng

**Abbildung 17: Northern Dot Blot mit RNS aus unterschiedlichen humanen Geweben (Multiple Tissue Northern Dot Blot; MTN).** Im oberen Teil der Abbildung (I) ist das Autoradiogramm des mit einer radioaktiv markierten RACK1-DNS-Sonde inkubierten Blots gezeigt. Aus der Tabelle im unteren Teil der Abbildung (II) geht hervor, aus welchem Gewebe die einem Spot zugeordnete RNS stammt. Die am unteren Ende der Membran aufgetragenen Nukleinsäuren (H1 bis H7) dienen als Negativkontrollen.

Die Autoradiographie des MTN zeigte, dass die RACK1-mRNS in allen humanen Geweben vorliegt, während die Sonde bei den Negativkontrollen (H1 bis H8) kein Signal erzeugte. Aus der unterschiedlichen Signalstärke ließ sich ableiten, dass bei adulten Menschen die RACK1-Expression im Gehirn (A1 bis B7) geringer ist als in den anderen Geweben. In den Eierstöcken, der Bauchspeicheldrüse und dem Appendix (D2, D3 und F1) war die Expression stärker als in den meisten anderen Geweben. Im Unterschied dazu erreichte die RACK1-mRNS-Synthese in allen fötalen Geweben (G1 bis G7) ungefähr das gleiche Ausmaß, in Gehirn (G1) und Herz (G2) etwas geringer als in Niere (G3) bzw. Thymus (G6). Insgesamt ist die RACK1-mRNS-Konzentration in sich teilenden Geweben höher als in ruhenden. Es ließ sich zeigen, dass RACK1 in der Lunge (F2), dem primären Zielorgan einer Influenza A Virus-Infektion, in hohem Maße exprimiert wird. Dadurch steht es *in vivo* für eine Interaktion mit dem viralen M1-Protein zur Verfügung. Da das RACK1 in allen hier untersuchten Geweben exprimiert wurde, spielt die RACK1-M1-Interaktion anscheinend keine Rolle für einen Gewebstropismus einer Influenzavirus-Infektion.

#### 4.5 Modelle zur Funktion der RACK1-M1-Interaktion

Nachdem das RACK1-Protein im Two Hybrid Screen als Interaktionspartner des viralen M1-Proteins identifiziert worden war und die Interaktion zwischen RACK1 und M1 in *in vitro*-Kopräzipitationsexperimenten bestätigt werden konnte, stellte sich die Frage, welche Funktion die gefundene Protein-Protein-Interaktion im Kontext der viralen Infektion der Wirtszelle haben könnte. RACK1 war ursprünglich durch seine Fähigkeit identifiziert worden, die aktivierte Form der Proteinkinase C (PKC) zu binden und an zelluläre Membranen zu verankern (Ron et al., 1994). Aufgrund dieser Tatsache wurden die drei folgenden Modelle denkbarer Funktionen der RACK1-M1-Interaktion entwickelt und getestet.

1. Influenza A Viren schnüren sich zum späten Zeitpunkt der Infektion von der zellulären Plasma-Membran ab. Die Bedeutung des M1-Proteins bei diesem Vorgang war schon lange diskutiert worden und konnte vor kurzem bestätigt werden (Gómez-Puertas et al., 2000). Der genaue Mechanismus zur Bildung reifer Viruspartikel ist jedoch noch nicht vollständig verstanden. RACK1 assoziiert an zelluläre Membranen. Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Bindung des M1-Proteins an RACK1 eine Rolle beim Zusammensetzen der neugebildeten Virionen und deren Abschnüren

von der Wirtszelle am Ende des Infektionsverlaufes spielen könnte. Ein analoger Mechanismus konnte bei Rhabdoviren gezeigt werden, bei denen das Matrixprotein mit zellulären WW-Domänen-Proteinen interagieren muß, um ein Abschnüren von der Wirtszellmembran zu ermöglichen (Harty et al., 1999).

2. Das M1-Protein des Influenza A Virusstammes WSN/33 wird von bisher unbekanntem Kinase hauptsächlich an Serinresten phosphoryliert (Gregoriades et al., 1984; Gregoriades et al., 1990). RACK1 bindet die aktivierte Form der Serin-/Threoninkinase PKC (Ron et al., 1994). Daher wurde die Hypothese aufgestellt, dass die PKC das M1-Protein phosphorylieren könnte. In diesem Falle könnte die über den Adapter RACK1 vermittelte Nähe zwischen Kinase und Substrat die M1-Phosphorylierung in der Zelle begünstigen.
3. RACK1 interagiert mit verschiedenen zellulären Komponenten. Durch die Bindung des M1-Proteins an den Bindungspartner RACK1 könnte die Bindung solcher Komponenten und damit ihre Funktion modifiziert werden.

Diese drei Modelle stellen die theoretische Grundlage der nachfolgenden Experimente dar, mit denen mögliche Funktionen der Interaktion zwischen dem zellulären RACK1 und dem viralen M1-Protein untersucht wurden.

#### 4.5.1 Untersuchungen zur M1-RACK1 Interaktion: Spielt RACK1 eine Rolle beim viralen Assemblierungsprozess ?

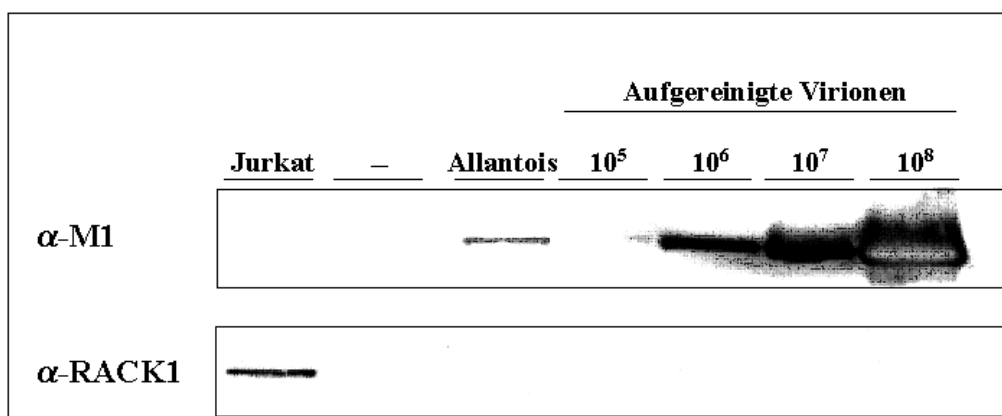
Da angenommen wird, dass RACK1 bei der Verankerung der aktivierten PKC an zelluläre Membranen eine Rolle spielt, wurde untersucht, ob RACK1 als zeitweise membranverankertes Protein über die Interaktion mit dem M1-Protein eine Rolle bei der Virusreifung und Knospung spielt. Dabei wurde zunächst von der Hilfsannahme ausgegangen, dass RACK1 in einem solchen Falle zumindest zu einem gewissen Teil in die Virionen integriert werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde versucht, RACK1 in Virionen nachzuweisen.

##### 4.5.1.1 RACK1 lässt sich nicht in aufgereinigten Virionen nachweisen

Influenza A Virionen wurden aus der Allantoisflüssigkeit von 20 infizierten, embryonierten Hühnereiern zunächst über Adhäsion an Erythrozyten und anschließend über

Gradientenzentrifugation aufgereinigt. Sie wurden aus der Saccharosefraktion pelletiert und in 250  $\mu$ l TBS eluiert. Ein HA-Test ergab für die daraus resultierende Virussuspension  $2^9$  HA-Einheiten/100  $\mu$ l. Dies entspricht nach Literaturwerten ca.  $5 \times 10^7$  PFU (plaque forming units) bzw.  $5 \times 10^9$  Partikeln nach elektronenmikroskopischer Auszählung (Barret & Inglis, 1984). Für die Western-Blot Analyse wurden von dieser Virussuspension auf das SDS-Polyacrylamidgel Verdünnungen aufgetragen, die demnach ca.  $10^5$  bis ca.  $10^8$  Viruspartikel enthielten.

In der Immundetektion ließen sich mit dem  $\alpha$ -M1-Antikörper steigende Mengen des M1-Proteins detektieren. In der höchsten getesteten Virionenkonzentration fand ein Ausbleichen des Signals statt, was auf den rapiden Abbau des Luminszens-Substrats infolge sehr hoher Konzentration des Antigens zurückzuführen ist. Der  $\alpha$ -RACK1-Antikörper hingegen detektierte bei den getesteten Virus-Mengen kein RACK1-Protein und erkannte das Protein nur in dem als Positivkontrolle aufgetragenen Jurkat-Zelllysate.



**Abbildung 18: Detektion von M1-Protein und RACK1 in aufgereinigten Virionen.** Influenza A Viren wurden aus der Allantoisflüssigkeit von infizierten, embryonierten Hühnereiern erst durch Adhäsion an Erythrozyten und dann durch Zentrifugation in einem Saccharosegradienten stufenweise aufgereinigt und nach Pelletierung in TBS aufgenommen. Aus dem HA-Titer der Suspension wurde die Anzahl an Viruspartikeln nach einem Richtwert abgeschätzt. Die Spuren eines SDS-Polyacrylamidgels wurden mit den daraus resultierenden Virionen-Mengen beladen. Im nachfolgenden Western Blot wurden die Proteine M1 und RACK1 mit den entsprechenden Antikörpern detektiert. Dabei dienten Jurkat-Zelllysate und ein Aliquot Allantoisflüssigkeit aus infizierten Eiern als Positivkontrolle des  $\alpha$ -RACK- bzw. des  $\alpha$ -M1- Antikörpers.

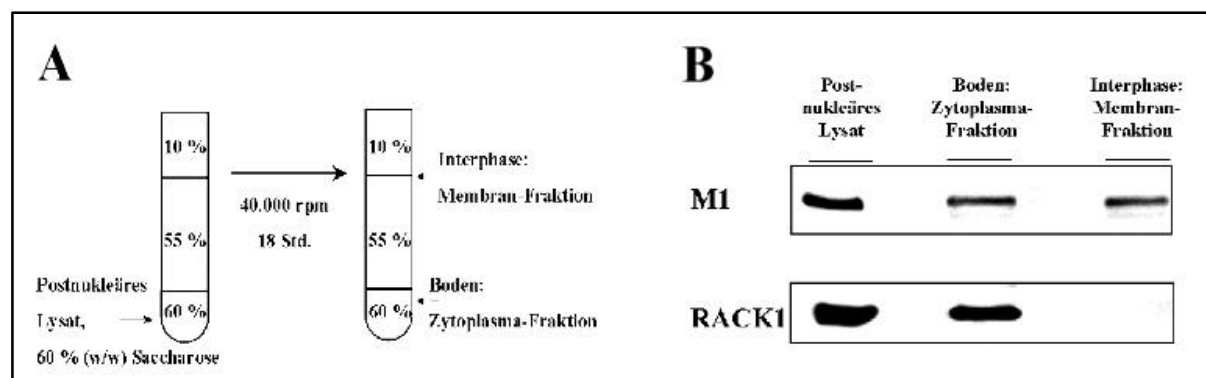
Daraus ließ sich folgern, dass RACK1 nicht in detektierbaren Ausmaßen in Influenza A Virionen integriert wird. Allerdings folgt daraus nicht zwingend, dass das RACK1 keine Rolle bei der viralen Assemblierung an der Membran spielt. Es wäre ebenso denkbar, dass nach der Membranverankerung der viralen Komponenten der zelluläre Verankerungsfaktor aus dem sich abschnürenden Membransegment aussortiert wird.



#### 4.5.1.2 RACK1 und M1 zeigen keine Komigration in der Membran-Fraktion Influenza A Virus-infizierter MDCK-Zellen

Wenn die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein bei der Assemblierung der Viruspartikel eine Rolle spielt, sollte RACK1 in infizierten Zellen zusammen mit dem M1-Protein an der Membran nachweisbar sein. Zur Untersuchung der Frage, ob RACK1 zusammen mit dem M1-Protein an der zellulären Membran lokalisiert ist, wurden die Membranen infizierter Zellen mit Hilfe der Flotationsanalyse (beschrieben in (Sanderson et al., 1993)) von der zytoplasmatischen Fraktion und unlöslichen Bestandteilen getrennt. Aus der Interphase-Fraktion, in der sich die Membranen anreichern, wurden Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen das M1-Protein und gegen das RACK1-Protein durchgeführt. Als Kontrolle wurden die gleichen Präzipitationen ebenfalls aus der Boden-Fraktion vorgenommen, in der sich die zytoplasmatischen Bestandteile anreichern.

Während sich das M1-Protein in dem Lysat infizierter Zellen sowohl aus der Fraktion mit den zytoplasmatischen Bestandteilen als auch aus der Membranfraktion präzipitieren ließ (Spuren M1), konnte das RACK1 nur aus der zytoplasmatischen Fraktion gefällt werden (Spuren RACK1).



**Abbildung 19: Das virale M1-Protein liegt in der infizierten Zelle an Membranen gebunden vor, nicht aber das RACK1.** MDCKII-Zellen wurden nach achtstündiger Infektion mit Influenza A/WSN/33-Viren in hypotonischem Puffer lysiert und zur Flotationsanalyse im nicht-linearen Gradienten aufgetrennt. Die Saccharose-Konzentrationen (w/w) der einzelnen Stufen sind unter A) angegeben. B) Aus jeweils 250  $\mu$ l der Zytoplasma- und der Membran-Fraktion wurden Immunpräzipitationen mit polyklonalem  $\alpha$ -M1-Serum (M1) bzw. monoklonalem  $\alpha$ -RACK1-Antikörper (RACK) durchgeführt. Zur Kontrolle der Antikörper wurden 2 % des in die Flotationsanalyse eingesetzten Lysats auf dem Gel aufgetrennt (Postnukleäres Lysat). Die präzipitierten Proteine wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und im anschließenden Western Blot detektiert.

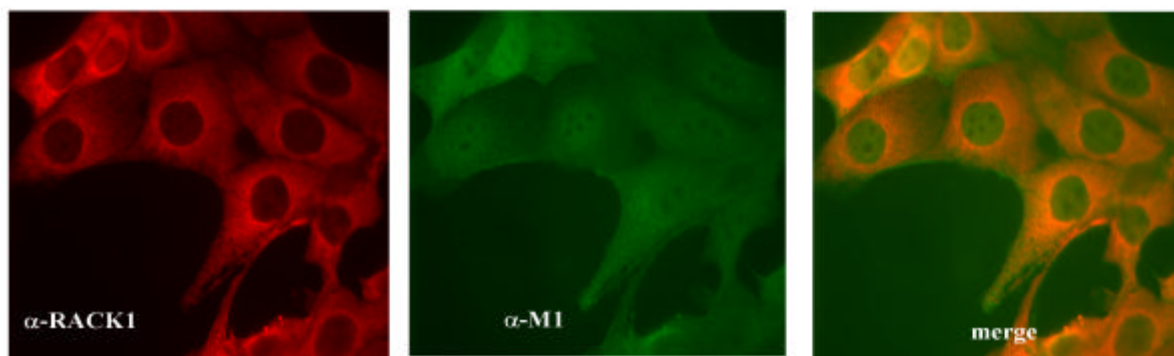
RACK1 und das M1-Protein liegen also in der infizierten Zelle nur im Zytoplasma gemeinsam vor. Demnach ist eine Beteiligung des RACK1 am viralen Assemblierungsprozess unwahrscheinlich. Möglicherweise spielt die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-

Protein gemäß dem zweiten, postulierten Modell eine Rolle bei der M1-Proteinphosphorylierung. Die Möglichkeit, dass das M1-Protein das RACK1 an der Membranlokalisierung hindert, konnte ausgeschlossen werden, da RACK1 in Mock-infizierten Zellen ebenfalls nicht an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte (Daten hier nicht gezeigt).

#### 4.5.1.3 In der Immunfluoreszenz zeigt sich eine zytoplasmatische Kollokalisierung von RACK1 und dem M1-Protein

Die Lokalisation von RACK1 und dem M1-Protein wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz in Influenzavirus-infizierten Zellen untersucht. Dazu wurden auf Deckgläschen kultivierte MDCKII-Zellen für acht Stunden mit Influenza A/WSN/33-Viren (MOI: 10) infiziert. Anschließend wurden die Zellen gemäß 3.5.4 fixiert, permeabilisiert und mit den primären Antikörpern  $\alpha$ -RACK1 (IgM) und  $\alpha$ -M1 (IgG) inkubiert. Die primären Antikörper wurden mit Texas-Red-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus-IgM- bzw. FITC-gekoppeltem  $\alpha$ -Maus IgG-Antikörper gefärbt. Die Lokalisation der Proteine wurde durch Bestrahlung mit UV-Licht in einem Fluoreszenz-Mikroskop (Nikon) sichtbar gemacht und mit einem Digitalkamerasystem (Diagnostic Instruments, inc.) dokumentiert.

RACK1 ist fast ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, wo es an der Plasma-Membran fast nicht detektierbar ist, aber im Bereich um den Zellkern akkumuliert. Im Zellkern wird kein RACK1 detektiert. Nach achtstündiger Infektion war das M1-Protein im Zellkern ebenso wie im gesamten Zytoplasma nachzuweisen. Eine Lokalisation an den äußeren Membranen, den Bereichen der Virus-Neubildung und –Abschnürung, war ebenfalls deutlich nachweisbar. Durch Überlagerung der beiden Bilder (merge) zeigten sich zelluläre Bereiche, in dem beide Proteine lokalisiert waren, als gelb-orange Färbung. Diese befanden sich im direkten Umfeld der Zellkerne, nicht jedoch an der Zellmembran. Wenngleich eine Kollokalisierung von Proteinen nur durch konfokale Laserscanning-Mikroskopie gezeigt werden kann, so läßt sich doch sagen, dass in den orange gefärbten Bereichen der „merge“-Abbildung beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander lokalisiert sind.



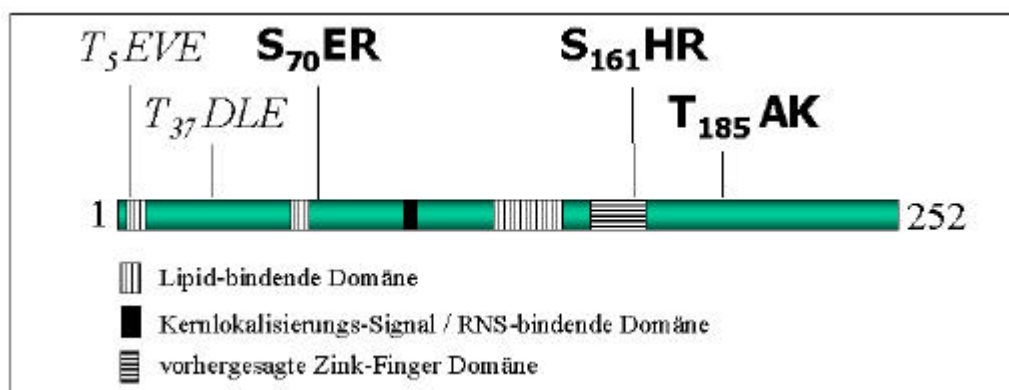
**Abbildung 20: Lokalisation von RACK1 und dem M1-Protein in Influenza A Virus-infizierten MDCKII-Zellen.** MDCKII-Zellen wurden acht Stunden nach Infektion mit Influenza A/WSN/33 Viren fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen RACK1 bzw. das M1-Protein inkubiert. Anschließend wurden diese Antikörper durch geeignete, mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Sekundärantikörper detektiert. Durch UV-Anregung war dadurch RACK1 durch rote und das M1-Protein durch grüne Fluoreszenz im Mikroskop zu erkennen. Eine Überlagerung der beiden Bilder (merge) deutet den Bereich möglicher Kolokalisation an.

Aus den Ergebnissen dieser Experimente ließ sich schließen, dass die Interaktion zwischen dem viralen M1-Protein und dem zellulären RACK1 bei der Virus-Morphogenese an der Zellmembran vermutlich keine Rolle spielt.

#### 4.6 Phosphorylierung des viralen M1-Proteins durch zelluläre Kinasen

Das M1-Protein des Influenza A Virus Stammes WSN/33 wird vornehmlich an Serinresten phosphoryliert (Gregoriades et al., 1984; Gregoriades et al., 1990). Bisher sind weder die vermittelnden Enzyme noch die Funktionen der Modifikation bekannt. Da eine hyperphosphorylierte Mutante des M1-Proteins im Zellkern akkumuliert (Whittaker et al., 1995), ist es jedoch vorstellbar, dass die intrazelluläre Lokalisation des M1-Proteins durch Phosphorylierung reguliert wird. Da das M1-bindende Protein RACK1 als Rezeptor der aktivierten Kinase PKC identifiziert worden ist (Ron et al., 1994), erschien es möglich, dass die PKC in die Phosphorylierung des M1-Proteins involviert ist. Um dieses zu untersuchen, wurde als erstes die Aminosäuresequenz des M1-Proteins mit Hilfe eines Computeralgorithmus auf Motive durchsucht, die von Proteinkinasen erkannt werden. Das Programm PROSITE (Hofmann et al., 1999), das im Internet auf der Homepage ExpASy (Expert Protein Analysis System) des Schweizer Institutes für Bioinformatik (<http://www.expasy.ch/sprot/prosite.html>) zur Verfügung steht, ermittelte insgesamt fünf Aminosäuren, die von Proteinkinasen phosphoryliert werden könnten. Zwei davon befanden sich in Konsensus-Sequenzen, die von der Proteinkinase Caseinkinase II (CKII) erkannt werden konnten, nämlich die Threoninreste T 5 und T 37. Die drei anderen Aminosäuren waren in einem Kontext, in dem sie von der Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert werden

konnten. Dabei handelte es sich um zwei Serine in den Positionen S 70 und S 161 und einem Threonin in der Position T 185. Für die PKC gibt das PROSITE-Programm die Erkennungssequenz S/T-X-R/K an, wobei X jede beliebige Aminosäure sein kann.



**Abbildung 21: Computergestützte Identifizierung von potentiellen Phosphorylierungsstellen des M1-Proteins.** Mit dem Programm PROSITE lassen sich bei gegebener Proteinsequenz Erkennungsstellen für Kinasen vorhersagen. Bei einer solchen Analyse der Aminosäuresequenz des M1-Proteins vom Influenza A Virus PR/8/34 fanden sich fünf potentielle Phosphorylierungsstellen. Zwei Threoninreste liegen in Konsensus-Sequenzen der Caseinkinase II (CKII) an Position 5 und Position 37 (*kursiv* dargestellt). Ein weiteres Threonin (an Position 185) und zwei Serinreste (an Position 70 und 161) liegen in Erkennungsbereichen der Proteinkinase C (PKC) (**fett** dargestellt).

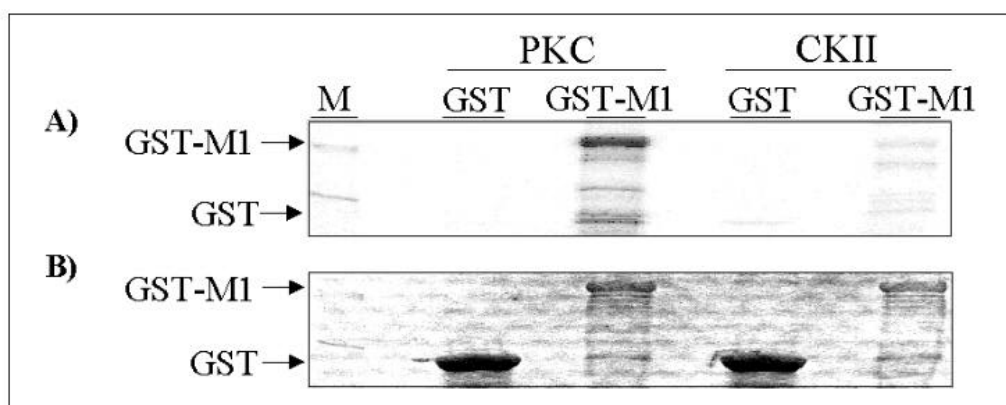
#### 4.6.1 Das M1-Protein wird durch aufgereinigte PKC, nicht aber durch CKII phosphoryliert

Nachdem in der M1-Proteinsequenz potentielle Erkennungsstellen für die Proteinkinasen PKC und CKII identifiziert worden waren, wurde untersucht, ob diese beiden Kinasen das M1-Protein phosphorylieren können. Dabei wurde zunächst bakteriell exprimiertes M1-Protein als Substrat verwendet. Bei der Verwendung von M1-Protein aus Virionen bestand das Risiko, dass aufgrund bereits bestehender Phosphorylierungen das Ergebnis nicht zu ermitteln wäre.

Zunächst wurde die M1-Protein-Expressionskassette aus dem Plasmid plexA-M1 ausgeschnitten und in den Vektor pGEX 5x-1 integriert. Das so erzeugte Plasmid pGEX-M1wt wurde nach seiner Bestätigung im Kontrollverdau und in der Sequenzierung in den Expressionsstamm BL 26 transformiert. Durch Zugabe von 1 mM IPTG ließ sich die Synthese des vorhergesagten 53 kDa-Protein (25 kDa des GST-Anteils und 28 kDa des M1-Anteils) induzieren (Daten nicht gezeigt). Nach der Induktion im großen Maßstab wurde das Protein durch Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt und als Substrat in Kinasierungsexperimenten mit gereinigter PKC (Calbiochem) bzw. gereinigter CKII (New England Biolabs) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente aufgereinigtes GST. Die

Phosphorylierungen wurden durch den Einsatz von  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  detektierbar und durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das getrocknete SDS-Polyacrylamidgel sichtbar gemacht.

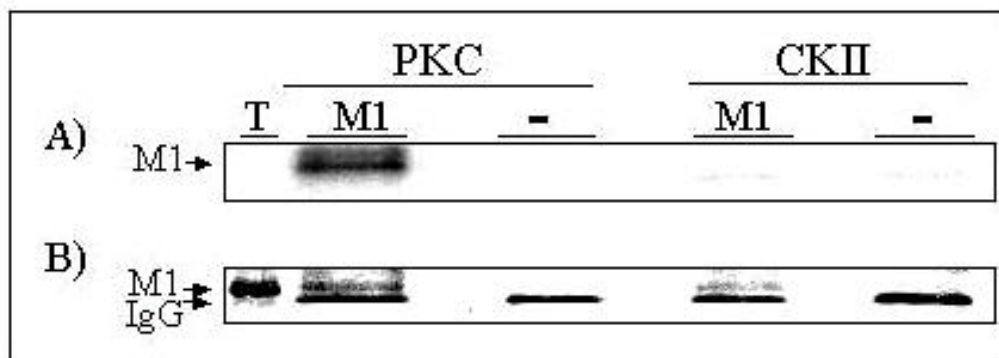
Es zeigte sich, dass 35 Milli-Einheiten PKC zu einer deutlichen Phosphorylierung des M1-Proteins führten (Abbildung 23 A, PKC). Dagegen führte eine Inkubation mit 500 Einheiten der CKII nur zu einer schwachen Markierung des M1-Proteins, die nur leicht oberhalb des Hintergrundsignals lag (Abbildung 23 A, CKII). In diesem Zusammenhang sei auf die im Material und Methoden-Teil erläuterten Unterschiede in der Einheitsdefinition der verwendeten Kinasen hingewiesen. Demnach war die in den CKII-Ansätzen eingesetzte Enzymaktivität ca. 14-fach höher als bei den PKC-Experimenten. Keine der beiden eingesetzten Kinasen phosphorylierte das bakterielle GST-Protein. Die Funktionalität beider Kinasen wurde in parallel durchgeführten Kontrollexperimenten mit dem Substrat MBP (Myelin Basic Protein) nachgewiesen. Sie sind hier nicht gezeigt.



**Abbildung 22: Phosphorylierung von bakteriell exprimiertem M1-Protein durch gereinigte Proteinkinasen.** Nach Aufreinigung an Glutathion-Sepharose wurde GST-M1 mit 35 Milli-Einheiten Proteinkinase C (PKC) oder 500 Einheiten Caseinkinase II (CK II) in Anwesenheit von  $10\ \mu\text{Ci}\ [\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  für 15 Min. bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach der Gelelektrophorese ließ sich eine Phosphorylierung in der Autoradiographie nachweisen. A) Autoradiographie der Kinasierungsexperimente mit Proteinkinase C (Spuren PKC) und Caseinkinase II (Spuren CKII). Für jeden Ansatz ist das Substrat (Spuren GST-M1) und die Negativkontrolle (Spuren GST) aufgetragen. Die Positionen der erwarteten Proteinbanden ist am linken Rand durch Pfeile markiert. In der Markerspur (M) sind die Längenmarkerbanden für 46 und 29 kDa zu erkennen. B) Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des korrespondierenden SDS-Polyacrylamidgels.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung des bakteriell exprimierten M1-Proteins durch gereinigte PKC möglich war, stellte sich die Frage, ob das M1-Protein ebenfalls in seiner nativen Form phosphoryliert werden könnte. Dazu wurde das native M1-Protein aus Virionen isoliert und mittels eines  $\alpha\text{-M1}$ -Kaninchenserums an Protein A-Agarose immobilisiert. Das so aufgereinigte virale M1-Protein diente als Substrat in Kinasierungsexperimenten, die unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wurden wie bei

den Versuchen mit GST-M1 als Substrat. Als Negativkontrolle wurden an Protein A-Agarose immobilisierte  $\alpha$ -M1-Antikörper eingesetzt.



**Abbildung 23: Phosphorylierung des aus Virionen aufgereinigten M1-Proteins.** Aus Virionen isoliertes und immunpräzipitiertes M1-Protein wurde mit 35 Milli-Einheiten PKC (Spuren PKC) oder 500 Einheiten CKII (Spuren CKII) mit je 10  $\mu$ Ci [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-ATP im entsprechenden Puffer für 15 Min. bei 30°C inkubiert (Spuren M1). Als Negativkontrolle dienten Kinasierungsansätze mit immobilisierten Antikörpern ohne virales Protein. **A)** Die Phosphorylierung wurde mittels Autoradiographie dokumentiert. **B)** Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen wurden die Proteine im Western Blot mit einem  $\alpha$ -M1-Kaninchenserum detektiert. Die Positionen des M1-Proteins (M1) und des in (B) ebenfalls erkannten Antikörpers aus der Immunpräzipitation (IgG) sind am linken Rand durch Pfeile markiert.

In der Autoradiographie zeigte sich, dass die PKC in der Lage war, auch das native M1-Protein zu phosphorylieren. Die CKII-Behandlung des nativen M1-Proteins führte zu keiner bemerkenswerten Phosphorylierung. Durch keine der beiden Kinasen fand eine Phosphorylierung der Negativkontrollen statt. Die Positivkontrollen der Kinasen waren in beiden Fällen positiv (Daten hier nicht gezeigt). Damit konnte gezeigt werden, dass die PKC, für die drei potentielle Erkennungsstellen auf dem M1-Protein vorhergesagt worden waren, sowohl bakteriell exprimiertes, als auch natives, aus Virionen aufgereinigtes M1-Protein phosphorylieren kann. Die CKII, für die ebenfalls zwei Erkennungsstellen postuliert worden waren, ist hingegen nicht imstande, das M1-Protein zu phosphorylieren, weder in der bakteriell exprimierten, noch in der nativen Form.

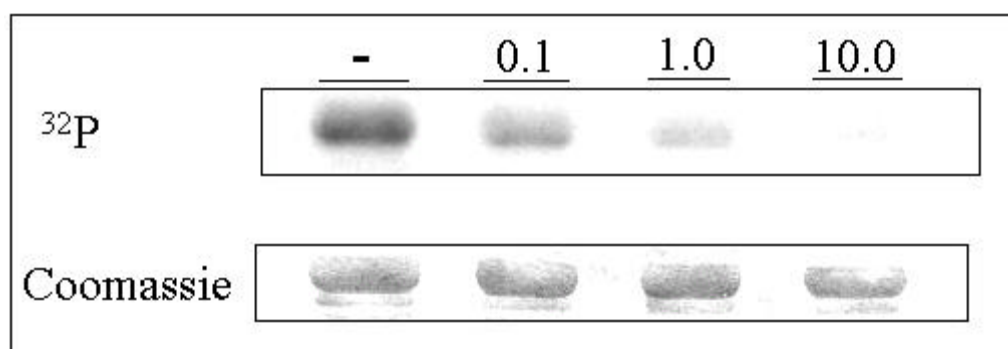
#### 4.6.2 Phosphorylierung von rekombinantem M1-Protein durch zelluläre Extrakte

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die aufgereinigte PKC in der Lage war, sowohl bakteriell exprimiertes als auch aus Virionen aufgereinigtes M1-Protein zu phosphorylieren, stellte sich die Frage, ob sich durch das Lysat von Wirtszellen ebenfalls eine Phosphorylierung des M1-Proteins erreichen ließ.

Dazu wurden MDCKII-Zellen in hypotonem Puffer mit Hilfe eines Dounce-Homogenisators lysiert. Der Überstand wurde nach dem Entfernen der Zelltrümmer eingesetzt, um bakteriell exprimiertes M1-Protein zu phosphorylieren. Es zeigte sich, dass das M1-Protein durch das

Zelllysate phosphoryliert wurde. Um zu untersuchen, ob die phosphorylierende Aktivität in dem Zelllysate auf die PKC zurückzuführen sein könnte, wurden in parallelen Kinasierungsversuchen steigende Konzentrationen des Proteinkinase-Inhibitors GF 109203X eingesetzt, der sich durch eine hohe Spezifität für die PKC auszeichnet (Toullec et al., 1991).

Durch Zugabe steigender Konzentration dieses Inhibitors wurde die Phosphorylierung des M1-Proteins durch das zelluläre Lysat zunehmend inhibiert. Daraus ließ sich schließen, dass es sich bei der Kinase, die das M1-Protein modifizierte, sehr wahrscheinlich um die PKC handelte.



**Abbildung 24: Inhibition der M1-Protein-Phosphorylierung in Zelllysaten durch den PKC-spezifischen Inhibitor GF 109203X.** Bakteriell exprimiertes GST-M1 wurde nach seiner Immobilisierung an Glutathion-Sepharose mit dem Lysat hypotonisch aufgeschlossener MDCKII-Zellen inkubiert, dem 10 µCi [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP zugegeben worden war. Nach 15 Min. Inkubation bei 30°C wurden die Proben aufgereinigt und auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert. Zur Detektion der Phosphorylierung wurde das Gel gegen Röntgenfilm exponiert. Im oberen Teil ist die Autoradiographie gezeigt (<sup>32</sup>P), im unteren die Coomassie-Brillant-Blau-Färbung des gleichen Bereichs (Coomassie). Über den einzelnen Spuren sind die Konzentrationen des eingesetzten Inhibitors GF 109203X in µM angegeben.

#### 4.6.3 Phosphorylierung des rekombinanten M1-Proteins durch PKC-Isoformen

Von der Proteinkinase C sind bisher elf Isoformen identifiziert worden, die in drei Gruppen unterteilt werden (zusammengefasst in (Liu, 1996)). Zu den klassischen PKC (cPKC), deren Aktivierung von der Anwesenheit von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und Phosphoserin abhängt, zählen die Isoformen PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$  und die beiden Spleißvarianten PKC $\beta$ I und  $\beta$ II. Die Isoformen der neuen PKC (nPKC), PKCd, PKCe, PKC $\zeta$  und PKC $\eta$ , sind in ihrer Aktivierbarkeit von Ca<sup>2+</sup> unabhängig. Zur Gruppe der sogenannten atypischen PKC (aPKC) gehören die Isoformen PKC $\theta$  und PKC $\iota$ . Außerhalb dieser Klassifizierung gibt es noch die PKC $\mu$ , die eine Position zwischen den nPKC und den aPKC einnimmt. Da nur die cPKC über den Bereich verfügen, in dem die RACK1-Bindestelle kartiert worden ist (Ron & Mochly-Rosen, 1994), kann angenommen werden, dass auch nur diese Isoformen in der Lage sind, an RACK1 zu binden.

Die in den vorherigen Versuchen verwendete PKC war aus Rattenhirnen isoliert worden. Dabei handelte es sich um ein Gemisch aus verschiedenen Isoformen. Die bisherigen Daten gaben keinen Hinweis darauf, welche der PKC-Isoformen für die Phosphorylierung des M1-Proteins verantwortlich war. Wenn die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein eine Rolle bei der M1-Proteinphosphorylierung spielt, sollte die dabei beteiligte PKC-Isoform in der Lage sein, an RACK1 zu binden. Deshalb wurden verschiedene PKC-Isoformen auf ihre Fähigkeit untersucht, das M1-Protein zu phosphorylieren. Im einzelnen wurden dabei alle cPKC (also die PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ ), zwei Isoformen von den nPKC (PKCd und e) und eine aPKC (PKC?) eingesetzt. Die Experimente wurden wie in 4.6.1 mit bakteriell exprimiertem GST-M1-Protein durchgeführt. Dieses wurde an Glutathion-Sepharose immobilisiert mit PKC-Kinaseassaypuffer versetzt, der in jedem Falle alle Kofaktoren beinhaltet. Zu den Ansätzen wurden jeweils 50 Milli-Einheiten der jeweiligen Kinase-Isoformen gegeben und die Reaktionen wurden 15 Min. bei 30°C inkubiert und über SDS-Gelelektrophorese ausgewertet (3.5.9.1). Nach der beschriebenen Aufarbeitung und Auswertung der Proben ergab sich das folgende Ergebnis:

<b>PKC-Isoformen</b>	<b>M1-Phosphorylierung</b>
PKC $\gamma$	++
PKC $\alpha$	++
PKC $\beta$ II	+
PKC $\beta$ I	-
PKCe	-
PKCd	+
PKC?	-

**Tabelle 5: Phosphorylierung des bakteriell exprimierten M1-Proteins durch PKC-Isoformen.** Die Kinaseassay wurden so durchgeführt, wie es in der Legende der Abbildung 23 beschrieben ist. Die Bewertungen bedeuten: - = keine erkennbare Phosphorylierung; += deutliche Phosphorylierung; ++ = starke Phosphorylierung).

Von den cPKC phosphorylieren die PKC $\gamma$ , die PKC $\alpha$  und die PKC $\beta$ II das M1-Protein, dabei ist die Phosphorylierung durch die PKC $\gamma$  am stärksten. Die PKC $\beta$ I phosphoryliert das M1-Protein nicht. Die PKCd phosphoryliert als einzige nicht-cPKC ebenfalls das M1-Protein. Die PKCe und ? zeigten keine Phosphorylierungsaktivität gegenüber dem M1-Protein. Da das M1-Protein von PKC-Isoformen phosphoryliert wird, die ebenfalls mit dem RACK1 interagieren, fand sich in diesen Experimenten eine deutliche Unterstützung der Annahme, dass die Interaktion zwischen dem zellulären RACK1 und dem viralen M1-Protein eine Rolle bei dessen Phosphorylierung spielt.



## 4.7 Modifikation der RACK1-Funktion durch die Interaktion mit dem viralen M1-Protein

Das dritte für die Funktion der RACK1-M1-Interaktion postulierte Modell unterstellt, dass die normalen, zellulären Funktionen des RACK1 durch das virale M1-Protein moduliert werden (4.5.1). Der optimale Weg zur Überprüfung dieser Hypothese wäre die Untersuchung, ob die Infektion in Wirtszellen verändert wird, wenn diese kein RACK1 exprimieren. Allerdings ist bisher keine RACK1-freie Zelllinie publiziert worden und die Multiple Tissue Northern Blot Untersuchungen zeigten, dass RACK1 in allen Geweben exprimiert wird. In Anbetracht der Tatsache, dass das RACK1-Protein in allen Säugetieren außerordentlich hoch konserviert ist, ist es wahrscheinlich, dass RACK1-freie Zellen nicht zu erhalten sein werden. Daher wurde überlegt, die Bedeutung der Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein mit Hilfe von rekombinanten Viren zu untersuchen, bei denen der RACK1-bindende Bereich des M1-Proteins zerstört worden ist. Dazu musste dieser Bereich zunächst kartiert werden.

### 4.7.1 Untersuchungen zur M1-RACK1-Interaktion: Kartierung der Bereiche, die Protein-Protein-Interaktion vermitteln

In einem Kopräzipitationsansatz wurde das verkürzte RACK1-Peptid 4 III 1 an GST fusioniert eingesetzt, um M1-Protein-Mutanten, auf ihre RACK1-Bindung zu testen. Über ihre radioaktive Markierung konnten dann die mit Glutathion-Sepharose präzipitierten Proteine in der Autoradiographie eines Polyacrylamidgels nachgewiesen werden. Um die Präzipitationseffizienz der einzelnen Experimente vergleichen zu können, wurde die Radioaktivität mit einem BioImager quantifiziert. Das Ausmaß der spezifisch präzipitierten Radioaktivität der M1-Mutante wurde auf die Menge an Radioaktivität bezogen, die in das Experiment eingesetzt worden war. Anhand der so ermittelten Effizienzen ließen sich die einzelnen M1-Mutanten in ihren RACK1-Bindeeigenschaften vergleichen.

#### 4.7.1.1 Identifizierung von M1-Bereichen, die RACK1-Bindung vermitteln

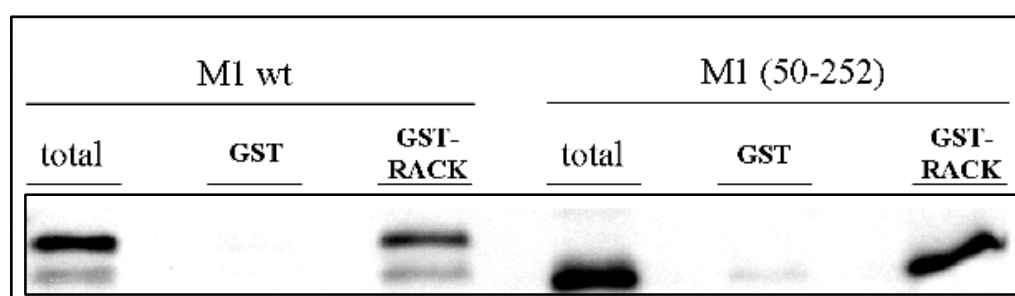
Als Matrize für die *in vitro* Transkription und Translation dienten pcDNA3.1-Plasmide, bei denen die cDNS-Sequenzen der jeweiligen M1-Proteinmutanten hinter einen T7-RNS-Polymerasepromotor integriert worden waren. Die unterschiedlichen cDNS-Sequenzen waren mittels PCR aus der vollständigen M1-Protein-cDNS-Sequenz unter der Verwendung der jeweils geeigneten Oligonukleotid-Primer erzeugt worden. Die Längen der jeweiligen cDNS-Fragmente und der daraus resultierenden Polypeptide sind in der Tabelle 6 zusammengefasst.

Nach der Integration der cDNS-Fragmente in das Plasmid pcDNA 3.1 wurden die Konstrukte durch Sequenzierung und durch *in vitro*-Synthese des entsprechenden Polypeptids bestätigt, bevor die Kopräzipitationen durchgeführt wurden (Daten hier nicht gezeigt).

Bezeichnung	Länge der amplifizierten cDNS	Länge des resultierenden Polypeptids
M1 wt	760 Bp	252 AS = 27,5 kDa
<b>a) carboxyterminal verkürzt:</b>		
M1 (1-200)	605 Bp	200 AS = 22 kDa
M1 (1-135)	410 Bp	135 AS = 15 kDa
M1 (1-112)	340 Bp	112 AS = 12 kDa
M1 (1-90)	275 Bp	90 AS = 10 kDa
<b>b) aminoterminal verkürzt:</b>		
M1 (50-252)	735 Bp	203 AS = 22 kDa
M1 (76-252)	536 Bp	177 AS = 19 kDa
M1 (91-252)	494 Bp	163 AS = 18 kDa
M1 (113-252)	423 Bp	141 AS = 16 kDa
M1 (135-252)	354 Bp	118 AS = 13 kDa
<b>c) intern deletiert:</b>		
M1 ? 91 – 115	684 Bp	228 AS = 23 kDa

**Tabelle 6: Mutanten des M1-Proteins.** Die Mutanten sind nach den enthaltenden Aminosäuren (AS) des M1-Proteins benannt. Die Länge der korrespondierenden M1-cDNS und die errechnete molekulare Masse der M1-Fragmente sind angegeben.

Bei den Kopräzipitations-Experimenten wurden die einzelnen, *in vitro* synthetisierten M1-Mutanten auf ihre Fähigkeit getestet, an GST-4 III 1 bzw. GST zu binden. Nach der Gelelektrophorese wurde die jeweils gebundene Radioaktivität durch Exposition auf einer BioImager-Platte detektiert.



**Abbildung 25: Ermittlung der relativen RACK1-Bindung von M1-Mutanten im Kopräzipitationsansatz.** Das vollständige M1-Protein (M1 wt) und eine M1-Mutante (hier M1 (50 – 252)) wurden *in vitro* synthetisiert und mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin radioaktiv markiert. Anschließend wurden die Proteinsynthese-Ansätze mit bakteriell exprimiertem und an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST- (Spuren GST) bzw. GST-4 III 1 (Spuren GST-RACK) inkubiert. Die Kopräzipitationsansätze wurden nach dem Waschen auf Tris-Tricin-Gelen aufgetrennt. Parallel zu den Proben wurde ein Aliquot von 5 % des *in vitro*-Expressions-Ansatzes mit aufgetrennt (Spuren total). Die Dokumentation der radioaktiven Signale erfolgte durch Röntgenfilme und zur Ermittlung der relativen RACK1-Bindung der Mutanten durch Exposition auf BioImager-Platten.

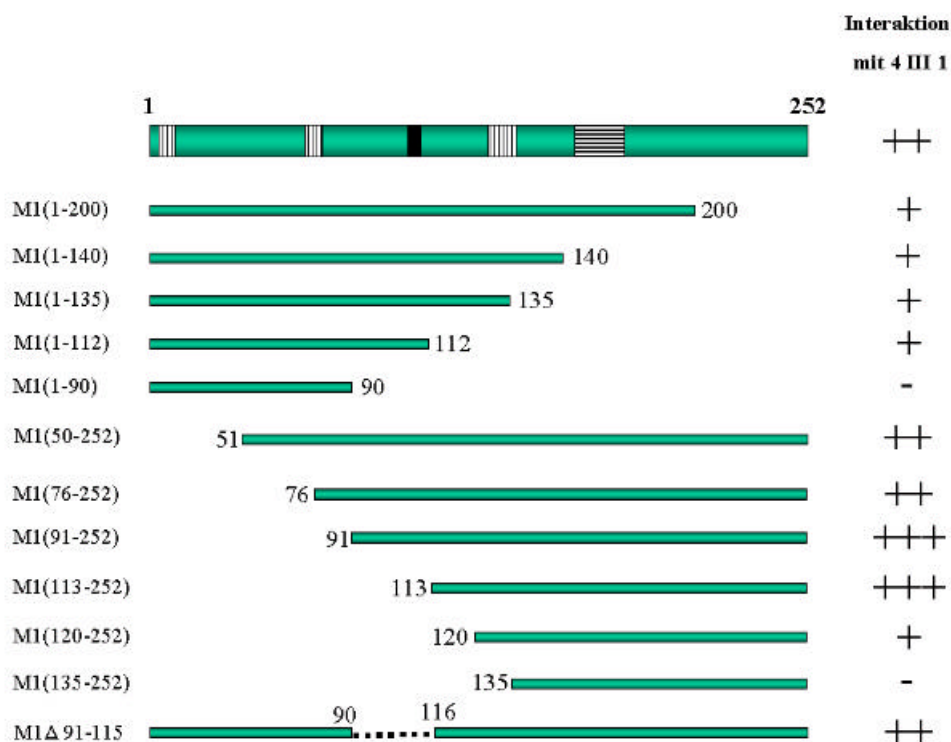
In Abbildung 25 ist eine solche gelelektrophoretische Auftrennung des Präzipitationsansatzes der M1-Protein-Mutante (50 – 252) und des M1-Protein-Wildtyps dargestellt. Anschließend wurden die detektierten Signale mit dem PC-BAS-Programm densitometrisch bestimmt.

Um die erhaltenen PSL-Werte (PSL: photostimulated luminiscense) miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst für jede getestete Mutante der in der GST-Präzipitation erhaltene Wert als Hintergrund von dem der GST-4 III 1-Präzipitation abgezogen. Der dadurch erhaltene, bereinigte Präzipitationswert wurde durch den Total-Wert geteilt. Das ist der densitometrisch erhaltene Wert für 5 % der in die Präzipitation eingesetzten M1-Mutante. Der resultierende Bindungswert für die Mutante wurde anschließend durch den Wert für die jeweils parallel analysierten M1-Wildtyp-Proben (Abbildung 25) geteilt und mit 100 multipliziert. Der sich ergebende Wert gibt die Bindung der Mutante relativ zum Wildtyp in Prozent an.

$$\text{rel. RACK1-Bindung} = \frac{\text{M1-Mut.} \left( \frac{\text{PSL(GST-RACK)} - \text{PSL (GST)}}{\text{PSL(total)}} \right)}{\text{M1-wt} \left( \frac{\text{PSL(GST-RACK)} - \text{PSL (GST)}}{\text{PSL(total)}} \right)} \times 100$$

Zur Absicherung der Daten wurden diese Experimente für jede Mutante dreimal durchgeführt und die sich ergebenden Werte gemittelt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 27 zusammengefasst.

Bei sukzessiver Deletion von Bereichen des carboxyterminalen Endes des M1-Proteins zeigte sich, dass die Bindung an das RACK1-Protein (4 III 1) bei Verkürzung von 112 auf 90 Aminosäuren verloren ging. Im Vergleich zum vollständigen M1-Protein führte die Deletion der C-terminalen 52 Aminosäuren zu einer Reduzierung der Bindefähigkeit. Weitere Verkürzungen bis hin zur Expression der aminoterminalen 112 Aminosäuren hatten keinen weiteren Einfluss auf die RACK1-Bindung. Daraus ließ sich schließen, dass im Bereich der ersten 112 Aminosäuren ein RACK1-bindender Bereich lokalisiert ist, der durch weitere Deletion der Aminosäuren 91 bis 112 inaktiviert wird. Der Bereich der carboxyterminalen 52 Aminosäuren hat auf die RACK1-Bindung einen positiven Einfluss.



**Abbildung 26 Bindung von M1-Protein-Mutanten an RACK1 (GST-4 III 1) im *in vitro* Kopräzipitations-Experiment.** Bakteriell exprimiertes GST-4 III 1 diente zur Präzipitation der benannten M1-Mutanten. Die Stärke des jeweiligen Signals des präzipitierten Proteins wurde densitometrisch erfasst und auf die Menge des eingesetzten Proteins bezogen. Dieser Wert wurde nach Abzug des GST-Hintergrundes auf den Wert der parallel durchgeführten Präzipitation des Wildtyp (Wt)-M1 bezogen. Dadurch ergab sich die folgende Skalierung: -: Hintergrund, +/-: 1 – 10 %; +: 10 – 50 %; ++: 51 – 100 %; +++: > 100 %. Im obersten Balken, der das Wt-M1 darstellt, sind die membranbindenden Domänen als längsgestreifte Bereiche dargestellt, die RNS-bindende Domäne mit dem Kernlokalisierungssignal ist schwarz und die vorhergesagte Zinkfingerdomäne ist quergestreift.

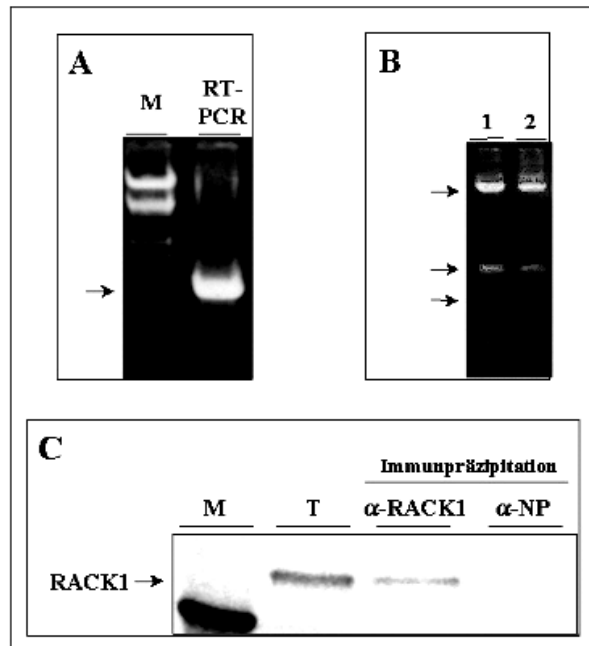
Bei einer aminoterminalen Verkürzung des M1-Proteins um die ersten 50 bzw. 75 Aminosäuren zeigte sich kein Einfluss auf die Bindung an das verkürzte RACK1. Dagegen ließ sich die die RACK1-Bindefähigkeit durch die Entfernung der ersten 90 Aminosäuren des M1-Proteins sogar noch steigern. Dieser Effekt ließ sich ebenfalls beobachten, wenn die ersten 112 Aminosäuren deletiert worden waren. Bei Entfernung von 120 aminoterminalen Aminosäuren war die Bindefähigkeit bis unterhalb des Niveaus des M1-Wildtyps reduziert. Eine Deletion der N-terminalen 134 Aminosäuren führte zum Verlust der RACK1-Bindefähigkeit. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass ein RACK1-bindende Bereich innerhalb der ersten 135 Aminosäuren liegt. Die ersten 90 Aminosäuren banden nicht an das verkürzte RACK1 und ihre Deletion wirkt sich noch steigernd auf die RACK1-Bindefähigkeit des M1-Proteins aus. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Deletion der ersten 120 Aminosäuren die M1-RACK1-Interaktion deutlich reduzierte. Aus diesen Ergebnissen wurde die Annahme abgeleitet, dass die RACK1-Bindefähigkeit des M1-Proteins im Bereich der

Aminosäuren 91 – 134 lokalisiert ist. Zur weiteren Eingrenzung der Bindedomäne diente eine M1-Mutante mit einer internen Deletion (M1  $\Delta$  91 - 115). Es zeigte sich, dass dieses Polypeptid in ungefähr gleichem Maße an das verkürzte RACK1 band wie der M1-Wildtyp. Das ließ den Schluss zu, dass ein RACK1-bindender Bereich zwischen den Aminosäuren 116 und 134 lokalisiert sei. Da die M1-Mutante, der die ersten 120 Aminosäuren fehlten, noch eine Bindung an das verkürzte RACK1 zeigte, war anzunehmen, dass dieser Bereich zwischen den Aminosäuren 121 und 134 läge. Damit ergaben sich zwei Bereiche des M1-Proteins, die an der RACK1-Bindung essentiell beteiligt zu sein scheinen. Eine Region liegt zwischen den Aminosäuren 91 und 112 und eine weitere zwischen den Aminosäuren 120 und 134.

Zur Erzeugung eines rekombinanten Virus, dessen M1-Protein nicht mehr an RACK1 bindet, ist allerdings eine genauere Eingrenzung der Bindungsstellen notwendig, da im Bereich der Aminosäuren 91 – 112 eine Reihe anderer Funktionen des M1-Proteins vermutet werden. Außerdem könnte eine Deletion von insgesamt 29 Aminosäuren einen drastischen und ungewollten Einfluß auf die M1-Proteinstruktur nehmen, wodurch verschiedene Funktionen des Proteins beeinträchtigt würden.

#### 4.7.2 Klonierung der vollständigen RACK1wt-cDNS aus mRNA von HeLa-Zellen

Die im Two-Hybrid Screen isolierten RACK1-cDNS kodierten alle für carboxyterminale Bereiche des Proteins. Es stellte sich die Frage, ob das vollständige RACK1-Protein ebenfalls in der Lage ist, mit dem M1-Protein zu interagieren. Da die kodierende Sequenz für das humane RACK1-Protein bereits beschrieben worden war (Guillemot et al., 1989), konnten daraus die Oligonukleotide hRACK1, 5' und hRACK1, 3' abgeleitet werden, mit denen die cDNS für das gesamte RACK1 spezifisch aus der mRNA von HeLa-Zellen amplifiziert werden konnte. Die mRNA wurde aus HeLa-Zellen mit dem Oligotex direct mRNA – Midi - Kit gemäß der Hersteller-Angaben (Fa. QIAGEN) isoliert. Diese mRNA diente als Matrize für die Synthese der RACK1-cDNS mittels RT-PCR (3.1.2).



**Abbildung 27: Klonierung und Expression der cDNS für das vollständige RACK1 aus HeLa-Zellen.** Poly(A)-RNS aus HeLa-Zellen wurde als Matrize für eine RT-PCR mit RACK1-spezifischen Oligonukleotiden eingesetzt. **A)** Das RT-PCR-Fragment wurde in einem 1 % Agarosegel aufgereinigt. M bezeichnet die Spur des Längensmarkers. Der Pfeil markiert die 947 Bp-Bande. **B)** Die Integration des PCR-Fragments in das Plasmid pTARGET. Die Insertion wurde durch Nachweis der spezifischen Fragmente nach einem Restriktionsverdau mit Xho I/Sal I in einem 1 % Agarosegel bestätigt. Die Pfeile markieren die Positionen der Markerbanden für 5,1 kbp, 831 Bp und 564 Bp. **C)** Das Plasmid pTARGET-RACK1wt wurde als Matrize für eine *in vitro*-Expression mit dem TNT Coupled Reticulocyte Lysate System in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin eingesetzt. Mit dem Reaktionsansatz wurde im Anschluss eine Immunpräzipitation mit α-RACK1-Antikörper (Spur α-RACK) bzw. α-NP-Antikörper (Spur α-NP) durchgeführt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden die radioaktiven Signale auf Röntgenfilm dokumentiert. Zur Kontrolle wurden 10 % des in die Präzipitation eingesetzten TNT-Ansatzes auf das Gel aufgetragen (Spur T). Die Position des RACK1wt-Proteins ist durch einen Pfeil angezeigt. Die Bande in der Markerspur (M) hat eine Größe von 29 kDa.

Das aus der PCR gewonnene ca. 1.000 Bp lange DNS-Fragment (Abbildung 27, A) wurde in den Vektor pTARGET integriert. In einem Kontrollverdau wurde das Vorhandensein des PCR-Produktes im Plasmid bestätigt (Abbildung 27, B). Da das pTARGET-Plasmid über einen T7-RNS-Polymerase-Promotor verfügt, wurde eine *in vitro* – Proteinexpression mit dem neu erzeugten Plasmid pTARGET-RACK1wt (Wildtyp) durchgeführt. Dabei ließ sich entsprechend der Erwartung ein ca. 36 kDa großes Protein synthetisieren, das mit einem α-RACK1-Antikörper (Transduction Laboratories) spezifisch präzipitiert werden konnte (Abbildung 27, C). In einer nachfolgenden konnte das Vorhandensein und die Integrität des gesamten Leserahmens für RACK1 nachgewiesen werden.

Der gesamte Leserahmen des RACK1 wurde anschließend in das Expressionsplasmid pcDNA 3.1 myc/his umklontiert. Dieses Plasmid dient zur Expression eines Proteins in eukaryontischen Zellen. Durch das zusätzliche myc-Signal läßt sich das exprimierte RACK1 von endogenem Protein unterscheiden. Das erhaltene DNS-Fragment wurde nach Verdau mit

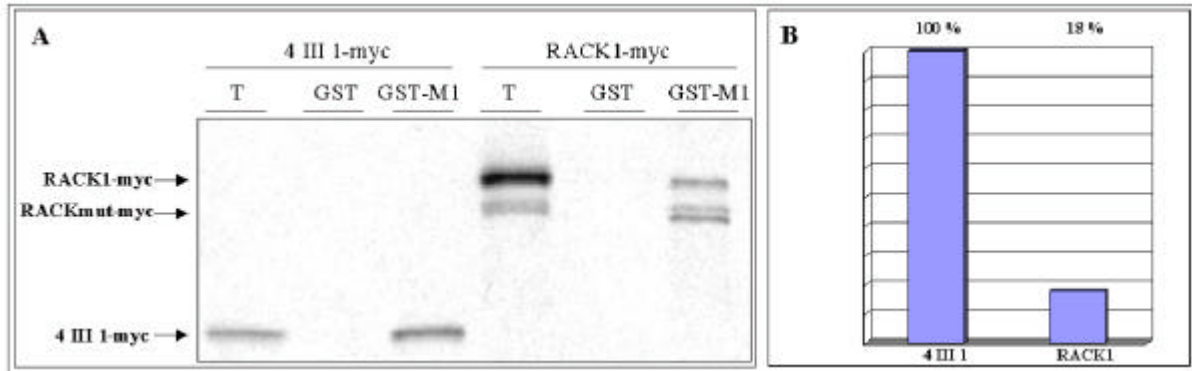
BamHI/Xho I in das ebenso geschnittene Plasmid pcDNA 3.1 his/myc integriert. Die Integrität des Leserahmens wurde durch Sequenzierung nachgewiesen.

Das RACK1-Polypeptid 4 III 1 wurde ebenfalls in das Plasmid pcDNA 3.1 his/myc integriert. Dazu wurde über PCR ein Transkriptionsstart-Kodon im Rahmen einer Kozak-Sequenz (Kozak, 1984) vor das erste Kodon der im Two Hybrid-Screen isolierten cDNS platziert. Außerdem wurde zur Expression des myc-Epitops am 3'-Ende der cDNS-Sequenz das Stop-Kodon entfernt. Die Integration der so amplifizierten cDNS in das Plasmid pcDNA 3.1 myc/his wurde durch Sequenzierung bestätigt.

#### 4.7.3 Bindung des M1-Proteins an das vollständige RACK1

In einem Kopräzipitationsassay wurde die Bindung des vollständigen RACK1-Proteins (RACK1wt) und die Bindung des verkürzten RACK1-Polypeptid 4III 1 an das M1-Protein untersucht und verglichen. RACK1wt und 4 III 1 wurden dazu *in vitro* synthetisiert und mit bakteriell exprimiertem GST-M1-Protein bzw. GST allein, die an Glutathion-Sepharose immobilisiert worden waren, inkubiert.

Das RACK1wt zeigte eine 1,15 %ige Bindung an das M1-Protein, bezogen auf die eingesetzte Menge an radioaktiv markiertem Protein. Dagegen wurde das 4 III 1 vom M1-Protein mit hoher Effizienz präzipitiert: Das Signal in der GST-M1-Spur entspricht 6,4 % der eingesetzten Proteinmenge. Setzt man willkürlich die Intensität des gebundenen 4III 1-myc als 100 %, so zeigt das vollständige RACK1 nur 18 % der Präzipitationseffizienz (Abbildung 29, B). Interessanterweise wurde ein RACK1-Fragment, das bei der *in vitro*-Synthese als Nebenprodukt entstanden war, mit höherer Effizienz gebunden als RACK1wt. Eine densitometrische Bestimmung ergab für das RACKmut genannte Fragment eine Bindung von 4,7 % der korrespondierenden Proteinmenge.



**Abbildung 28: Bindung von RACK1wt und 4 III 1 an GST-M1-Protein.** **A)** *In vitro* synthetisiertes und mit [<sup>35</sup>S]-Methionin markiertes RACK1wt (RACK1-myc) bzw. 4 III 1 (4 III 1-myc) wurden mit bakteriell exprimiertem, an Glutathion-Sepharose immobilisiertem GST-M1 bzw. GST inkubiert. Die Proben wurden gelelektrophoretisch getrennt. Parallel dazu wurden 5 % der *in vitro*-Expressionsansätze mit aufgetrennt (Spuren T). Die Radioaktivität wurde auf Röntgenfilm dokumentiert. **B)** Nach dem Scannen des Röntgenfilms wurden die Signale der Proteinbanden mit dem Programm Tina 2.09 (Ray-Test) densitometrisch erfasst. Die Werte der vom GST-M1-Protein präzipitierten Proteine 4 III 1, RACK1 und dem Proteinfragment RACKmut wurden auf die korrespondierenden Mengen des eingesetzten Proteins bezogen. Zum Vergleich der M1-Bindung von RACK1wt und 4 III 1 wurde die Präzipitationseffizienz des RACK1wt auf die des 4 III 1 bezogen, die dazu als 100 % definiert wurde.

RACKmut ist ca. 3 kDa kleiner als RACK1wt und könnte unter Verwendung eines alternativen Transkriptionsstart-Kodons synthetisiert worden sein. Tatsächlich findet sich 90 Nukleotide unterhalb des eigentlichen Start-Kodons eine Nukleotidsequenz um das ATG des Methionin 30, die als Transkriptionsstart dienen kann: <sub>180</sub>**GAC ATG ATC**<sub>188</sub> (Sequenzangaben gemäß (Guillemot et al., 1989)). Die durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotide stellen eine sogenannte Kozak-Sequenz dar. Wenn es sich bei dem RACKmut tatsächlich um ein daraus resultierendes Polypeptid mit einer N-terminalen Verkürzung von 30 Aminosäuren handelt, wäre das ein Hinweis darauf, dass die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein durch diese ersten 30 Aminosäuren reguliert würde.

#### 4.7.4 Untersuchung zur Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein: Einfluss der Überexpression von RACK1 in der infizierten Zelle

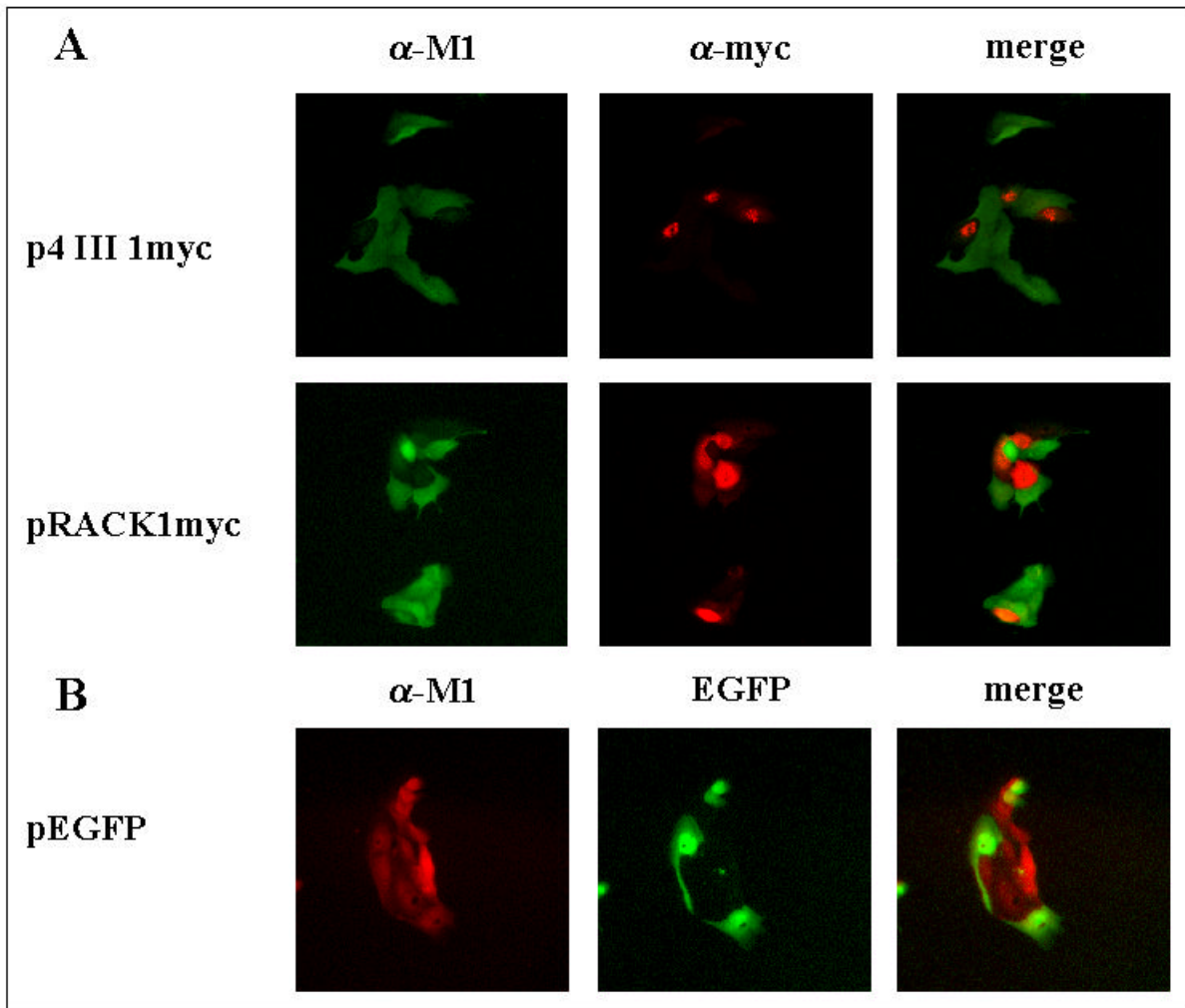
Das M1-Protein ist zur Erfüllung verschiedener Funktionen im Verlauf der Infektion in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert. Die Überexpression des RACK1 könnte in infizierten Zellen zu einer verstärkten Bindung des M1-Proteins führen, wodurch es diese Funktionen nicht mehr oder nur noch eingeschränkt wahrnehmen könnte. Da das verkürzte RACK1-Polypeptid eine stärkere Bindungsaffinität für das M1-Protein aufweist (4.7.3.), könnte das M1-Protein durch dessen Anwesenheit quantitativ gebunden werden. Eine solche quantitative Bindung würde die anderen Funktionen des M1-Proteins blockieren und so einen dominant-negativen Effekt auf das M1-Protein ausüben. Eine Bestimmung des Zeitpunktes



der Blockade im Infektionsverlauf und eine Lokalisation der RACK1-M1-Protein-Komplexe könnte weiteren Aufschluß über die Funktion der Interaktion geben.

Um zu untersuchen, ob RACK1 einen derartigen Effekt auf das M1-Protein ausüben kann, wurde in MDCKII-Zellen das Plasmid pcDNA-RACK1wt-myc transient transfektiert. Parallel dazu wurde das Expressionsplasmid pcDNA 4 III 1-myc transfektiert, da aufgrund der höheren Affinität des verkürzten RACK1 zum M1-Protein eine Verstärkung des Effektes erwartet wurde. Nach 24-stündiger Inkubation ließ sich eine Transfektionseffizienz von 80 % der Zellen anhand der Eigenfluoreszenz des EGFP nachweisen, das vom Kontrollplasmid pEGFP-N1 kodiert wurde. Die Zellen wurden mit Influenza A/WSN/33 Viren bei einer MOI von 10 infiziert und acht Stunden im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle wurden Mock-Infektionen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse unterzogen. Dazu wurden die mit pcDNA-RACK1myc und die mit pcDNA-4 III 1myc transfizierten Zellen mit einem Kaninchen-Antiserum gegen das M1-Protein und einem monoklonalem myc-spezifischem IgG-Antikörper inkubiert. Die mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen wurden nur mit dem  $\alpha$ -M1-Antikörper inkubiert. Der  $\alpha$ -myc-Antikörper wurde durch Inkubation mit einem Texas-Red (TR)-gekoppelten  $\alpha$ -Maus IgG-Sekundärantikörper detektiert. Die Detektierung des  $\alpha$ -M1-Antiserums erfolgte in den Doppelfluoreszenzen mit einem Fluorescein-Isothiocyanat (FITC)-gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper. In den mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen wurde der  $\alpha$ -M1-Antikörper mit TR-gekoppeltem  $\alpha$ -Kaninchen-IgG-Antikörper markiert.

Hier zeigte sich, dass das M1-Protein nur in einer geringen Zahl der Zellen, die die RACK1-Mutante 4 III 1 überexprimierten, nachgewiesen werden konnte (Abbildung 29, **A**). Die umliegenden Zellen, die kein 4 III 1 überexprimierten, zeigten deutliche M1-Proteinexpression, so dass der Effekt auf die Überexpression des 4 III 1 zurückgeführt werden konnte. Dagegen ließ sich in fast allen Zellen, die das autofluoreszierende EGFP exprimierten, das M1-Protein nachweisen (Abbildung 29, **B**). Daraus folgte, dass die Inhibition der M1-Proteinsynthese nicht unspezifisch durch die Transfektion, sondern durch die Expression der RACK1-Mutante verursacht wurde. Die Überexpression des RACK1wt hatte in ungefähr der Hälfte der beobachteten Zellen ebenfalls eine Inhibition der M1-Proteinsynthese zur Folge (Abbildung 29, **A**). Der Anteil an Zellen, in denen dieser Effekt beobachtet wurde, erschien also geringer als bei Überexpression des verkürzten RACK1-Proteins 4 III 1.

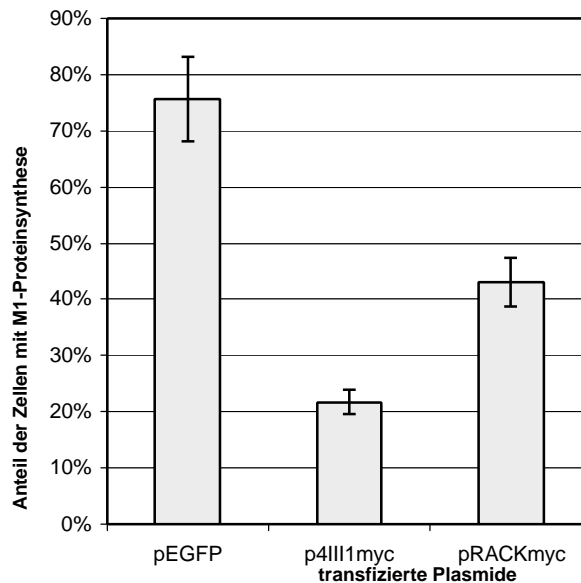


**Abbildung 29: Analyse der Expression vom M1-Protein in Influenza A Virus-infizierten Zellen nach Überexpression von RACK1.** MDCKII-Zellen, die **A**) mit p4 III 1, pRACK1wt oder **B**) pEGFP-N1 transfiziert worden waren, wurden mit Influenza A/WSN/33 Viren infiziert (MOI: 10). Acht Stunden nach der Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit Antikörpern gegen das M1-Protein ( $\alpha$ -M1) und gegen das myc-Epitop ( $\alpha$ -myc) inkubiert. **A**) Zum parallelen Nachweis von RACK1 und dem M1-Protein wurden die Primärantikörper mit TR- (myc) bzw. FITC- (M1) gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. **B**) Der  $\alpha$ -M1-Primärantikörper wurde mit TR-gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Die Fluoreszenzen der Sekundärantikörper bzw. die Eigenfluoreszenz des EGFP (**EGFP**) wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop detektiert und mit einer Digitalkamera dokumentiert. Die Bildüberlagerungen (**merge**) wurden anschließend mit der Software „Spot 2.1.2“ (Diagnostic instruments inc.) erstellt.

Zur statistischen Absicherung dieser Befunde wurde durch Auszählung der Anteil an Zellen bestimmt, bei denen das M1-Protein nach der Überexpression von 4 III 1-myc bzw. RACK1wt-myc nachgewiesen werden konnte. Dieses Experiment wurde dreimal wiederholt.

Dabei wurden jeweils 120 bis 140 Zellen ausgezählt, die erkennbar EGFP exprimierten, 50 bis 70 Zellen, die 4 III 1-myc exprimierten und 35 bis 90 Zellen, in denen RACK1wt-myc nachweisbar war. Davon ließ sich das M1-Protein in 54 bis 92 % der EGFP-exprimierenden Zellen, in 16 bis 30 % der 4III 1-myc-exprimierenden und in 34 bis 49 % der Zellen, die RACK1wt-myc exprimierten, nachweisen.

Zusammengefasst konnte bei 76 ( $\pm$  20) % der insgesamt gezählten 347 EGFP-exprimierenden Zellen eine gleichzeitige M1-Proteinsynthese nachgewiesen werden. Dagegen zeigten nur 22 ( $\pm$  7) % der insgesamt gezählten 180 4 III 1-myc-exprimierenden Zellen eine M1-Protein-spezifische Fluoreszenz. Bei den betrachteten 200 Zellen, die RACK1wt-myc überexprimierten, fand in 43 ( $\pm$  8) % der Fälle eine M1-Proteinsynthese statt.



**Abbildung 30: Prozentualer Anteil der transfizierten Zellen, bei denen die M1-Proteinsynthese in der Immunfluoreszenz nachgewiesen werden konnte.** MDCKII-Zellen wurden 24 Stunden nach Transfektion mit den Plasmiden pEGFP-N1 (**pEGFP**), pcDNA-4 III 1-myc (**p4III1myc**) oder pcDNA-RACK1wt-myc (**pRACKmyc**) mit Influenza A/WSN/33 Viren infiziert. Nach acht Stunden wurden die Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert. Dabei wurde der prozentuale Anteil der Zellen erfasst, in denen sich nach Überexpression der plasmid-kodierten Proteine das M1-Protein nachweisen ließ. In der obigen Tabelle sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

Damit konnte belegt werden, dass die Überexpression des N-terminal verkürzten RACK1-Polypeptids 4 III 1, im Gegensatz zu überexprimiertem EGFP die Expression des viralen M1-Proteins inhibiert. Diese Inhibition findet in geringerem Umfang statt, wenn das vollständige RACK1 in Zellen überexprimiert wird. Der genaue Mechanismus dieses Effektes ist noch unklar.

## 5 Diskussion

Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel und stellen deshalb die Syntheseleistungen der Wirtszelle in den Dienst ihrer Vermehrung. Zu diesem Zweck müssen eine Vielzahl von viralen mit zellulären Komponenten interagieren. Durch die Identifikation von zellulären Interaktionspartnern viraler Komponenten lassen sich daher ebenso Einsichten über die Virusvermehrung wie über zelluläre Prozesse erhalten.

Ein Teil der Funktionen des M1-Protein könnte durch Interaktion mit zellulären Komponenten vermittelt werden. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen von Virus-Reassortanten unterstützt, die sich nur im M-Segment unterscheiden. Bei diesen Experimenten war die Attenuierung eines speziellen aviären Virusstammes bei der Kultivierung in Primaten als Funktion des M1-Proteins identifiziert worden. (Murphy et al., 1989). Daraus läßt sich schließen, dass das M1-Protein aus dem aviären Virus mit Komponenten in Primatenzellen nicht in dem Ausmaß interagieren kann, wie mit Komponenten der natürlichen Wirtszelle.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde nach zellulären Interaktionspartnern des M1-Proteins des Influenza A Virus gesucht. Das M1-Protein ist an unterschiedlichen Prozessen der Virusvermehrung beteiligt. Dazu gehören der Kerntransport der vRNPs (Martin & Helenius, 1991), die Regulation der viralen Transkription (Hankins et al., 1990; Perez & Donis, 1998; Watanabe et al., 1996; Ye et al., 1989) und der Zusammenbau der Tochtervirionen an der Wirtszellmembran (Gómez-Puertas et al., 2000; Kretzschmar et al., 1996; Lenard, 1996; Patterson et al., 1988; Zhang & Lamb, 1996; Zhirnov, 1992).

### 5.1 Isolierung von zellulären Interaktionspartner des viralen M1-Proteins durch das HefeTwo Hybrid-System

Zur Isolierung von zellulären Interaktionspartnern des viralen M1-Proteins wurde das Hefe Two Hybrid-System verwendet. Der Vorteil gegenüber herkömmlichen biochemischen Methoden zur Isolierung von Protein-Protein-Interaktionspartnern liegt in der schnellen Verfügbarkeit der cDNS-Sequenz des gefundenen Proteins und damit seiner einfachen Identifizierung. Ein Vorteil der „interaction trap“ (Finley & Brent, 1996) gegenüber anderen

Two Hybrid Systemen liegt in den systemintegrierten Kontrollen zum Ausschließen von falsch-positiven Klonen:

- Das System verfügt über ein Testsystem zur Funktionalität des „Köder“-Proteins (Expression, Kern-Import und fehlende eigene Transkriptionsaktivität)
- Außerdem werden zwei Reportergene nachgewiesen, deren unabhängige Aktivierung durch Galaktose induziert wird.

Im Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Testprozeduren konnten so zahlreiche Klone, die zunächst als positiv erachtet wurden, als Falsch-Positiv erkannt und ausgeschlossen werden (zusammengefasst in Tabelle 3). Am Ende wurden vom ersten Screen zehn und vom zweiten Screen elf Hefeklone selektiert, in denen reproduzierbar beide Reportergene aktiviert wurden.

## 5.2 Sequenzanalyse der gefundenen Interaktionspartner des M1-Proteins

Die Sequenzierung der Genbank-Plasmide ergab, dass vier der Genbank-Plasmide für den Rezeptor der aktivierten C-Kinase (RACK1) kodieren, zwei für Striatin und einer für Syndecan-4. Zwei Klone enthielten nicht-identifizierte cDNS-Sequenzen. Die von diesen 9 Plasmiden kodierten Polypeptide wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, biochemisch mit dem M1-Protein zu interagieren.

Die Sequenzierung der restlichen zwölf Genbank-Plasmide ergab, dass diese nicht für zelluläre Polypeptide kodierten. Es handelte sich hierbei um cDNS-Sequenzen, bei denen die Leserahmen entweder bei der Insertion verschoben oder in 3'-5'-Orientierung integriert worden waren. Solche Effekte ergeben sich durch die Klonierungsstrategie der cDNS-Genbank. Die mRNA war vom 3'-Ende her mit Oligo-dT-Primern in cDNS umgeschrieben und anschließend am 5'-Ende mit einer Linker-DNS versehen worden, an welcher der 5'-Primer hybridisiert. Dabei wird der Leserahmen der verwendeten cDNS nicht berücksichtigt, so dass statistisch nur jede dritte erzeugte cDNS gemäß ihres kodierenden Leserahmens integriert wird. Eine umgekehrte Insertion der cDNS-Sequenz in das Genbank-Plasmid ist zu einem geringen Prozentsatz möglich, da die Erkennungsstellen der zur Ligation verwendeten Restriktionsenzyme natürlicherweise auch in den cDNS-Fragmenten vorkommen können. Die von diesen zwölf Plasmiden kodierten Polypeptide wiesen im Sequenzvergleich mit der

Embl-Datenbank keine Ähnlichkeit zu bekannten Proteinen oder Domänen auf und wurden daher nicht weiter untersucht.

### 5.3 Biochemische Überprüfung der im Two Hybrid-Screen isolierten M1-Protein-Interaktionspartner

Der genetische Nachweis einer Protein-Protein-Interaktion im Two Hybrid System ist indirekt und erfordert die Bestätigung durch eine biochemische Methode. Dabei muss nachvollziehbar sein, dass der gefundene Interaktionspartner direkt mit dem „Köder“-Protein interagieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein *in vitro*-Kopräzipitationsassay verwendet, bei dem eines der beiden interagierenden Proteine über die Glutathion-S-Transferase (GST) an die Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose gebunden wird und somit seinen Interaktionspartner aus dem Reaktionsansatz präzipitieren kann.

Mit Hilfe dieses GST-vermittelten *in vitro*-Kopräzipitationsansatz konnte gezeigt werden, dass RACK1-Polypeptide das M1-Protein aus Influenza A Virus-infizierten MDCKII-Zellen selektiv präzipitieren konnten (Abbildung 13). RACK1 war ursprünglich über seine Fähigkeit isoliert worden, die Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase C (PKC) in ihrer aktivierten Form zu binden (Ron et al., 1994). Da RACK1 aus der Membranfraktion isoliert werden konnte, in der sich die PKC nach ihrer Aktivierung anlagerte, wurde postuliert, dass RACK1 die aktivierte PKC in räumlicher Nähe zu spezifischen Kinasesubstraten verankert (Mochly-Rosen et al., 1995). Mittlerweile wurde dieses Modell insofern modifiziert, dass RACK1 die aktivierte PKC im Zytoplasma bindet und an die Membran transportiert (Ron et al., 1999). Die Struktur des RACK1 besteht aus sieben WD-Domänen. Diese Domänen bilden antiparallele  $\beta$ -Faltblätter aus, die wie Flügel eines Propellers zueinander angeordnet sind (Smith et al., 1999). Dies gilt auch für Teilbereiche von WD-Domänen-Proteinen (Garcia-Higuera et al., 1996) und somit vermutlich auch für die isolierten RACK1-Proteinfragmente, die mit dem M1-Protein interagieren.

Durch die beiden im Two Hybrid Screen isolierten Striatin-Polypeptide wurde das M1-Protein in der *in vitro*-Kopräzipitationsanalyse nur in geringem Maße erkannt (zusammengefasst in Abbildung 13). Das NP- und das NS 1-Protein wurden in stärkerem Maße gefällt. Da sich die

genetisch gefundene Interaktion zwischen Striatin und dem M1-Protein biochemisch bei beiden Polypeptiden nicht bestätigen ließ, wurde diese nicht weiter untersucht.

Das Syndecan-4-Proteinfragment präzipitierte das M1-Protein und in geringerem Ausmaß die viralen Proteine NP und NS1 (Abbildung 13). Deren Präzipitation von NP und NS1 könnte auf die Bindung von vRNP-Komplexen an das M1-Protein zurückzuführen sein. Es ist allerdings auch denkbar, dass Syndecan-4 zu einem gewissen Grad an andere virale Komponenten bindet. Der im Two Hybrid-Screen isolierte Syndecan-4-Leserahmen umfasst neben der zytoplasmatischen auch die gesamte transmembranale und einen Teil der extrazellulären Domäne des Proteins. Diese Bereiche könnten ebenfalls für die Präzipitation des NP und des NS1, aber auch für die gefundene Interaktion mit dem M1-Protein verantwortlich sein. Daher müsste zunächst geklärt werden, dass die Interaktion mit dem M1-Protein nicht auf den Bereich der extrazellulären Domäne des Syndecan-4 beschränkt ist. Erst dann wäre eine weitere Charakterisierung der Interaktion sinnvoll. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen Syndecan-4 und dem M1-Protein jedoch nicht weiter analysiert.

Das auf dem im Two Hybrid-Screen identifizierten Genbankplasmid pJG-3 I 7 kodierte Polypeptid wies eine Homologie zu einer humanen mRNS eines noch unbekanntes Proteins auf. Das von dieser cDNS kodierte Polypeptid zeigte im Kopräzipitationsansatz keine Spezifität für das M1-Protein (Abbildung 13) und wurde nicht weiter untersucht.

#### 5.4 Die Fähigkeit, mit RACK1 zu interagieren, ist bei M1-Proteinen von Influenza A Virusstämmen mit unterschiedlicher Wirtsspezifität konserviert

RACK1 ist durch die Evolution bemerkenswert hoch konserviert, was auf eine wichtige physiologische Rolle dieses Proteins hinweist. So sind die RACK1-Proteine von Hühnern, Schweinen und Menschen auf der Aminosäure-Ebene identisch. Da diese drei Spezies von Influenza A Viren befallen werden können, stellte sich die Frage, ob RACK1 mit M1-Proteinen aus Influenzaviren mit unterschiedlicher Wirtsspezifität interagieren könnten. Im Kopräzipitationsansatz konnte gezeigt werden, dass RACK1 mit den unterschiedlichen M1-Proteinen des aviären Influenza A/FPV/Ro/34, des porcinen Influenza A/Swi/Wis/1/67 und

des Maus-adaptierten, humanpathogenen Influenza A/WSN/33 Virus-Stammes interagieren konnte (Abbildung 15). Diese Stämme sind Repräsentanten von drei hauptsächlichen evolutionären Richtungen, die sich bei einem Sequenzvergleich der M-Segmente von 42 Influenza A Virusstämmen ergeben (Ito et al., 1991). Aus diesen Ergebnissen läßt sich folgern, dass die Interaktion zwischen dem viralen M1-Protein und dem zellulären RACK1 zwischen aviären, porcinen und humanpathogenen Viren und ihren jeweiligen Wirten konserviert ist und von daher eine wichtige Rolle im Verlauf der Infektion darstellen könnte.

## 5.5 Die Interaktion zwischen dem M1-Protein und RACK1 spielt vermutlich keine Rolle bei der viralen Knospung an der Zellmembran

Für RACK1 war ursprünglich eine Funktion als Membrananker der aktivierten PKC postuliert worden (Mochly-Rosen et al., 1995). Eine Fraktion des M1-Proteins ist an die Plasmamembran assoziiert, wo es eine Rolle beim Prozess der Abknospung von neugebildeten Virionen spielt. Aus diesen Punkten erwuchs die Frage, ob die Interaktion zwischen dem M1-Protein und RACK1 eine Rolle bei diesem Prozess spielt. Ein analoger Vorgang konnte bei Rhabdoviren nachgewiesen werden, bei denen das Matrixprotein mit zellulären WW-Domänen-Proteinen interagiert. Durch eine Blockade dieser Interaktion läßt sich die Abknospung von Virionen inhibieren (Harty et al., 1999). Es ist denkbar, dass das Matrixprotein der Influenzaviren zu einem solchen Zweck mit dem WD-Domänenprotein RACK1 interagiert. Dabei könnte RACK1 in neugebildete Virionen eingebaut werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in einem Western Blot getestet, ob sich RACK1 in Influenza A Virus-Partikeln nachweisen ließ, die aus infizierten Hühnereiern aufgereinigt worden waren. Es zeigte sich jedoch, dass RACK1 sich in den Virionen nicht nachweisen ließ (Abbildung 18). Daraus wurde gefolgert, dass RACK1 nicht in Virionen inkorporiert wird. Dieser Befund schließt jedoch eine Beteiligung von RACK1 bei der Membranverankerung des M1-Proteins nicht aus. Vielmehr könnte das RACK1 im Zuge der Virusmorphogenese aus den entsprechenden Membranbereichen verdrängt werden. Deshalb wurde untersucht, ob in Influenza A Virus-infizierten Zellen RACK1 zusammen mit dem M1-Protein an Membranen gebunden vorliegt.



Mit dem Lysat infizierter MDCKII-Zellen wurde eine Flotationsgradientenzentrifugation durchgeführt. Die Membran- und Zytoplasma-haltigen Fraktionen des Gradienten wurden mittels Immunpräzipitationen auf die Anwesenheit von RACK1 bzw. M1-Protein analysiert. In einer Western-Blot-Analyse dieser Immunpräzipitate konnte gezeigt werden, dass RACK1 unter diesen Bedingungen nur zytoplasmatisch lokalisiert war, während das M1-Protein sowohl in der Zytoplasma- als auch in der Membranfraktion nachweisbar war (Abbildung 20). Dies wurde auch durch indirekte Immunfluoreszenz-Analysen von infizierten Zellen belegt: Bei Parallelfärbungen gegen RACK1 und gegen das M1-Protein ließen sich beide Proteine im Zytoplasma um den Zellkern zeigen, während nur das M1-Protein, aber nicht das RACK1 an der Zellmembran detektiert werden konnte (Abbildung 20). Somit ist eine direkte Beteiligung des RACK1 bei der Virusassemblierung an der Zellmembran eher unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass sich RACK1 nicht an der Zellmembran nachweisen ließ, erscheint im Widerspruch zu Publikationen, die RACK1 in einer als „particulate fraction“ bezeichneten Zellfraktion nachweisen (Ron et al., 1994). Da mittlerweile konnte gezeigt werden, dass RACK1 erst nach der Aktivierung der PKC mit dieser an die Membran relokalisiert (Ron et al., 1999), erscheint es möglich, dass es in der untersuchten Spätphase der Infektion nicht an die Membran assoziiert vorliegt. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch noch unklar. Da unter vergleichbaren Bedingungen das RACK1 auch in Mock-infizierten Zellen nicht an der Plasmamembran nachgewiesen werden konnte, konnte es jedoch nicht geschlossen werden, dass das M1-Protein eine RACK1-Relokalisation verhindert.

## 5.6 Das M1-Protein wird durch die Protein Kinase C (PKC) phosphoryliert

Im Verlauf des Influenza A Virus-Infektionszyklus werden sechs der zehn viralen Proteine phosphoryliert: das M1-Protein, NP, NS1, NEP/NS2, PA und M2. Die genaue Bedeutung der Phosphorylierungen ist bis heute nicht geklärt. Ebenso sind größtenteils die zellulären Kinasen, die die viralen Proteine phosphorylieren, unbekannt. Ungeachtet dessen läßt sich sagen, dass Phosphorylierungen für den Verlauf der Infektion vermutlich unerlässlich sind, da Kinase-Inhibitoren wie das Isoquinolin-Sulphonamid H7, das die Proteinkinasen A und C inhibiert, die virale Replikation und auf die Expression viraler Proteine inhibieren (Kistner et al., 1989).

Das M1-Protein wird durch bisher nicht identifizierte Kinasen an Serin- und Threoninresten phosphoryliert (Gregoriades et al., 1984; Gregoriades et al., 1990). Da bekannt ist, dass Funktionen und zelluläre Lokalisation einer Vielzahl von Proteinen durch Phosphorylierungen reguliert sind (Hunter, 1995), erscheint es möglich, dass dieses auch beim M1-Protein der Fall ist. Die M1-Phosphorylierung ist bisher nur am Beispiel des Influenza A Virusstammes WSN/33 untersucht worden (Gregoriades et al., 1984). Möglicherweise ist die M1-Proteinphosphorylierung bei diesem Influenza A Virusstamm leichter nachweisbar als bei anderen Virusstämmen. Dies deckt sich mit Hinweisen anderer Gruppen, die versucht haben, eine Phosphorylierung an M1-Proteinen anderer Stämme nachzuweisen (Kistner et al., 1989).

Da insgesamt sechs virale Proteine phosphoryliert werden, ist es schwierig zu entscheiden, wie stark der Einfluss der Inhibition der M1-Proteinphosphorylierung auf den antiviralen Effekt des Kinase-Inhibitors ist. Whittaker und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Wachstumsdefekt der Temperatur-sensitiven Influenzavirus-Mutante *ts51* auf eine neuentstandene Phosphorylierungsstelle im M1-Protein zurückzuführen ist. Die daraus resultierende Hyperphosphorylierung des M1-Proteins führt bei der nicht-permissiven Temperatur zu einer exklusiven Akkumulation des M1-Proteins im Zellkern (Whittaker et al., 1995). Aus dieser Beobachtung wurde angenommen, dass die intrazelluläre Lokalisierung des M1-Proteins auch durch Phosphorylierung reguliert werden könnte.

RACK1 war durch seine Eigenschaft identifiziert worden, spezifisch die aktivierte PKC binden zu können. Daher wurde untersucht, ob das M1-Protein durch die PKC phosphoryliert werden kann. In diesem Falle könnte die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein bei dessen Phosphorylierung durch die PKC eine Rolle spielen. Bis zu diesem Zeitpunkt war noch kein Enzym beschrieben worden, das das M1-Protein phosphorylieren kann. Deshalb wurde zunächst eine computergestützte Suche nach potentiellen Phosphorylierungsstellen in der M1-Proteinsequenz durchgeführt. Dabei wurden drei potentielle Erkennungsstellen für die PKC und zwei für die Caseinkinase II (CKII) identifiziert. In den PKC-Erkennungssequenzen fanden sich zwei Serinreste und ein Threonin, während für die CKII nur Threoninreste als Phosphorylierungsziele vorhergesagt wurden. Da aus der Literatur hervorging, dass im M1-Protein hauptsächlich Serin- und nur in geringem Umfang Threoninreste phosphoryliert werden (Gregoriades et al., 1984), war diese Tatsache ein Hinweis darauf, dass die PKC bei der Phosphorylierung des M1-Proteins eine Rolle spielen könnte. In Kinasierungsexperimenten konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass

aufgereinigte PKC in der Lage ist, sowohl bakteriell exprimiertes als auch aus Virionen aufgereinigtes M1-Protein zu phosphorylieren (Abbildung 22 und Abbildung 23). Die parallel getestete CKII war dazu nicht in der Lage, obwohl die Versuche mit erheblich höherer spezifischer Aktivität der Kinase durchgeführt wurden. Darüber hinaus ließ sich bakteriell exprimiertes M1-Protein auch mit Extrakten aus MDCKII-Zellen phosphorylieren. Diese Kinaseaktivität ließ sich signifikant durch die Zugabe des PKC-spezifischen Kinaseinhibitors GF109203X (Toullec et al., 1991) reduzieren (Abbildung 24). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das M1-Protein in infizierten Zellen hauptsächlich durch PKC phosphoryliert wird. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das M1-Protein von den Isoformen PKC $\gamma$ , PKC $\alpha$  und PKC $\beta$ II phosphoryliert werden konnte (Tabelle 5). Diese gehören der Gruppe der klassischen PKC (cPKC) an, die alle über die RACK1-bindende C2-Region verfügen (Ron et al., 1995). Da das M1-Protein durch Kinase-Isoformen phosphoryliert werden kann, die auch an RACK1 binden können, ist es vorstellbar, dass die Interaktion zwischen dem viralen M1-Protein und RACK1 bei dieser Phosphorylierung eine regulierende Rolle spielt.

## 5.7 RACK1 bindet an mindestens zwei Bereiche des M1-Proteins

Das dritte postulierte Modell zur Bedeutung der RACK1-M1-Interaktion im Verlauf der viralen Infektion ist funktionaler Art. Durch die Bindung des M1-Proteins an das zelluläre RACK1 können dessen normale Funktionen verändert werden. Dabei ist denkbar, dass eine derartige Funktionsänderung entweder im Dienste der viralen Vermehrung oder eines zellulären Abwehrmechanismus steht. Um eine derartige Fragestellung im Kontext einer Influenzavirus-infizierten Zelle zu untersuchen, wurde geplant, ein rekombinantes Virus zu erzeugen, dessen M1-Protein nicht mehr in der Lage ist, mit RACK1 zu interagieren.

Seit einiger Zeit stehen Systeme zur Verfügung, um mittels reverser Genetik rekombinante Influenza A Viren mit Mutationen in jedem beliebigen Gensegment zu erzeugen und deren Einfluss auf die Virusvermehrung zu untersuchen (Fodor et al., 1999; Neumann et al., 1999). Um mit Hilfe dieses Systems die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein analysieren zu können, wurde zunächst versucht, den Bereich des M1-Proteins, an den das RACK1 bindet, möglichst exakt zu kartieren. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass eine Mutation möglichst keine andere Funktion des M1-Proteins betrifft.

Zur Eingrenzung der RACK1-Bindedomäne wurden *in vitro* synthetisierte M1-Mutanten auf ihre Fähigkeit untersucht, an bakteriell exprimiertes RACK1 zu binden. Aus den Experimenten ließ sich schließen, dass zwei Bereiche des M1-Proteins für die Bindung an RACK1 notwendig waren: die Aminosäuren 91 – 112 und 120 – 134 (Abbildung 27). Beide Bereiche vermitteln unabhängig voneinander eine Bindung an RACK1, da Deletionsmutanten, denen einer der Bereiche fehlt, weiterhin an RACK1 binden.

Im Bereich der M1-Aminosäuren 91 – 112 liegt ein Kernlokalisierungssignal  $_{101}\text{RKLKR}_{105}$  (Ye et al., 1995), das auch RNS-Bindung vermittelt (Elster et al., 1997). Darüber hinaus vermittelt dieser Bereich auch die Inhibition der viralen Transkription in der späten Phase der Infektion (Watanabe et al., 1996). Aufgrund der Multifunktionalität dieses Bereiches ist eine genauere Eingrenzung der RACK1-bindenden Aminosäuren notwendig, um ein Influenza A Virus mit defizienter RACK1-Bindung erzeugen zu können.

Im Bereich der Aminosäuren 120 – 135 findet sich eine hydrophobe Domäne, die mit der Membranbindung des M1-Proteins in Verbindung gebracht worden ist (Gregoriades & Frangione, 1981). Allerdings konnte gezeigt werden, dass ein Verlust dieser Domäne die Membranbindung des M1-Proteins nicht unterdrückt (Kretzschmar et al., 1996). Da aber nicht auszuschließen ist, dass dieser Bereich für weitere, noch unbekannt Funktionen des M1-Proteins verantwortlich ist, muss auch hier eine genauere Eingrenzung der RACK1-Bindedomäne erfolgen.

Im Bereich der Aminosäuren 148 – 162 des M1-Proteins befindet sich die Konsensus-Sequenz einer Zinkfinger-Domäne vom Typ C-X-X-C-X<sub>8</sub>-H-X-X-H. Das M1-Protein kann zu einem geringen Prozentsatz Zink-Ionen binden (Elster et al., 1994) und ein von diesem Bereich abgeleitetes, synthetisches Peptid zeigt antivirale Wirkung *in vitro* (Nasser et al., 1996) und *in vivo* (Judd et al., 1997). Da dieser Bereich für die RNS-Bindung des M1-Proteins nicht notwendig ist, wurde spekuliert, dass der Zinkfinger Protein-Protein-Interaktion vermitteln könnte (Elster et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mutanten des M1-Proteins, denen der Bereich der vorhergesagten Zinkfinger-Domäne fehlte, auf ihre RACK1-Bindung getestet. Da diese Mutanten (Abbildung 26, M1 (1-140)) im gleichen Maße an RACK1 binden wie Mutanten mit Zinkfinger-Motiv (M1 (1-200)), konnte eine Involvierung dieser Domäne bei der RACK1-Bindung ausgeschlossen werden.

## 5.8 Das vollständige RACK1-Protein zeigt geringere Affinität zum M1-Protein des Influenza A Virus als die im Two Hybrid-Screen isolierten Fragmente

Da im Two Hybrid-Screen nur N-terminal verkürzte RACK1-Polypeptide als Interaktionspartner des M1-Proteins isoliert worden waren (Abbildung 15), wurde untersucht, ob das vollständige RACK1 ebenfalls an das M1-Protein bindet. Dazu wurde zunächst die cDNS des gesamten RACK1-Proteins aus HeLa-mRNS amplifiziert und nach gelungener Klonierung das vollständige RACK1 *in vitro* synthetisiert. In einem Kopräzipitationsansatz zeigte sich, dass das vollständige RACK1 im Gegensatz zu dem N-terminal verkürzten RACK1-Polypeptid eine erheblich reduzierte Affinität zum M1-Protein aufwies (Abbildung 28). Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass der N-terminale Bereich des RACK1 eine regulatorische Funktion auf die M1-Protein-Bindung ausübt. Eine solche regulatorische Funktion für den N-terminalen Bereich des RACK1 ist im Zusammenhang mit dessen Fähigkeit, an die Integrin- $\beta$ -Untereinheit zu binden, beschrieben worden (Liliental & Chang, 1998). Während ein RACK1-Polypeptid, das nur aus den WD-Domänen 5 – 7 besteht (AS 182 – 317), direkt mit der Integrin- $\beta$ -Untereinheit interagiert, gelingt eine Kopräzipitation mit dem vollständigen RACK1 nur, wenn die Zellen mit Phorbol ester stimuliert worden sind. Phorbol ester aktiviert die Proteinkinase C. Solche oder andere Regulationsmechanismen sind auch für die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein denkbar. Bei der *in vitro*-Synthese des RACK1-Proteins entstand als Nebenprodukt ein ca. 3 kDa kürzeres Polypeptid. Dabei könnte es sich um eine N-terminal verkürzte Version des RACK1 handeln, die durch die Verwendung eines alternativen Transkriptionsstart-Kodons entstanden ist. Da dieses Nebenprodukt an das M1-Protein mit vergleichbarer Affinität bindet wie das im Two Hybrid-Screen isolierte Polypeptid 4 III 1 (Abbildung 28), könnte spekuliert werden, dass die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein durch die ersten 30 Aminosäuren des RACK1 reguliert werden könnte.

## 5.9 Überexpression des RACK1 führt zu einer Reduzierung der M1-Protein-Expression in Influenza A Virus-infizierten Zellen

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung des dritten Modells zur Bedeutung der RACK1-M1-Interaktion im Infektionsverlauf basiert auf der Annahme, dass durch eine Überexpression von RACK1 in Influenza A Virus-infizierten Zellen für das M1-Protein ein Überangebot an

Bindungspartnern entsteht. Es wird dadurch stärker gebunden als in Kontrollzellen. Eine daraus resultierende Änderung im Infektionszyklus würde Rückschlüsse auf den Zeitpunkt, den Ort und eventuell die Funktion der RACK1-M1-Interaktion ermöglichen.

In einem großen Teil der 4 III 1-exprimierenden Zellen ließ sich nach achtstündiger Infektion das M1-Protein mittels indirekter Immunfluoreszenz nicht nachweisen (Abbildung 29 und Abbildung 30). Die M1-Proteinexpression in den mit pEGFP-N1 transfizierten Zellen belegt, dass der betrachtete Effekt nicht allein auf die Transfektion oder die Überexpression eines fremden Proteins zurückzuführen ist. Das M1-Protein ließ sich nach einer Influenza A Virus-Infektion auch in einem Teil der Zellen, die das RACK1wt überexprimierten, nicht nachweisen. Allerdings ergaben Zellauszählungen, dass hier der Anteil an Zellen ohne M1-Proteinexpression deutlich geringer ausfiel als bei Zellen, die das 4 III 1 überexprimierten (Abbildung 30 und Abbildung 31). Diese Beobachtung korreliert mit der Tatsache, dass das M1-Protein in *in vitro*-Kopräzipitationsexperimenten vom RACK1-Fragment 4III 1 stärker gebunden wird als von RACK1wt (Abbildung 28).

Es ist überraschend, dass durch die Überexpression des RACK1 das M1-Protein in der Immunfluoreszenz nicht mehr nachweisbar ist. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt wäre, dass eine frühzeitige Bindung des M1-Proteins durch das überexprimierte RACK1 mit der M1-Proteinexpression im weiteren Verlauf der Infektion interferiert. Möglicherweise komplexiert RACK1 das M1-Protein bei dem Entpacken des Virions in der Frühphase der Infektion und verhindert so die Dissoziation von vRNPs und M1-Protein, was eine Voraussetzung für den Transport der vRNPs in den Zellkern und die Transkription der viralen Gene darstellt. Ein solcher Effekt ist nach Überexpression von rekombinantem M1-Protein beschrieben worden. Das M1-Protein band an die freigesetzten vRNPs und verhinderte deren Kernimport. Durch Ansäuerung des Zytoplasmas ließen sich die Komplexe aus vRNPs und rekombinantem M1-Protein zerstören (Bui et al., 1996). Das rekombinante RACK1 könnte bei der Freisetzung der vRNPs durch Bindung an das M1-Protein Komplexe bilden, von denen die vRNPs am Eintritt in den Zellkern gehindert würden.

Die Tatsache, dass in RACK1-überexprimierenden Zellen kein M1-Protein nachgewiesen werden kann, könnte auch dadurch begründet sein, dass die Influenza Viren am Eindringen in die Zelle gehindert werden. Influenza A Viren werden durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle geschleust (Lamb & Krug, 1996). An der Einschnürung der Endosomen ist

eine Vielzahl zellulärer Proteine beteiligt, unter anderem Integrin (Chen et al., 1990). RACK1 interagiert mit den  $\beta$ -Untereinheiten von Integrin (Liliental & Chang, 1998). Es ist daher auch denkbar, dass die Überexpression von RACK1 mit der Bildung von Endosomen interferiert und so ein Eindringen der Influenza A Viren in die Zelle verhindert. Zur genauen Analyse, mit welchem Schritt des viralen Replikationszyklus das überexprimierte RACK1 interferiert, müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Dieses Phänomen verhindert eine genauere Untersuchung der M1-RACK1-Interaktion in diesem Ansatz.

## 5.10 Zusammenfassung

Das M1-Protein hat neben seiner strukturellen Aufgabe im Virion verschiedene Funktionen im Replikationszyklus von Influenza A Viren. Zur Identifikation von zellulären Interaktionspartnern, die bei der Vermittlung dieser Funktionen eine Rolle spielen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Hefe-Two Hybrid-Screen durchgeführt. Dabei wurde RACK1, der Rezeptor der aktivierten C-Kinase (PKC), als erster zellulärer Interaktionspartner des viralen M1-Proteins gefunden. Es fanden sich vier unabhängige cDNS-Klone, die für N-terminal verkürzte RACK1-Fragmente kodieren. Die genetisch gefundene Interaktion konnte in *in vitro*-Kopräzipitationsexperimenten biochemisch bestätigt werden. Dabei ließ sich auch zeigen, dass diese Interaktion zwischen M1-Proteinen von Influenza A Viren mit unterschiedlicher Wirtsspezifität und dem RACK1, das bei allen Wirten auf der Aminosäure-Ebene identisch ist, konserviert ist. Während die im Two Hybrid-Screen isolierten RACK1-Fragmente das M1-Protein spezifisch aus dem Lysat Influenza A Virus-infizierter Zellen präzipitierten, zeigte das vollständige RACK1 eine geringere spezifische Bindung an das M1-Protein, was auf eine Regulation der Protein-Protein-Interaktion hinweist. Bei Untersuchungen zur Funktion der Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein konnten keine Hinweise auf eine Beteiligung von RACK1 an der Virusmorphogenese gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass das M1-Protein durch gereinigte Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert wird. Das M1-Protein kann ebenfalls durch eine Aktivität aus Wirtszellen phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierung lässt sich durch einen PKC-spezifischen Inhibitor blockieren. Dies sind die ersten publizierten Daten einer Kinase mit Spezifität für das Influenza A Virus-M1-Protein (Reinhardt & Wolff, 2000). Die Tatsache, dass diese Phosphorylierung vornehmlich durch Isoformen möglich ist, die auch von RACK1 gebunden werden, weist darauf hin, dass die Interaktion zwischen RACK1 und dem M1-Protein mit der Phosphorylierung des M1-Proteins in Zusammenhang stehen könnte.

Für die Bindung an RACK1 sind die Bereiche AS 90 – 112 und AS 120 – 134 des M1-Proteins notwendig, beide Bereiche können unabhängig voneinander an RACK1 binden. Durch transiente Überexpression des verkürzten RACK1 lässt sich in infizierten Zellen die M1-Proteinsynthese inhibieren. Dieser Effekt ist bei Überexpression des vollständigen RACK1 in geringerem Umfang zu beobachten.

Wie viele wissenschaftlichen Untersuchungen wirft auch die Entdeckung der Interaktion zwischen dem zellulären RACK1 und dem viralen M1-Protein eine Reihe von neuen Fragen auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten viele dieser Fragen nicht abschließend beantwortet werden. Gleichwohl konnten einige Ergebnisse gefunden werden, die interessante Perspektiven nach sich ziehen. Die Erkenntnis, dass das M1-Protein durch die Proteinkinase C phosphoryliert wird, erklärt zwar noch nicht die Funktion der gefundenen RACK1-M1-Interaktion, gibt aber die Möglichkeit zu weiterreichenden Experimenten an die Hand. So könnte untersucht werden, ob die M1-Proteinphosphorylierung durch Zugabe von RACK1 beeinflusst wird. Alternativ ließe sich untersuchen, ob diese Phosphorylierung im zellulären System durch Peptide, die eine RACK1-Bindung der PKC inhibieren, modifiziert werden kann. Ein anderes Beispiel stellt die Überexpression des RACK1 in infizierten Zellen dar. Die daraus resultierende Inhibition der M1-Proteinexpression wirft die Frage auf, ob sich auf der Basis des verkürzten RACK1 eine Blockade der Influenza A Virusvermehrung erreichen läßt. Die Ergebnisse dieser Arbeit und die dadurch aufgeworfenen Fragen eröffnen ein weites Feld interessanter wissenschaftlicher Herausforderungen, die einen weiteren Beitrag zum Verständnis der klassischen Virusgrippe und eventuell zu deren Bekämpfung beitragen können.



## 6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Justus Liebig-Universität noch an einer anderen Universität versucht habe, eine Dissertation einzureichen.

Berlin, den 23.08.2001

Jens Reinhardt

## 7 Danksagung

Professor Klenk hat mir einen Arbeitsplatz im Institut für Virologie zur Verfügung gestellt und meine Doktorarbeit betreut. Er hat damit hervorragende Rahmenbedingungen für meine Arbeit geschaffen, wofür ich ihm an dieser Stelle danken möchte.

Doktor Thorsten Wolff hat mir das außerordentlich interessante Feld der molekularen Virologie im allgemeinen und das Thema meiner Doktorarbeit im speziellen nahe gebracht und stand mir jederzeit mit seinem Wissen und seiner Erfahrung zur Seite.

Professor Hobom danke ich dafür, dass er meine externe Doktorarbeit für die Justus-Liebig-Universität betreut hat.

Ich habe meine Doktorarbeit im Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg begonnen, wo mir alle Mitarbeiter durch ihre Kollegialität und ständige Hilfsbereitschaft das Arbeiten sehr erleichtert haben. Im Besonderen möchte ich mich bedanken bei:

Stefan Becker, Christian Sänger, Angelika Lander, Michael Weik, Jens Modroff, Peggy Möller, Elke Mühlberger, Silke Weigel, Anke Feldmann, Tanja Strive, Grit Meyer, Elke Bogner, Kyra Giesen, Matthias Dobbstein, Sandra Wienzek, Prof. Radzak, Prof. Garten, Ralf Wagner, Astrid Herwig, Sabine Berghöfer, Andrea Meisner, Irene Reh, Rüttger Ebendt, Karin Beimborn, Markus Eickmann.

Die Arbeit wurde am Robert Koch-Institut in Berlin fertiggestellt. Hier gilt mein Dank besonders den Mitgliedern der Nachwuchsgruppe 2:

Stefan Taube, Gunhild Unterstab, Gudrun Heins, Judith Stärk.

Und allen anderen Mitarbeitern, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Außerdem danke ich meinen Freunden für ihre Hilfe: Andi, Ute und natürlich Axel.

Julia : Danke für alles! Die Welt ist schöner mit Dir darin !

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihr unerschütterliches Vertrauen und ihre beständige Unterstützung. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

## 8 Literaturverzeichnis

- Agatep, R., R.D. Kirkpatrick, D.L. Parchaliuk, R.A. Woods, and R.D. Gietz (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol., Technical Tips Online (<http://ttotrendscom>).
- Arzt, S., Baudin, F., Barge, A., Timmins, P., Burmeister, W. P., and Ruigrok, R. W. (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.
- Ausubel, F. M., Brent, R. E., Kingston, D. D., Moore, J. G., Seidmann, J. A., Smith, J. A., and Struhl, K. (1992). Current protocols in molecular biology (New York, N.Y., John Wiley and Sons).
- Avalos, R. T., Yu, Z., and Nayak, D. P. (1997). Association of influenza virus NP and M1 proteins with cellular cytoskeletal elements in influenza virus-infected cells, *J Virol* 71, 2947-58.
- Barret, T., and Inglis, S. C. (1984). Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses. In *Virology: A Practical Approach*, pp. 119-150.
- Baudin, F., Bach, C., Cusack, S., and Ruigrok, R. W. (1994). Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent, *Embo J* 13, 3158-65.
- Beaton, A. R., and Krug, R. M. (1986). Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end, *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 6282-6.
- Belshe, R. B., Smith, M. H., Hall, C. B., Betts, R., and Hay, A. J. (1988). Genetic basis of resistance to rimantadine emerging during treatment of influenza virus infection, *J Virol* 62, 1508-12.
- Boulan, E. R., and Pendergast, M. (1980). Polarized distribution of viral envelope proteins in the plasma membrane of infected epithelial cells., *Cell* 20 (1), 45 - 54.
- Brent, R., and Ptashne, M. (1984). A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene, *Nature* 312, 612-5.
- Bron, R., Kendal, A. P., Klenk, H. D., and Wilschut, J. (1993). Role of the M2 protein in influenza virus membrane fusion: effects of amantadine and monensin on fusion kinetics, *Virology* 195, 808-11.
- Bucher, D. J., Kharitonov, I. G., Zakomirdin, J. A., Grigoriev, V. B., Klimenko, S. M., and Davis, J. F. (1980). Incorporation of influenza virus M-protein into liposomes, *J Virol* 36, 586-90.
- Bui, M., Whittaker, G., and Helenius, A. (1996). Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins, *J Virol* 70, 8391-401.
- Bullough, P. A., Houghson, F. M., Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (1994). Structure of influenza hemagglutinin at the pH of membrane fusion, *Nature* 371, 37 -43.
- Carey, D. J. (1997). Syndecans: multifunctional cell-surface co-receptors, *Biochem J* 327, 1 -16.
- Castets, F., Bartoli, M., Barnier, J. V., Baillat, G., Salin, P., Moqrish, A., Bourgeois, J. P., Denizot, F., Rougon, G., Calothy, G., and Monneron, A. (1996). A novel calmodulin-binding protein, belonging to the WD-repeat family, is localized in dendrites of a subset of CNS neurons, *J Cell Biol* 134, 1051-62.

- Chang, B. Y., Conroy, K. B., Machleder, E. M., and Cartwright, C. A. (1998). RACK1, a receptor for activated C kinase and a homolog of the beta subunit of G proteins, inhibits activity of src tyrosine kinases and growth of NIH 3T3 cells, *Mol Cell Biol* 18, 3245-56.
- Choppin, P. W., and Compans, R. W. (1975). The structure of influenza virus. In *The influenza viruses and influenza*, E. D. Killbourne, ed. (New York, N.Y., Academic Press Inc.).
- Chu, C. M., Dawson, I. M., and Elford, W. J. (1949). Filamentous forms associated with newly isolated influenza virus, *Lancet i*, 602 - 603.
- Claas, E. C., Osterhaus, A. D., van Beek, R., De Jong, J. C., Rimmelzwaan, G. F., Senne, D. A., Krauss, S., Shortridge, K. F., and Webster, R. G. (1998). Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus, *Lancet* 351, 472-7.
- David, G., van der Schueren, B., Marynen, P., Cassiman, J. J., and van den Berghe, H. (1992). Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblastic cells, *J Cell Biol* 118, 961-9.
- Elster, C., Larsen, K., Gagnon, J., Ruigrok, R. W., and Baudin, F. (1997). Influenza virus M1 protein binds to RNA through its nuclear localization signal, *J Gen Virol* 78, 1589-96.
- Elton, D., Simpson-Holley, M., Archer, K., Medcalf, L., Hallam, L., McCauley, J., and Digard, P. (2001). Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway., *J Virol* 75 (1), 408 - 419.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions, *Nature* 340, 245-6.
- Finley, R. L., and Brent, R. (1996). Interaction trap cloning with yeast. In *DNA Cloning - Expression Systems: A Practical Approach*, D. Glover, and B. Hames, eds. (Oxford, England, Oxford University Press), pp. 169-203.
- Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E., and Hobom, G. (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure, *Rna* 2, 1046-57.
- Fodor, E., Devenish, L., Engelhardt, O. G., Palese, P., Brownlee, G. G., and Garcia-Sastre, A. (1999). Rescue of influenza A virus from recombinant DNA, *J Virol* 73, 9679-82.
- Fodor, E., Pritlove, D. C., and Brownlee, G. G. (1995). Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus, *J Virol* 69, 4012-9.
- Fortes, P., Beloso, A., and Ortin, J. (1994). Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport., *Embo J* 13, 704 - 712.
- Garfinkel, M. S., and Katze, M. G. (1993). Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region, *J Biol Chem* 268, 22223-6.
- Geijsen, N., Spaargaren, M., Raaijmakers, J. A., Lammers, J. W., Koenderman, L., and Coffey, P. J. (1999). Association of RACK1 and PKCbeta with the common beta-chain of the IL-5/IL-3/GM-CSF receptor, *Oncogene* 18, 5126-30.
- Gómez-Puertas, P., Albo, C., Pérez-Pastrana, E., Vivo, A., and Augustín, A. P. (2000). Influenza Virus Matrix Protein Is the Major Driving Force in Virus Budding, *Journal of Virology* 74, 11538 - 11547.
- Goto, H., and Kawaoka, Y. (1998). A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10224-8.

- Gregoriades, A., Christie, T., and Markarian, K. (1984). The membrane (M1) protein of influenza virus occurs in two forms and is a phosphoprotein, *J Virol* *49*, 229-35.
- Gregoriades, A., and Frangione, B. (1981). Insertion of influenza M protein into the viral lipid bilayer and localization of site of insertion, *J Virol* *40*, 323-8.
- Guillemot, F., Billault, A., and Auffray, C. (1989). Physical linkage of a guanine nucleotide-binding protein-related gene to the chicken major histocompatibility complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* *86*, 4594-8.
- Harlow, E., and Lane, D. (1988). *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Harris, A., Sha, B., and Luo, M. (1999). Structural similarities between influenza virus matrix protein M1 and human immunodeficiency virus matrix and capsid proteins: an evolutionary link between negative-stranded RNA viruses and retroviruses, *J Gen Virol* *80*, 863-9.
- Harty, R. N., Paragas, J., Sudol, M., and Palaese, P. (1999). A proline-rich motif within the matrix protein of vesicular stomatitis virus and rabies virus interacts with WW domains of cellular proteins: implications for viral budding, *J Virol* *73* (4), 2921 - 2929.
- Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R., and Skehel, J. J. (1977). Transcription of the influenza virus genome, *Virology* *83*, 337-55.
- Hirst, G. K. (1941). Agglutination of red blood cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus., *Science* *94*, 22 - 23.
- Hoffmann, B., Mösch, H.-U., Sattler, E., Barthelmess, I. B., Hinnebusch, A., and Braus, G. H. (1999). The WD protein Cpc2p is required for repression of Gcn4 protein activity in yeast in the absence of amino-acid starvation, *Molecular Microbiology* *31*, 807-822.
- Holsinger, L. J., and Lamb, R. A. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds, *Virology* *183*, 32-43.
- Holsinger, L. J., Shaughnessy, M. A., Micko, A., Pinto, L. H., and Lamb, R. A. (1995). Analysis of the posttranslational modifications of the influenza virus M2 protein, *J Virol* *69*, 1219-25.
- Hope, I. A., and Struhl, K. (1986). Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast, *Cell* *46*, 885-94.
- Horisberger, M. A. (1980). The large P proteins of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides, *Virology* *107*, 302-5.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M., and Palese, P. (1987). Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle, *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 8140 - 8144.
- Hull, J. D., Gilmore, R., and Lamb, R. A. (1988). Integration of a small integral membrane protein, M2, of influenza virus into the endoplasmic reticulum: analysis of the internal signal-anchor domain of a protein with an ectoplasmic NH2 terminus, *J Cell Biol* *106*, 1489-98.
- Hunter, T. (1995). Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling, *Cell* *80*, 225-36.
- Inglis, S. C., Carroll, A. R., Lamb, R. A., and Mahy, B. W. (1976). Polypeptides specified by the influenza virus genome I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus, *Virology* *74*, 489-503.

- Ito, T., Gorman, O. T., Kawaoka, Y., Bean, W. J., and Webster, R. G. (1991). Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins, *J Virol* *65*, 5491-8.
- Jin, H., Leser, G. P., Zhang, J., and Lamb, R. A. (1997). Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape, *Embo J* *16 No 6*, 1236 - 1247.
- Judd, A. K., Sanchez, A., Bucher, D. J., Huffman, J. H., Bailey, K., and Sidwell, R. W. (1997). In vivo anti-influenza virus activity of a zinc finger peptide, *Antimicrob Agents Chemother* *41*, 687-92.
- Kato, N., and Eggers, H. J. (1969). Inhibition of uncoating of fowl plague virus by l-adamantanamine hydrochloride, *Virology* *37*, 632-41.
- Keegan, L., Gill, G., and Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein, *Science* *231*, 699-704.
- Kemler, I., Whittaker, G., and Helenius, A. (1994). Nuclear import of microinjected influenza virus ribonucleoproteins, *Virology* *202*, 1028-33.
- Kistner, O., Muller, K., and Scholtissek, C. (1989). Differential phosphorylation of the nucleoprotein of influenza A viruses, *J Gen Virol* *70*, 2421-31.
- Klenk, H. D., and Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity, *Trends Microbiol* *2*, 39 - 43.
- Knipe, D. M. (1996). Virus-Host Cell Interactions. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers).
- Kozak, M. (1984). Point mutation close to the AUG initiator codon affect the efficiency of translation of rat preproinsulin in vivo., *Nature* *308 (5956)*, 241 - 246.
- Kretzschmar, E., Bui, M., and Rose, J. K. (1996). Membrane association of influenza virus matrix protein does not require specific hydrophobic domains or the viral glycoproteins, *Virology* *220*, 37-45.
- Lamb, R. A., and Choppin, P. W. (1976). Synthesis of influenza virus proteins in infected cells: translation of viral polypeptides, including three P polypeptides, from RNA produced by primary transcription, *Virology* *74*, 504-19.
- Lamb, R. A., and Krug, R. M. (1996). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and e. al., eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 1353 - 1395.
- Laver, W. G., and Valentine, R. C. (1969). Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus., *Virology* *38*, 105 - 119.
- Lenard, J. (1996). Negative-strand virus M and retrovirus MA proteins: all in a family?, *Virology* *216*, 289-98.
- Liliental, J., and Chang, D. D. (1998). Rack1, a receptor for activated protein kinase C, interacts with integrin beta subunit, *J Biol Chem* *273*, 2379-83.
- Liu, J.-P. (1996). Protein kinase C and its substrates, *Molecular and Cellular Endocrinology* *116*, 1 -29.
- Lu, Y., Wambach, M., Katze, M. G., and Krug, R. M. (1995). Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the EIF-2 translation initiation factor, *Virology* *214*, 222 - 228.
- Luban, J., Bossolt, K. L., Franke, E. K., Kalpana, G. V., and Goff, S. P. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Gag protein binds to caryophilins A and B., *Cell* *73*, 1067 -1078.

- Ludwig, S., Pleschka, S., and Wolff, T. (1999). A fatal relationship - influenza virus interactions with the host cell, *Viral Immunity* *12*, *in press*.
- Malim, M. H., Hauber, J., Le, S. Y., Maizel, J. V., and Cullen, B. R. (1989). The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA., *Nature* *338*, 254 -257.
- Martin, K., and Helenius, A. (1991). Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import, *Cell* *67*, 117-30.
- McClelland, L., and Hare, R. (1941). The adsorption of influenza virus by red cells and a new method of measuring antibodies for influenza virus., *Can J Public Health* *108*, 422 - 426.
- Molinari, M., and Helenius, A. (2000). Chaperone selection during glycoprotein translocation into the endoplasmic reticulum., *Science* *288*, 331 - 333.
- Murphy, B. R., and Webster, R. G. (1996). Orthomyxoviruses. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 1397-1445.
- Murti, K. G., Webster, R. G., and Jones, I. M. (1988). Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling., *Virology* *164*, 562 - 566.
- Nasser, E. H., Judd, A. K., Sanchez, A., Anastasiou, D., and Bucher, D. J. (1996). Antiviral activity of influenza virus M1 zinc finger peptides, *J Virol* *70*, 8639-44.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., and Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins [published erratum appears in *Nature* 1994 Oct 27;371(6500):812], *Nature* *371*, 297-300.
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M., Li, Y., Keller, W., and Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs, *Mol Cell* *1*, 991-1000.
- Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., *et al.* (1999). Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs, *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 9345-50.
- Ohuchi, M., Ohuchi, R., Feldmann, A., and Klenk, H. D. (1997). Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety, *J Virol* *71*, 8377-84.
- O'Neill, R. E., Talon, J., and Palese, P. (1998). The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins, *Embo J* *17*, 288-96.
- Perez, D. R., and Donis, R. O. (1998). The matrix 1 protein of influenza A virus inhibits the transcriptase activity of a model influenza reporter genome in vivo, *Virology* *249*, 52-61.
- Petri, T., and Dimmock, N. J. (1981). Phosphorylation of influenza virus nucleoprotein in vivo, *J Gen Virol* *57*, 185-90.
- Plotch, S. J., Bouloy, M., Ulemanen, I., and Krug, R. M. (1981). A unique cap(m<sup>7</sup>GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription, *Cell* *23*, 847 - 858.
- Pons, M. W. (1971). Isolation of influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA., *Virology* *46*, 149 - 160.

- Privalsky, M. L., and Penhoet, E. E. (1977). Phosphorylated protein component present in influenza virions., *J Virol* 24, 401 - 405.
- Privalsky, M. L., and Penhoet, E. E. (1981). The structure and synthesis of influenza virus phosphoproteins, *J Biol Chem* 256, 5368 - 5376.
- Rees, P. J., and Dimmock, N. J. (1981). Electrophoretic separation of influenza virus ribonucleoproteins, *J Gen Virol* 53, 125-32.
- Reid, A. H., Fanning, T. G., Hultin, J. V., and Taubenberger, J. K. (1999). Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 1651-6.
- Reid, A. H., Fanning, T. G., Janczewski, T. A., and Taubenberger, J. K. (2000). Characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus neuraminidase gene, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6785-90.
- Reinhardt, J., and Wolff, T. (2000). The influenza A virus M1 protein interacts with the cellular receptor of activated C kinase (RACK) 1 and can be phosphorylated by protein kinase C, *Vet Microbiol* 74, 87-100.
- Rodriguez, M. M., Ron, D., Touhara, K., Chen, C. H., and Mochly-Rosen, D. (1999). RACK1, a protein kinase C anchoring protein, coordinates the binding of activated protein kinase C and select pleckstrin homology domains in vitro, *Biochemistry* 38, 13787-94.
- Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E., and Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins [published erratum appears in *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 Feb 28;92(5):2016], *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 839-43.
- Ron, D., Jiang, Z., Yao, L., Vagts, A., Diamond, I., and Gordon, A. (1999). Coordinated movement of RACK1 with activated betaIIIPKC, *J Biol Chem* 274, 27039-46.
- Rott, R., Orlich, M., and Scholtissek, C. (1976). Attenuation of pathogenicity of fowl plague virus by recombination with other influenza A viruses nonpathogenic for fowl: nonexclusive dependence of pathogenicity on hemagglutinin and neuraminidase of the virus, *J Virol* 19, 54-60.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanderson, C. M., McQueen, N. L., and Nayak, D. P. (1993). Sendai virus assembly: M protein binds to viral glycoproteins in transit through the secretory pathway, *J Virol* 67, 651-63.
- Schiestl, R. H., P. Manivasakam, and R.A. Woods, a. R. D. G., . (1993). Introducing DNA into yeast by transformation. In *Methods; a companion to Methods in Enzymology*, M. J. a. S. Fields., ed. (Academic Press, Inc.), pp. 79-85.
- Schmidt, M. F. (1982). Acylation of viral spike glycoproteins: a feature of enveloped RNA viruses, *Virology* 116, 327-38.
- Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V., and Rott, R. (1978). On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2, *Virology* 87, 13-20.
- Scholtissek, C., and Naylor, E. (1988). Fish farming and influenza pandemics, *Nature* 331, 215.
- Sha, B., and Luo, M. (1997). Structure of a bifunctional membrane-RNA binding protein, influenza virus matrix protein M1, *Nat Struct Biol* 4, 239-44.



- Shapiro, G. I., Gurney, T., Jr., and Krug, R. M. (1987). Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs, *J Virol* 61, 764-73.
- Shimizu, K., Iguchi, A., Gomyou, R., and Ono, Y. (1999). Influenza virus inhibits cleavage of the HSP70 pre-mRNAs at the polyadenylation site, *Virology* 254, 213-9.
- Shishkov, A. V., Goldanskii, V. I., Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Zhirnov, O. P., and Galkin, A. V. (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.
- Shortridge, K. F. (1992). Pandemic influenza: a zoonosis?, *Semin Respir Infect* 7, 11-25.
- Shortridge, K. F., Zhou, N. N., Guan, Y., Gao, P., Ito, T., Kawaoka, Y., Kodihalli, S., Krauss, S., Markwell, D., Murti, K. G., *et al.* (1998). Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong, *Virology* 252, 331-42.
- Skehel, J. J., and Hay, A. J. (1978). Influenza virus transcription, *J Gen Virol* 39, 1-8.
- Skehel, J. J., and Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin, *Ann Rev Biochem* 69, 531 - 569.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions [In Process Citation], *Trends Biochem Sci* 24, 181-5.
- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D., and Garten, W. (1992). Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease, *Embo J* 11, 2407-14.
- Sugrue, R. J., Belshe, R. B., and Hay, A. J. (1990). Palmitoylation of the influenza A virus M2 protein, *Virology* 179, 51-6.
- Sugrue, R. J., and Hay, A. J. (1991). Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel, *Virology* 180, 617-24.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E., and Fanning, T. G. (1997). Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus, *Science* 275, 1793-6.
- Thomas, J. M., Stevens, M. P., Percy, N., and Barclay, W. S. (1998). Phosphorylation of the M2 protein of influenza A virus is not essential for virus viability, *Virology* 252, 54-64.
- Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T., and Krystal, M. (1994). Sequence-specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequences located at the 5' ends of the viral RNAs, *J Virol* 68, 5108 - 5116.
- Varghese, J. N., Laver, W. G., and Colman, P. M. (1983). Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution., *Nature* 303, 35 - 40.
- Veit, M., Klenk, H. D., Kendal, A., and Rott, R. (1991). The M2 protein of influenza A virus is acylated, *J Gen Virol* 72, 1461-5.
- Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S., and Klenk, H. D. (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics, *J Virol* 74, 6316-23.
- Wakefield, L., and Brownlee, G. G. (1989). RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1, *Nucleic Acids Res* 17, 8569-80.

- Ward, A. C., Castelli, L. A., Lucantoni, A. C., White, J. F., Azad, A. A., and Macreadie, I. G. (1995). Expression and analysis of the NS2 protein of influenza A virus, *Arch Virol* 140, 2067-73.
- Webster, R. G., Sharp, G. B., and Claas, E. C. (1995). Interspecies transmission of influenza viruses, *Am J Respir Crit Care Med* 152, S25-30.
- Whittaker, G., Kemler, I., and Helenius, A. (1995). Hyperphosphorylation of mutant influenza virus matrix protein, M1, causes its retention in the nucleus, *J Virol* 69, 439-45.
- Wiley, D. C., Skehel, J. J., and Waterfield, M. D. (1977). Evidence from studies with a cross-linking reagent that the hemagglutinin of influenza virus is a trimer., *Virology* 79, 446 - 448.
- Wolff, T., O'Neill, R. E., and Palese, P. (1998). NS1-Binding protein (NS1-BP): a novel human protein that interacts with the influenza A virus nonstructural NS1 protein is relocalized in the nuclei of infected cells, *J Virol* 72, 7170-80.
- Woods, A., and Couchman, J. R. (1994). Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component, *Mol Biol Cell* 5, 183-92.
- Yarwood, S. J., Steele, M. R., Scotland, G., Houslay, M. D., and Bolger, G. B. (1999). The RACK1 signaling scaffold protein selectively interacts with the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5 isoform, *J Biol Chem* 274, 14909-17.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T., and Ishihama, A. (1993). Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix, *Virology* 196, 249-55.
- Ye, Z., Liu, T., Offringa, D. P., McInnis, J., and Levandowski, R. A. (1999). Association of influenza virus matrix protein with ribonucleoproteins, *J Virol* 73, 7467-73.
- Ye, Z. P., Baylor, N. W., and Wagner, R. R. (1989). Transcription-inhibition and RNA-binding domains of influenza A virus matrix protein mapped with anti-idiotypic antibodies and synthetic peptides, *J Virol* 63, 3586-94.
- Zhao, H., Ekstrom, M., and Garoff, H. (1998). The M1 and NP proteins of influenza A virus form homo- but not heterooligomeric complexes when coexpressed in BHK-21 cells, *J Gen Virol* 79, 2435-46.
- Zhirnov, O. P., and Klenk, H. D. (1997). Histones as a target for influenza virus matrix protein M1, *Virology* 235, 302-10.
- Zvonarjev, A. Y., and Ghendon, Y. Z. (1980). Influence of membrane (M) protein on influenza A virus virion transcriptase activity in vitro and its susceptibility to rimantadine, *J Virol* 33, 583-6.