Aus dem Institut für Medizinische Virologie im Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Stephan Pleschka

Untersuchung zur Sekundärstruktur der nicht kodierenden Bereiche in der genomischen RNS des Virus der Bornaschen Krankheit

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades beim Fachbereich Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

> Eingereicht von Dipl.Biol. Maria Pancratius aus Kasan, Russland

Mit Genehmigung des Fachbereichs Biologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. P. Schreiner

1. Gutachter: Prof. Dr. S. Pleschka

2. Gutachter: Prof. Dr. A.Pingoud

Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 2007.

Diese Arbeit ist im Rahmen des DFG-Graduiertenkollegs "Biochemie von Nukleoproteinkomlexen" entstanden und wurde unter Verwendung der von der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Verfügung gestellten Mittel durchgeführt.

MEINER FAMILIE

INHALT

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1. EINLEITUNG	7
1.1. Geschichte	7
1.2. Geografische Aufbreitung	8
1.3. Wirtsspektrum, Krankheitsbild und Verbreitung der BDV	8
1.4. Pathogenese der BD	11
1.5. Morphologie und Taxonomie des BDV	11
1.6. Molekularbiologie des BDV	12
1.6.1. Genomorganisation des BDV	12
1.7. Nicht kodierende Bereiche und deren Rolle in Virusreplikation	16

2. PROBLEMSTELLUNG 28

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3. MATERIAL	30
3.1. Chemikalien	30
3.2. Antibiotika	32
3.3. Enzyme	32
3.4. Radioaktive Nukleotide	33
3.5. Kits	33
3.6. Größenstandards	33
3.7. Plasmide	33
3.8. Oligonukleotide	33
3.9. Bakterienstämme	34
3.10. Spezielle Artikel und Geräte	34
3.11. Firmen	34
3.12. Medien	36
3.13. Allgemeine Puffer und Lösungen	37
Enzympuffer	37
Puffer für Restriktionsendonukleasen (NEB)	38

Lösungen für die PCR	38
Puffer für die Plasmidisolierung	39
Lösungen für GeneClean	40
Lösungen für die Sequenzierung	40
Lösungen für die Modifizierungen	41
Lösungen für Primer Extension Analyse	42
Lösungen für die Gele	42
Puffer für die Elektrophorese	44
Andere Lösungen	44
4. METHODEN	45
4.1. Mikrobiologische Methoden	45
4.1.1. Kultivierung von E.coli	45
4.1.2. Dauerkulturen von Bakterien	45
4.1.3. Herstellung einer E.coli Zellsuspension für die Elektroporation	45
4.1.4. Elektrotransformation (Elektroporation)	46
4.2. Isolierung und Bearbeitung von DNA	46
4.2.1. Plasmidisolierung	46
4.2.2. Phenolextraktion	48
4.2.3. Alkoholfällung von Nukleinsäuren	49
4.2.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren	50
4.2.5. Restriktion von DNA	50
4.2.6. Ligasereaktion	50
4.2.7. Dephosphorilierung von DNA	51
4.2.8. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	51
4.2.9. DNA-Sequenzierung (radioaktiv)	52
4.2.10. Nicht-radioaktive Sequenzierung (automatische Sequenzierung, MWG)	54
4.2.11. ³² P-Endmarkierung von Oligonukleotiden	54
4.3. Elektophorese Techniken	55
4.3.1. Agarosegel	55
4.3.2. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Gene Clean -Methode)	55
4.3.3. Polyacrylamid/Harnstoffgel	56
4.3.4. Polyacrylamidgel zur RNS-Analyse	57
4.3.5. Autoradiographie	58
4.3.6. Phosphoimaging	58

4.4. RNS-Techniken	58
4.4.1. in vitro Transkription	58
4.4.2. Chemische Modifikation von RNS	59
4.4.3. Enzymatische Modifikation von RNS	61
4.4.4. Primer-Extention-Analyse	62

5. ERGEBNISSE

5. ERGEBNISSE	68
5.1. Konstruktion der RNA-Expressionsplasmide	68
5.2. Primer Labelling (Primer-Markierung)	70
5.3. RNS-Modelierung (Strukturvorschläge)	72
5.4. RNS-Modifizierungen	80
5.5. Primer Extention	81
5.5.1. Validierung der Primer Extention- Experimente	81
5.5.2. 3'-NCR: Auswertung der Daten	82
5.5.3. 5'-NCR: Auswertung der Daten	87
5.5.4. 3'+ 5'-NCR: Auswertung der Daten	91

6. DISKUSSION	101
6.1. Sekundärstruktur der NCRs	101
6.1.1. 3'-NCR	101
6.1.2. 5'-NCR	103
6.1.3. Interaktionen zwischen 3'- und 5'-NCR	104
6.2. H1766: Vorschläge der Sekundärstruktur	111
6.3. Mögliche Rolle des CAA-Motivs in der NCR des BDV	129
6.4. Mögliche Rolle der Pseudoknot-Strukturen in der NCR des BDV	131
6.5. Polyadenylierungssignal und Transkriptionsterminationssignal: die Positionierung in	
verschiedenen Strukturmodellen des 3'- und 5'- Enden	135
7. ZUSAMMENFASSUNG	136
8. LITERATURVERZEICHNIS	138
ERKLÄRUNG	145
	146
DANKSAGUNG	147

Abkürzungsverzeichnis

AA	Akrylamid
Abb.:	Abbildung
APS:	Ammoniumperoxidsulfat
APB:	Amersham Pharmacia Biotech
BD:	engl. "Borna Disease" (deutsch: "Bornasche Krankheit")
BDV:	engl. "Borna Disease Virus" (deutsch: "Virus der Borna'schen
	Krankheit")
bp:	Basenpaare
BSA:	Bovines Serum Albumin
Bw:	engl: "Backwarts Primer"
cDNA:	engl. "copy Desoxyribo-Nucleic-Acid" (deutsch: "Kopie der
	Desoxyribonucleinsäure"
CTIS	" <u>c</u> onserved <u>t</u> ranscription <u>i</u> nitiation <u>s</u> ite"
rH ₂ O:	Schwermetall-freies Wasser (mit AGX-Resin behandelt)
ddH ₂ O:	Bidistelliertes/deionisiertes Wasser
dNTP:	engl. "desoxiribonucleotidtriphosphat"
dsDNA:	doppelsträngige DNA
DTT:	Dithiotreitol
engl.:	englisch
et al.:	und andere
EtOH:	Ethanol
Fa:	Firma
Fw:	engl: "vorwärts Primer"
<i>g</i> :	engl. "gravity" (deutsch: "Gravitationsbeschleunigung")
h:	engl. "hour" (deutsch: "Stunde(n)")
kb:	Kilobasen
kD:	Kilodalton
LB:	Louri Bouillon
MG:	Molekulargewicht
mRNA:	engl. "messenger Ribonucleic Acid" (deutsch: "Boten-
	Ribonukleinsäure", mRNS)
Min.:	Minuten
NaAc:	Natriumacetat

NEB:	New England Biolab
NCR:	engl. "non coding region" (deutsch: "nicht kodierender Bereich")
nt:	Nikleotide
OD:	Optische Dichte
ORF:	engl. "Open Reading Frame" (deutsch: offener Leserraster")
PAA:	Polyacrylamid
PAGE:	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR:	engl. "Polymerase Chain Reaction" (deutsch:
	Polymerasekettenreaktion")
PE:	engl. "Primer Extension" (deutsch: "Primerverlängerung")
PSL:	Phospho-stimulierter-Lumineszenz
RA	radioaktiv
RNase:	Ribonuclease
RNP:	Ribonucleoprotein
RNS	Ribonukleinsäure
rpm:	engl. "rotation per minute" (deutsch: "UpM" = "Umdrehungen pro
	Minute")
RT:	Raumtemperatur
s.:	siehe
SDS:	engl. "Sodiumdodecylsulfat" (deutsch: "Natriumdodecylsulfat)
sek:	Sekunden
sog.:	sogenannt(e)
ssDNA:	single strange DNA (einzelsträngige DNA)
Tab.:	Tabelle
TEMED:	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris:	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
TRT	Transcriptor Reverse Transkriptase
U:	engl: "Units" (deutsch: "Einheiten")
ü.N.:	über Nacht
UK:	engl: United Kingdom
ÜNK:	Übernachtkultur
UV:	Ultraviolett
Vol.:	Volumen
ZNS	Zentrale Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Geschichte

1813 erwähnte Autenrieth erstmalig das Auftreten der BD (engl. - Borna Disease,-Borna'sche Krankheit) (1813; zit. nach (Zwick, 1939)), die er "Hitzige Kopfkrankheit der Pferde" nannte. Anfang des 20. Jahrhunderts beschrieben Joest und Degen in BD-Neuronen des Hippocampus von erkrankten Pferden intranukleäre Einschlusskörperchen, so genannte "Joest-Degen Zelleinschlusskörperchen". Damit lag es nahe, die BD den durch Viren verursachten, damals als "Zelleinschlusskörperchen-Krankheiten" bezeichneten Erkrankungen, wie Tollwut oder Staupe zuzuordnen (Joest and Degen, 1911). Im Jahre 1926 gelang es Wilhelm Zwick in Gießen, Kaninchen mit Gehirnmaterial von an BD erkrankten Pferden zu infizieren. In weiteren Studien konnte er mit dem Gehirnhomogenat dieser infizierten Kaninchen weitere Kaninchen und danach auch wieder Pferde experimentell infizieren (Zwick, 1939; Zwick et al., 1927). Er bezeichnete es als "Enzootische Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde". Zwick konnte somit den eindeutigen Beweis für eine infektiöse Ätiologie der Borna'schen Krankheit nach den Koch'schen Postulaten, erbringen. Auch nach Filtration durch bakteriendichte Filter blieb das verwendete Gehirnmaterial infektiös, so dass Zwick ein virales Agens, das Virus der Borna'schen Krankheit, als Auslöser der BD vorschlug (Zusammengefasst in: (Gellert, 1995; Mayr and Danner, 1972; Richt et al., 1997; Richt et al., 1997). Der heutige Name entstand aufgrund eines in den Jahren 1884-1886 und 1894 seuchenhaften Auftretens der BD in der Nähe der Stadt Borna, Bezirk Leipzig, Sachsen.

Später wurde die Vermutung, dass es sich bei der BD um eine virale Infektionskrankheit handelt, bestätigt und das infektiöse Agens weiter charakterisiert. Durch Filtrationsstudien wurde schon früh eine Größe der Viruspartikel von 85-125nm ermittelt (Danner and Mayr, 1979; Elford, 1993; Zwick et al., 1927), was durch elektronenmikroskopische Studien mit Gradienten gereinigter Viruspartikeln (Kohno et al., 1999; Richt et al., 1998; Zimmermann et al., 1994) bestätigt werden konnte. Sensitivitäts-Untersuchungen infektiöser Viruspartikel gegenüber Detergentien, organischen Lösungsmittel und UV-Licht ergaben, dass es sich beim BDV um ein behültes Virus handelt (Becht, 1996; Danner and Mayr, 1979; Duchala et al., 1989; Heinig, 1969; Nicolau, 1928).

In den 70er Jahren gelang es dann erstmals, das Virus der Borna'schen Krankheit (Borna Disease Virus, BDV) in Zellkultur anzuzüchten (Mayr and Danner, 1972).

Neben Studien zur Immunpathogenese von Rott und Mitarbeitern in Gießen (Narayan et al., 1983; Rott et al., 1988) war die Isolierung der ersten BDV- sequenzierten cDNS-Klone (Briese et al., 1992; Cubitt and de la Torre, 1994; Lipkin et al., 1990; VandeWoude et al., 1990) ein weiterer wichtiger Schritt bei der Erforschung des BDV. Nach der Bestimmung der genauen Sequenz der Genomenden (Pleschka et al., 2001) sind mittlerweile mehrere reverse genetische Systeme entwickelt worden (Schneider et al., 2003; Perez et al., 2003; Ma, 2003), welche es erlauben die Genomreplikation *in vitro* zu analysieren und auch infektiöses BDV komplett von cDNS zu generieren (Schneider et al., 2003; Perez et al., 2003).

1.2. Geografische Ausbreitung

Ursprünglich wurden nur bestimmte Regionen Deutschlands und der Schweiz als enzootische Gebiete der BD bei Schafen und Pferden beschrieben (Danner, 1982; Heinig, 1969; Metzler et al., 1979; Zwick, 1939).

Die Ergebnisse neuerer seroepidemiologischer Studien lassen jedoch auf eine weitaus größere Verbreitung der BDV-Infektionen sowohl innerhalb als auch außerhalb Deutschlands schließen. So finden sich virusspezifische Antikörper in Seren von klinisch gesunden Pferden aus allen Gebieten Deutschlands, aus der Schweiz sowie aus den Niederlanden, Luxemburg, Polen, Russland, Israel, Indien, Japan, Afrika und den USA (Dürrwald, 1993; Herzog et al., 1994; Kao et al., 1993; Lange et al., 1987; Nakamura et al., 1995; Richt et al., 1995; Rott and Becht, 1995; Stitz and Rott, 1994). Aus diesem Grund erscheinen BDV-Infektionen weltweit möglich (Herzog et al., 1994; Nakamura et al., 1995; Stitz and Rott, 1994).

1.3. Wirtsspektrum, Krankheitsbild und Verbreitung der BDV

Natürliche BDV-Infektionen treten weltweit vor allem bei Pferden und Schafen auf. Aber auch bei Rindern, Kaninchen, verschiedenen Zootieren, Lamas, Affen, Katzen, Straußenvögel und eventuell beim Menschen (Bilzer et al., 1995; Bode, 1995; Bode et al., 1994; Caplazi et al., 1994; Dürrwald, 1993; Flüß, 2002; Lundgren et al., 1993; Lundgren et al., 1995; Lundgren et al., 1995; Nowotny and Weissenbock, 1995; Rott et al., 1985). Bei den unterschiedlichen Tierarten kommt es zu unterschiedlichen Manifestationen der Erkrankung. Bei Katzen wird die so genannte "staggering disease", welche durch eine BD-ähnliche Symptomatik charakterisiert ist, mit einer BDV-Infektion in Verbindung gebracht (Lundgren et al., 1995). Während in Schafherden meist eine Vielzahl von Tieren an BD erkrankt, sind es bei Pferden meist Einzeltiere. Experimentell lassen sich von einigen Säugetieren (z.B. Affen, Rinder, Katzen u.a.) bis hin zu Hühnern eine Vielzahl von Tierarten mit BDV infizieren (Danner, 1982; Heinig, 1969; Richt et al., 1992; Rott and Becht, 1995; Zwick, 1939). Inkubationszeiten, klinische Ausprägung und Schwere der Krankheit hängen sowohl von der Virusdosis als auch von der verwendeten Applikationsart und der jeweiligen Tierart ab.

Wie das Virus übertragen wird ist noch nicht endgültig geklärt; eine Virusverbreitung durch orale und nasale Sekrete oder Tränenflüssigkeit wird diskutiert (Richt et al., 1993). Nach Kontakt eines Tieres mit infiziertem Material dringt das Virus wahrscheinlich in die offenen Nervenendigungen der Nasen- oder Rachenschleimhaut ein, und wird dann über den *N. olfactorius* oder *N. trigeminus* bis ins Gehirn transportiert. Es kommt wahrscheinlich nur in wenigen Gehirnzellen zur Virusreplikation. Der BDV- Zell-Zell-Transfer innerhalb des ZNS erfolgt höchstwahrscheinlich nur als ribonukleärer Partikel (RNP) (Becht, 1996), ähnlich wie bei Tollwut.

Da die Inkubationszeit der Borna'schen Krankheit relativ lang ist (4 Wochen-12 Monaten), wird die BD zu den langsam verlaufenden, sog." slow virus" Infektionen gezählt (Ludwig et al., 1973; Mayr, 1972; Zuev, 1977; Zwick, 1939). Zu den klinischen Symptomen gehören Müdigkeit, Koliken; Verhaltensstörungen, Hyperästhesie, Störungen der Sensibilität, Zwangsbewegungen, unnatürlicher Körperhaltung und Krämpfen und Lähmungen im Kopfbereich (s. Abb. 1, 2).



Abbildung 1: Pferd mit BD. Der Hengst zeigt Stupor. Nach Richt et al. (2000).

Die Sterbeursachen sind Entkräftung, Aspirationspneumonien oder durch Dekubitus verursachte Septikämien. Die Letalität schwankt zwischen 65% und 95%.



Abbildung 2: Pferd mit BD. *Der Pony Hengst zeigt Torticollis (unphysiologisch gehaltener Hals und "zwanghafte Manegenbewegung") und zirkuläre Bewegungen. Nach Richt et al. (2000).*

Da das Wirtsspektrum von BDV so breit ist wurden bereits Mitte der 80er Jahre erste Untersuchungen durchgeführt, die zeigen sollten, ob sich der Mensch mit BDV infizieren kann. Da BDV-Infektionen bei vielen natürlichen und experimentell infizierten Tieren neben neurologischen Störungen auch Verhaltensstörrungen verursachen können, wurden zuerst Patienten mit psychischen Störungen wie bipolaren Depressionen, Schizophrenie und anderen Persönlichkeitsveränderungen untersucht. In ersten Studien konnten bei ca. 4-7% dieser Patienten BDV-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Amsterdam, 1985; Bechter, 1992; Rott et al., 1985). Diese Ergebnisse wurden später bestätigt (Bode et al., 1993; Bode et al., 1992; Fu et al., 1993; Planz et al., 2000; Waltrip et al., 1995). In den letzten Jahren wurden BDV-spezifische RNS und BDV-spezifischen Proteine in Blutmonocyten bei psychiatrischen Patienten gefunden (Bode, 1995; Bode et al., 1994; Bode et al., 1994; Bode et al., 1995; De La Torre et al., 1996; Kishi et al., 1995; Sauder et al., 1996). Diese Ergebnisse konnten allerdings von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden (Lieb et al., 1997; Richt et al., 1997). Zusätzlich konnte BDV- spezifische RNS in Gehirnmaterial von Patienten mit hippocampaler Sklerose (De La Torre et al., 1996) oder mit Schizophrenie

10

(Iwahashi et al., 1997) gefunden werden. Problematisch bei der Beurteilung dieser Resultate ist die anscheinend niedrige Menge an viraler RNS in Gehirn und Blut infizierter Patienten, da nur sehr empfindliche Testverfahren, wie die nested-RT-PCR, die ein hohes Risiko für falsch-positive Ergebnisse hat, zum Nachweis BDV-viraler RNS verwendet werden können (Legay et al., 2000). Zu erwähnen ist auch, dass die gefundenen RNS der viralen RNS der im Labor verwendeten BDV-Stämme sehr ähnlich ist (Pleschka et al., 2001; Schwemmle et al., 1999).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Mensch eventuell durch BDV infiziert werden kann. Ob diese Infektion allerdings produktiv ist und ob eine kausative Rolle beim Auftreten von psychiatrischen oder neurologischen Erkrankungen spielt, muss in weiteren epidemiologischen Studien ermittelt werden (Hatalski et al., 1997; Richt et al., 1997; Richt and Rott, 2001).

1.4. Pathogenese der BD

Nach experimenteller intracerebraler (i.c.) Infektion adulter Lewis-Ratten mit einem Ratten-adaptierten BDV-Stamm zeigen die Tiere einen biphasischen Krankheitsverlauf auf. Neurologische Symptome kann man etwa 2-3 Wochen nach intracerebraler Infektion beobachten. Klinische Symptome gehen mit dem Auftreten entzündlicher Veränderungen im Hippocampus einher. Die Enzephalitis erreicht ein Maximum nach ca. 30 Tage *post infectionem (p.i.)*. In dieser akuten Phase der Erkrankung leiden die Ratten an Schreckhaftigkeit, schweren Koordinationsstörungen, Paresen bis hin zu Paralysen. Wenn diese Tiere die akute Erkrankungsphase überleben, gehen sie in eine chronische Phase über. In diesem Stadium kommt es trotz Viruspersistenz im ZNS zu einem Rückgang der entzündlichen Infiltrate und zur Ausbildung einer Gehirnatrophie (Narayan et al., 1983; Planz et al., 1995).

1.5. Morphologie und Taxonomie des BDV

BDV ist ein sphärisches, behülltes Virus mit eine Größe von 80-130nm (Richt et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), welches durch Knospung von der Oberfläche freigesetzt wird (Kohno et al., 1999) (s. Abb. 3).

BDV wurde in den Genus *Bornavirus* der Familie *Bornaviridae* innerhalb der Ordnung *Mononegavirales* taxonomisch eingeordnet. Es verfügt über eine Genomorganisation, die für Mitglieder dieser Ordnung charakteristisch ist (CR, 1996; CR, 1999; Pringle, 1996; Pringle, 1999; Schneemann et al., 1995).



Abbildung 3: Partielle Freisetzung von BDV-Virionen durch Knospung. Knospung von BDV-Partikeln bei BDV-infizierten MDCK-Zellen. Der Pfeil zeigt auf membraninserierte gp94-Glykoproteine (Spikes). Der hier dargestellte Balken hat eine Größe von 100 nm. Nach Kohno et al. (1999).

Zur Ordnung der *Mononegavirales* gehören auch die *Paramyxoviridae* (z.B. Parainfluenza, Mumps und Masernviren), die *Rhabdoviridae* (z.B. VSV und Tollwutviren) und die *Filoviridae* (Marburg und Ebola Viren).

1.6. Molekularbiologie des BDV

1.6.1. Genomorganisation des BDV

Das Genom ist von negativer Polarität, nicht segmentiert und besteht aus Einzelstrang-(ss) RNS mit einer Größe von 8,9 kb, deren 3'- und 5'-Enden teilweise komplementär zueinander sind (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994; Nowotny et al., 2000; Pleschka et al., 2001). Eine Besonderheit der *Bornaviridae* ist die erwähnte intranukleäre Replikation (Briese et al., 1992; Cubitt and de la Torre, 1994). Während diese Eigenschaft bei Orthomyxoviren schon lange bekannt ist, repliziert kein anderer bekannter animaler Vertreter der *Mononegavirales* im Zellkern. Nur Rhabdoviren der Pflanze replizieren ebenso intranukleär (Heaton, 1987). Zumindest sechs verschiedene virale Proteine werden in BDV-infizierten Zellen exprimiert. Dabei handelt es sich um das Nukleoprotein (N), das Phosphoprotein (P), ein 10kDa Protein (p10/X), das Matrixprotein (M), das Glykoprotein (GP) und die RNS-abhängige RNS-Polymerase (L) (s. Abb. 4).



Abbildung 4: Genomorganisation von BDV. Virale Proteine: Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P), X-Protein (X), Matrixprotein (M), Glykoprotein (GP) und die RNSabhängige RNS-Polymerase (L).

Mit 8,9 kb ist das Genom des BDV verhältnismäßig klein, da das Virus eine ganze Reihe von Kodierungs-Strategien verwendet, um alle für Replikation und Transkription benötigten Proteine auf seinem relativ kleinen Genom unterzubringen. Zu den Strategien des Virus gehören außerdem Spleißen von mRNS, die Nutzung von sich überschneidenden offenen Leserastern, Überlesen von Transkriptionsinitiations- und Stoppsignalen und der differentielle Gebrauch von Translationskodons. Während diese Strategien für andere Negativstrangviren bereits beschrieben wurde, ist BDV einzigartig darin, dass dieses Virus alle diese bekannten Strategien nutzt.

Das BDV-Genom enthält 3 Transkriptionsstartstellen (S1; S2; S3) und 4 Terminationsstellen (T1; T2; T3; T4) (s. Abb. 5). Die mRNS weist eine CAP-Struktur auf und ist polyadenyliert, wobei letztere Struktur vermutlich durch "Stottern" der viralen Polymerase beim Ablesen der U-reichen Region am jeweiligen Transkriptionsende erzeugt wird (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994; Schneemann et al., 1995; Schneemann et al., 1995).

Das Genom besitzt weiterhin am 3'-Ende eine nicht-transkribierte *leader*-Sequenz und am 5`-Ende eine *trailer*-Region. Die Nukleotide aus diesem Bereich werden nicht in primären Transkriptionsprodukten gefunden.

Das BDV-Genom codiert mindestens 6 offene Leserahmen (ORF). Vom 5'-Ende zum 3'-Ende sind das die Proteine p40 (NP), p10 (X1), p24 (P), p16 (M), p57 (GP) und p190 (L-Protein). Von diesen Proteinen nutzen das p10 und das p57 jeweils einen um ein Nukleotid verschobenen Leserahmen (ORF). Lediglich das p40 wird durch monocistro-



Abbildung 5: Genomorganisation und Transkription des BDV. Die Transkriptionsstart- (S1-S3) und Transkriptionsstoppstellen (T1-T4) sind auf dem linearen Negativstrang-Genom vom 3'- zum 5'-Ende hin dargestellt. Die Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile gekennzeichnet. Links sind in Kilobasen (kb) die einzelnen viralen Transkripte gezeigt. Die offenen Leseraster (ORF) der unterschiedlichen viralen Transkripte und ihrer Spleißvarianten sind hier rechts dargestellt. Virale Translationsprodukte, welche in infizierten Zellen durch immunhistochemische Methoden identifiziert wurden, sind gekennzeichnet mit den Buchstaben N, p10/X/X, P, P', M, GP und L. Durch Schraffierung sind unterschiedliche Leseraster markiert. Bereiche und Nukleotidsequenzen der Spleiβ-Donor (SD1-SD2) und Spleiβ-Akzeptor-Stellen (SA1-SA3) für BDV Stamm V und He/80 sind durch Pfeile gekennzeichnet. Nach Pleschka et al. (2001). nische mRNS direkt codiert. Alle anderen Genprodukte finden sich auf einer polycistronischer mRNS und werden durch Spleißen oder Überlesen von Transkriptionsstartsignalen generiert.

Der aktive Polymerase-Komplex des Borna Virus besteht aus den viralen Proteinen N, P und L. Das X-Protein wirkt als Regulator der Polymeraseaktivität. Das L-Protein kann mit dem P-Protein spezifisch interagieren, aber nicht mit N, X oder mit sich selber (Schneider et al., 2004). Die Bindung mit dem L-Molekül ändert die Konformation des P-Proteins so, dass zwei zusätzliche Bindungsstellen (für Multimerisation und für Interaktionen mit dem N-Protein) frei für die Bindung werden. Die Interaktion zwischen dem L- und dem P-Protein ist ineffizient, wenn das N-Protein anwesend ist (Schneider et al., 2004). Es ist nachgewiesen worden, dass das P-Protein das zentrale regulatorische Element der BDV-Replikation ist, das den Zusammenbau des Polymerase-Komplexes anleitet (Schneider 2005). Die BDV-Polymerase benötigt für hohe Aktivität das 10-20fache an N-Protein im Überschuss im Gegensatz zum P-Protein (Schneider et al., 2004). Das N-Protein dient als Puffer, welches das N:P-Verhältnis beeinflusst (Schneider et al., 2004). Im Gegensatz dazu gilt das X-Protein als negativer Regulator der Aktivität der BDV- Polymerase (Poenisch at al., 2004).

Da das BDV-RNP aktiv in den Nukleus eindringen kann, hat das RNP einen switch-Mechanismus, der die Richtung des RNP-Transportes in Abhängigkeit von dem viralen Reproduktionszyklus ändern kann. Tomonaga et al. (2002) schlug folgendes Modell für das nukleo-zytoplasmatisches Trafficking des BDV-RNPs vor (s. Abb. 6): das N- und P-Protein haben ein NLS (nuklear localisation signal) in ihrer Sequenz. Zusätzlich hat das N-Protein ein NES (nuklear export signal). Bei den Interaktionen zwischen dem N-Protein und dem P-Protein wird das NLS im N-Protein maskiert. Die BDV-infizierten Zellen enthalten 2 verschiedene Formen des N-Proteins: p40N und p38N. Die p40N-Isoform ist im Nukleus lokalisiert, das p38N akkumuliert in Zytoplasma (Rudolph et al., 2003). Das NES des N-Proteins überlappt mit der P-Bindungsstelle (Kobayashi et al., 2001). Die direkte Interaktion zwischen N-NES und P im Nukleus blockiert den nukleären Export des BDV-RNP während der Replikation des BDV. Eine niedrige Konzentration des P-Proteins im Nukleus exponiert das N-NES und führt zum Export des N-haltigen RNPs. Auch die p38N-Isoform spielt eine wichtige Rolle: das Protein, dem das NLS fehlt, wird nach der viralen Replikation zusammen mit den anderen Proteinen in RNP-Komplexen in den Nukleus transportiert. Durch die Anwesenheit der NLS-fehlenden N-Isoform erhöht sich die relative Zahl der NES-Sites im RNP. Das führt vermehrt zum Export der RNPs in das Zytoplasma, wo die Montage des Virions stattfindet (Tomonaga et al., 2002).



Abbildung 6: Nukleoplasmatisches "Shuttling" des BDV-RNP. vRNS assoziiert mit N und P, worauf der Komplex aktiv vom Zytoplasma in den Nukleus importiert wird. Der Import erfolg durch das NLS (nuklear-lokalisations-Signal) im P-Protein. Das N-Protein enthält ein NES (nuklear-export-Signal), das mit der spezifischen Bindungsstelle zum P-Protein überlappt. Die direkte Interaktion zwischen N-NES und P im Nukleus blockiert den nukleären Export des BDV-RNP während der Replikation des BDV. Durch vermehrte N-Produktion weggefangene P-Proteine können nun nicht mehr das NES auf den N-Proteinen blockieren. Das führt zu niedrigen Konzentration des P-Proteins im Nukleus und zum Export des N- haltigen RNP. Nach Tomonaga et al. (2002).

1.7. Nicht kodierende Bereiche und deren Rolle bei der Virusreplikation

Die virale Polymerase ist verantwortlich für die Transkription (Erzeugung subgenomischer mRNS) und die RNS-Replikation. Um jeden dieser Prozesse zu initiieren, bindet die Polymerase am 3'-Ende der genomischen RNS. Das 3'-NCR (engl., *non coding region*, - nicht kodierende Region) des Minus-Stranges fungiert als Startpunkt für die Synthese des Plus-Stranges und für die Transkription (mRNS-Synthese). Diese Bindung, die auch von der Sekundärstruktur des Endes abhängig ist, ist sehr wichtig für die Initiierung der viralen Replikation. Es ist von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen worden, dass bei verschiedenen Virusgruppen die nicht kodierenden Bereiche (jede einzeln und zusammen) spezifische Sekundärstrukturen

bilden (Dildine and Semler, 1992; Flick and Hobom, 1999; Hsu et al., 1987). Die Aktivität der viralen Polymerase des Influenza Virus (Genus *Influenza*, Familie *Orthomyxoviridae*) war streng abhängig von der Anwesenheit der *template*-RNS, welche die beiden 3'- und 5'-Enden beinhaltete (Hagen et al., 1994).

Es gibt z.B. 3 Modelle für die mögliche Konformation der Influenza Virus-RNS: das so genannte *Panhandle*-Modell (s. Abb. 7) für Strukturen, die an den Enden komplementär sind (Hsu et al., 1987); das "hook/fork"-Modell (s. Abb. 8) für die Strukturen, die im Mittelteil komplementär sind und ein spezifisches "Gabel-Bild" zeigen (Fodor et al., 1995) und das *Corkscrew*-Modell (s. Abb. 9), das ein spezifisches "Korkenzieher-Bild" zeigt (Flick and Hobom, 1999).

Hsu et al. zeigten 1987 nach elektronmikroskopischen Untersuchungen der Virione und nach funktionellen Experimenten, dass die genomische RNS des Influenza Virus im Virion und in infizierten Zellen eine zirkuläre Konformation hat, die mit ca. 15 nt langer *Panhandle*-Struktur der Enden vorliegt. Hsu et al. vermuten, dass die *Panhandle*-Struktur in dem intrazellulären Pool nur dann vorkommt, wenn Transkription stattfindet und kein Zusammenbau der Virione stattfindet. Also dient die *Panhandle*-Struktur der viralen RNS als regulatorisches Signal bei der Kontrolle der mRNS-Synthese (Hsu et al., 1987).

Dabei wurden 3 verschiedene Funktionen der *Panhandle*-Struktur beim Replikationsprozess des Influenza Virus diskutiert:

- Sie dient als Signal f
 ür das Umschalten zwischen der mRNS-Synthese und der cRNS-Synthese, d.h., zwischen der Transkription und der Replikation. "Zirkuläre" RNA wird dabei als Vorlage f
 ür die Synthese der mRNS benutzt, also f
 ür die Transkription.
- 2) Die *Panhandle*-Struktur dient als Terminations-Signal bei der Synthese der viralen mRNS. Die *Panhandle* selbst besitzt eine U₅-U₆ Sequenz, die als Terminations-Signal für die mRNS-Synthese bekannt ist (Robertson et al., 1985). Es ist interessant zu bemerken, dass die U₅-U₆ Sequenz 36 mal in dem Genom des A/PR/8/34-Influenza A Virus vorkommt (Lamb, 1983), aber nur im Kontext mit der *Panhandle*-Struktur zur Termination der RNS-Synthese und zur Polyadenylierung der mRNS führt.
- Die *Panhandle* funktioniert als Initiierungsstelle f
 ür die Verpackung der viralen Nukleoproteinkomplexe in den viralen Partikel (Hsu et al., 1987).



Abbildung 7: Modell der Panhandle-Struktur des Influenza Virus. Die für Basenpaarung in Frage kommenden Nukleotide sind mit Linien verbunden. G-U-Paare, die weniger stabil sind als die konventionell gepaarten Basen, sind mit Punkten markiert. Die eingerahmte Region ist für alle 8 Segmente des Genoms mit einer Ausnahme identisch: das mit dem Stern markierte U an der Position 4 in den Segmenten 1, 2, 3, und 6 ist durch ein C ersetzt. Das U_5 - U_6 Terminations-/ Polyadenylierungs-Signal ist unterstrichen und befindet sich direkt neben der Panhandle-Struktur. Nach (Hsu et al., 1987).

Nach dem Fork-Modell (s. Abb. 8), sind nur die Nukleotide 10-15 am 3`-Ende und die Nukleotide 11`-16` am 5`-Ende des Influenza Virus durch Watson-Crick- Bindungen gepaart. Es wird vermutet, dass das 5`-Ende der vRNS als Teil des vRNS-Promotors agiert. Es wurde folgendes Schema des viralen Vermehrungsprozesses und der Rolle des 5`-vRNS-Promotor vorgeschlagen (Fodor et al., 1995): das vRNS 3´-Ende, nach der Replikation der vRNS in die cRNS, funktioniert als 5´-Ende der cRNS. Der Polymerase-Komplex erkennt das 5`-Ende der cRNS in einzelsträngiger Konformation und bindet das RNS-Molekül. Nach der Bindung mit dem 5`-Ende steigt die Affinität der viralen Polymerase zum einzelsträngigen 3`-Ende, was durch den synergetischen Effekt der Basenpaarung in der Duplex-Region (nt 10-15) des RNS-Fork-Modells verursacht wird. Die Basen 1´-10´ des 5´-Endes sind von der gebundene Polymerase verdeckt, - dies verhindert die Basenpaarung mit dem 3´-Ende. Das einzelsträngige 3´-Ende wird dann in das katalytische Zentrum der RNS-Polymerase positioniert, was die Initiation der Transkription erlaubt.

Abbildung 8: "Fork"-Modell der RNS des Influenza Virus für die Initiation der Virustranskription. Die vermutlich an Basenpaarungen beteiligten Nukleotide sind mit Linien verbunden. Nach (Fodor et al., 1995).

Nach dem *Corkscrew*-Modell besitzt die nicht-protein-gebundene vRNS eine *Panhandle*-Struktur (s. Abb. 9, 10). Das proximale Promotorelement besteht aus 9 teilweise komplementären Nukleotiden der vRNS 5'- und 3'-Enden. Die drei Elemente 9 bp-*Panhandle*, das ungepaarte Nukleotid Adenosin 10 und 6 bp-*Panhandle* (s. Abb. 9A) tragen zu der "geknickten" Konformation des Moleküls bei (Flick and Hobom, 1999). Nach der Bindung mit der viralen RNS-Polymerase ändert sich die Konformation (s. Abb. 10): die Nukleotide 2 und 3 interagieren mit den Nukleotiden 9 und 8 in jedem Strang so, dass 2 kleine *Stem-Loops* entstehen (s. Abb. 9B). In dieser Konformation befinden sich die Nukleotide 4-7 in einem einzelsträngigen *Tetra-Loop*. Die 2 neue entstandenen Stem-Loops, die 6bp-*Panhandle* und das ungepaarte A nehmen eine Konformation an, die als *Corkscrew* bezeichnet wird (s. Abb. 9B). Das U₅-U₆ Terminations-/ Polyadenylierungs-Signal befindet sich direkt neben den Stem-Loops der *Corkscrew*-Struktur.

Ein Austausch von Nukleotiden in den kleinen Stems (nt 2-3 und 8-9) bleibt ohne Einfluss, solange die räumliche Struktur erhalten bleibt. Die Polymerase kann also nur die Struktur "fühlen" und nicht die Sequenz. (Flick et al., 1999). In Gegensatz dazu müssen die Nukleotide in den Loops (nt 4-7) in der korrekten Position und in der richtigen Orientierung sein (Flick et al., 1999).

Es wurde gezeigt, dass die Polymerase mit den zwei vRNS-Enden schrittweise interagiert (Li et al., 1998). Bei dem *Corkscrew*-Modell ist die Konformations-Änderung in eine "flache" *template*-Struktur nach der Polymerasebindung erleichtert. Diese ist während der Initiation der Transkription und der Replikation notwendig. Nur



Abbildung 9: *Panhandle-* und *Corkscrew-Struktur* des Influenza Virus. *A: Konformation der vRNS-Enden bei der freien RNS (Panhandle); B: Konformation der vRNS-Enden mit der gebundenen vPolymerase (Corkscrew). Nach Flick et al. (1999).*



Abbildung 10: Modell der 2-Schritt-Interaktionen der viralen Polymerase des Influenza Virus mit der terminalen vRNS-Promotor-Sequenz. Die virale Polymerase ist als Kreis schematisch dargestellt. Die drei Sektoren sind die drei Untereinheiten der viralen Polymerase (PB1, PB2 und PA). A: die vRNS noch nicht mit der Polymerase gebunden; die vRNS ist noch ein geschlossener Komplex, und die Polymerase interagiert mit der 10bp-langen Panhandle der vRNS. B: die proteingebundene vRNS ändert die Konformation zum offenen Komplex, der Corkscrew-Konformation, und interagiert mit der viralen Polymerase. Nach (Flick and Hobom, 1999).



Abbildung 11: Struktur des aktivierten Influenza Virus-Promotors. *A: Konformation der vRNS-Enden; B: Konformation der cRNS-Enden. Nach Azzeh et al.* (2001).

das 3´-Ende muss bei der Initiation der mRNS- oder cRNS- Synthese aufschmelzen und die Konformation ändern. Das 5´-Ende kann unverändert bleiben und seine Konformation behalten (Flick et al., 1999).

Beide vRNS- und cRNS- Konformationen (s. Abb. 11) werden von der Polymerase erkannt und akzeptiert (Azzeh et al., 2001). Unterschiedliche, divergente Interaktionen der vRNS- und cRNS-*termini* mit der viralen Polymerase führen nur zum Verpacken des vRNP- und nicht des cRNP-Moleküls in das Virion (Tchatalbachev et al., 2001). Das liegt wahrscheinlich daran, dass die virale RNS-Polymerase bei Interaktionen mit den verschiedenen Promotoren (in dem Fall: cRNS- oder vRNS-Promotoren) verschiedene Konformationen annimmt. Und nur die RNS-Polymerase, die mit dem gebogenen 5'-Ende der vRNS interagiert, scheint für den nukleären Export verantwortlich zu sein (Tchatalbachev et al., 2001).

Brownlee zeigte für das Influenza Virus, dass für den Schutz der RNS-Polymerase in einem *Heat-Protection-Assay* die Basenpaarung zwischen den 3'- und 5'-Enden des vRNS-Promotors vorhanden sein muss (Brownlee et al., 2002). Auch die Stem-Loop-Strukturen der beiden 3'- und 5'-Enden der vRNS schützen die RNS-Polymerase vor der Hitze-Deaktivierung. Das heisst, nur der Promotor in *Corkscrew*-Konformation schützt die RNS-Polymerase vor Hitzeinaktivierung (Brownlee et al., 2002).

Auch für andere Viren ist nachgewiesen worden, dass die RNS-Promotoren und deren Konformation eine wichtige Rolle in der viralen Vermehrung spielen. Bei dem negativorientierten, nicht segmentierten Vertreter der Familie *Filoviridae*, dem Ebola Virus (Genus *Ebolavirus*, Familie *Filoviridae*, Ordnung *Mononegavirales*) enthalten die kurzen nicht kodierende Regionen, die sich auf den 3⁻ und 5⁻Enden des viralen Genoms befinden, Signale für die Replikation, Initiierung der Transkription und Enkapsidierung (Mühlberger et al., 1990). Das 3⁻Ende des Ebola Virus Genoms beinhaltet einen sehr stabilen Stem-Loop (s. Abb. 12). Die Untersuchung der Struktur wurde hier mit der Primer Extention-Methode durchgeführt (Modifizierungen mit DMS und CMCT (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbo-diimide metho-p-toluenesulfonate, modifiziert nicht gepaarte U und G)).

Das Nukleokapsidprotein des Ebola Virus hat eine Doppelfunktion: es ist in die virale Morphogenese (s. Abb. 12) als strukturelle Komponente verwickelt, und es katalysiert die Replikation und die Transkription des viralen Genoms (Kolesnikova et al., 2000). Die Bildung der Sekundärstruktur des ersten Transkriptionsstartsignals (im NP-Gen) ist eine Voraussetzung für die Transkription des VP-30 Proteins (Weik et al., 2002).

Es wurde bei der Analyse der verschiedenen mRNS-Spezies des Marburg Virus (Genus Marburgvirus, Familie Filoviridae, Ordnung Mononegavirales) festgestellt, dass die 21

sekundäre Struktur konserviert bleibt, auch wenn sich die Nukleotidsequenz der Enden bei den verschiedenen Stämmen ändert, was auf die wichtige Rolle des Stem-Loop-Elements in der Reproduktion des Marburg Virus hinweist (Mühlberger et al., 1996). Die Sequenz der 5`-Enden der mRNS des Ebola Virus enthält konservierte Sequenzen, die ähnlich zu den Sequenzen des Marburg Virus sind, was auf die Bedeutung der Stem-Loop-Strukturen für die Filoviren hindeutet (Mühlberger et al., 1996).



Abbildung 12: Die Startregion des Nukleoprotein-Gens des Ebola Virus befindet sich in einem stabilen Stem-Loop. Die Nukleotide, die zum konservierten Transkriptions- Start-Signal gehören, sind durch Kästchen markiert. Abgebildet ist das 5'-Ende des Plus-Stranges. Nach Weik et. al (2002).

Die korrekte Faltung der RNS ist auch erforderlich für die Initiation und Elongation der Transkription des Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 (Genus Lentivirus, Familie *Retroviridae*). Ebenso ist die Plus-Strang-Leader-Sequenz der hauptregulatorische Faktor der RNS-Replikation und der Enkapsidation des Vesicular Stomatitis Virus (VSV) (Genus Vesiculovirus, Familie Rhabdoviridae, Ordnung Mononegavirales) (Blumberg 1991). Die ersten 19 nt am 5'-Ende der antigenomischen RNS des VSV sind ausreichend und notwendig für die Enkapsidierung. (Leopardi et al., 1993). Für die vollständige Enkapsidierung wird die Anwesenheit von löslichen zellulären Proteinen benötigt (Moyer et al., 1991). Die 3'-Leader-Region des VSV funktioniert als Promotor sowohl für die Transkription der viralen mRNS als auch für die Replikation zur Herstellung des positiv-stang-Antigenoms (Whelan et al., 1999). Die 5'-Trailer-Region dient ausschließlich als Promotor für die Replikation des viralen Genoms (Whelan et al., 1999).

Peeples zeigte, dass die 3'- und 5'-Enden des Respiratorischen Syncytial Virus (RSV) (einzelsträngig, negativ-orientiert; Genus *Pneumovirus*, Subfamilie *Pneumovirinae*,

Familie *Paramyxoviridae*, Ordnung *Mononegavirales*) das Potential haben, *Panhandle* Strukturen zu bilden (Peeples and Collins, 2000). Peeples et al. haben Einzelmutationen der sieben letzten Nukleotide in der 5'-Trailer-Region des Genoms des RSV untersucht. Sie konnten feststellen, dass Mutationen in den letzten sieben Nukleotiden der 5'-NCR (Trailer Region) die virale Replikation inhibieren, wobei die direkte Einwirkung auf die sekundäre Struktur des cis-aktiven Elementes sehr wahrscheinlich den antigenomischen Promotor betreffen (Peeples et al., 2000). Das Nukleotid an Position 7 (G) scheint die Akkumulation der antigenomischen RNS, d.h. des Replikationsproduktes, zu inhibieren, wirkt aber nicht auf die mRNS-Synthese. Sehr wahrscheinlich hat dieses Element spezielle Promotor-Funktionen für Replikation, aber nicht für die Transkription.

Shen und Miller haben für das Tobacco Necrosis Virus (einzelsträngig positivorientiert; Genus *Necrovirus*, Familie *Tombusviridae*) gezeigt, dass die 3'-NTR (so genanntes Translations-Element) in eine Langstrecken-Basenpaarung mit dem 5'-NCR treten kann, und dass diese Bindung konserviert und für das Virus erforderlich ist (Shen and Miller, 2004).

Dildine zeigte, dass spezifische RNS-Strukturen in der 5'-NCR der Picornaviren (einzelsträngig, positiv-orientiert; Familie *Picornaviridae*) für eine stabile Bindung mit zellulären Proteinen erforderlich sind (Dildine and Semler, 1992). Die 5'-NCR des Flavivirus (einzelsträngig, positiv-orientiert; Genus *Flavivirus*, Familie *Flaviviridae*) ist fähig, die Translation des *downstream* liegenden ORF durch Bindung von Ribosomen zu beeinflussen (Tucker et al., 1999). Die 5'-NCR des Poliovirus (einzelsträngig, positiv-orientiert; Genus *Entherovirus*, Familie *Picornaviridae*) gehört zur putativen IRES (*internal ribosome entry site*) (s. Abb. 13) (Haller and Semler, 1995; Ochs et al., 2002).

Eine IRES erlaubt die Bindung von Ribosomen unabhängig von einer 5'-Cap-Struktur. Die IRES-Struktur bewirkt, dass die ribosomalen Untereinheiten das Virusgenom als mRNS erkennen, mit dem Startkodon interagieren und so die ersten Translationsschritte einleiten können. Es wird vermutet, dass durch die Sekundärstruktur eine dem Translationsstart direkt vorgelagerte Basenfolge stabilisiert wird, die komplementär zur 18S-RNS der kleinen Ribosomenuntereinheit ist. Die rRNS kann so mit dem Virusgenom hybridisieren und hierüber das Ribosom zur korrekten Startstelle für die Proteinsynthese leiten (Modrow et al., 2003). Das IRES-Element besteht aus Domänen mit hoch konservierter RNS-Sekundärstruktur und hat einen charakteristischen Oligopyrimidin-Trakt mit darauf folgendem AUG-Triplett an seinem 3`-Ende (Ochs et al., 2002). Dieses Start-Kodon für die Synthese der viralen Proteine befindet sich downstream von der IRES und wird bei dem ribosomalen Ablesen erreicht. Auch bei dem Hepatitis C Virus (einzelsträngig, positiv-orientiert; Genus *Hepacivirus*, Familie *Flaviviridae*) findet die Translation der RNS-Genome mittels einer IRES statt, und die Bildung des Stem-loops ist für die Initiation bei HCV-IRES notwendig (Fukushi et al., 1994; Imbert et al., 2003; Wang et al., 1995).



Abbildung 13: Internal ribosome entry site (IRES) an der 5'-NCR der vRNS des Poliovirus. Die verschiedenen Domänen des IRES sind mit römischen Zahlen markiert. Als "py" ist der Oligopyrimidin-Trakt bezeichnet. Das Startkodon für das Protein befindet sich an der Position 743-745. Nach(Ochs et al., 2002).

An dem 3`-Ende des HCV-Genoms befindet sich eine dreiteilige 3'-NCR-Region, die aus einer nicht-konservierten Region, einem Polypyrimidin-Trakt und einem hochkonservierten Abschnitt (98 nt) besteht. Imbert et al. haben nachgewiesen, dass bei HCV die Anwesenheit der 3`-NCR keinen Effekt auf die Translationseffizienz des IRES hat (wenigstens in der Gegenwart von strukturellen- und nicht-strukturellen HCV-Proteinen) (Imbert et al., 2003). Fukuschi et al. haben nachgewiesen, dass unbedingt das komplette 5'-NCR, das alle Stem-loop-Strukturen enthält, für die Initiation der Bildung des HCV-IRES notwendig ist (Fukushi et al., 1994).

Haying Yu et al. haben mittels Primer Extention nachgewiesen, dass im BVDV (*Bovine Viral Diarrhea Virus*, einzelsträngig, positiv-orientiert; Genus *Pestivirus*, Familie *Flaviviridae*) sekundäre Strukturen der RNS der 5`NCR auf die IRES einwirken (Yu et al., 2000). Todd und Semler zeigten 1996 für das Rhinovirus (einzelsträngig, positiv-orientiert; Genus *Rhinovirus*, Familie *Picornaviridae*), dass Mutationen innerhalb der 3`NCR zu Phänotypen mit gestörtem Wachstum führen, die aber nicht letal sind (Todd and Semler, 1996). Pisalev et al. (2004) haben signifikante funktionelle und strukturelle 24

Ähnlichkeit zwischen den IRES-Elementen des Picornavirus PTV-1 und des Hepatitis C Virus (Genus *Hepacivirus*, Familie *Flaviviridae*) festgestellt.

Die 3'- und 5'-Enden des BDV sind teilweise komplementär zueinander und enthalten IR (Inverted Repeat)- und DR (Directed Repeat)-Sequenzen in konservierten Bereichen (s. Abb. 14, 15), die theoretisch zu RNS-Sekundärstrukturen (Hairpin-Loop) führen können (Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994; Nowotny et al., 2000; Pleschka et al., 2001). In der Abbildung 14 sind *Directed Repeats* (s. Abb. 14A) und *Inverted Repeats* (s. Abb. 14B,C) der 3'-NCR des BDV dargestellt. Die Richtung der *Inverted Repeats* ist mit Pfeilen angezeigt die Sequenz der 3'-NCR ist in antigenomischer Richtung dargestellt. Im Teil A sind CAA-*Directed Repeats* gezeigt. Alle CAA-DR befinden sich im hochkonservierten Bereich des NCR. IR 1 und 2 befinden sich auch in der hochkonservierten Region der NCR. Die IR 3 und 4 sind weniger konserviert (s. Abb. 14).

In der Abbildung 15 sind *Directed Repeats* (s. Abb. 15A) und *Inverted Repeats* (s. Abb. 15B) des 5'-nicht kodierenden Bereichs des BDV gezeigt. Die Richtung der *Inverted Repeats* ist mit Pfeilen angezeigt. Die Sequenz der 5'-NCR ist in der genomischen Richtung dargestellt. Im Teil A sind CAA- *Directed Repeats* gezeigt. Alle CAA-DR befinden sich im hochkonservierten Bereich des NCR (Ausnahme: Stamm Nowotny 98), IR 5 befindet sich auch in der hochkonservierten Region der NCR. Die IR 6, 7 und 8 sind weniger konserviert (s. Abb. 15B).





27

Einleitung

2. Problemstellung

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Sekundärstruktur der nicht kodierenden Endbereiche (NCR) in der genomischen RNS des Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) nachzuweisen und strukturell zu untersuchen. Ebenso wie die Primärsequenz, sind auch die Sekundärstrukturen wichtige Faktoren für die virale Genomreplikation und -Transkription. So zum Beispiel, spielen IRES-Strukturen wichtige Rolle bei Translation der verschiedenen Viren : z.B., in BVDV, Hepatitis C Virus (Todd and Semler, 1996; Modrow et al., 2003; Briese et al., 1994; Cubitt et al., 1994).

Um Mechanismen der Aktivität zu verstehen ist es notwendig, die nativen Strukturen der RNS zu untersuchen. Die Bestimmung der sekundären Struktur ist der ausschlaggebende Schritt in diesem Prozess (Mathews et al., 2004).

Zu Beginn dieser Arbeit war noch kein Reverses Genetiksystem (Mini-Genom System) für BDV entwickelt, welches erlaubt genetische Studien von cis-aktiven Signalen (3´-5´-NCR), die für die Genomreplikation und Transkription wichtig sein könnten, durchzuführen. Deshalb wurde versucht mittels biochemischen Methoden putitativ funktionelle Sekundärstrukturen der 5´- und 3´-NCR im BDV-Genom nachzuweisen und zu analysieren, und somit das Wissen zur BDV-Genetik zu verbessern. Gleichzeitig sollen gewonnene Ergebnisse die Grundlage bilden für zukünftige gezielte molekulargenetische Mutationsanalysen über die Funktion einzelner Nukleinsäuren bzw. von Sequenzabschnitten in den beiden NCR (wie z.B. für Tollwutvirus (Kingsbury, 1990; Schnell et al., 1994); VSV (Lawson et al., 1995), Masernvirus (Radecke F., 1995) und das Influenza A Virus (Azzeh et al., 2001; Collins et al., 1995; Flick et al., 1996; Flick et al., 1999; Fodor et al., 1999;).

Mittlerweile existieren drei reverse Genetiksysteme zur Expression eines BDV-Mini-Genoms, bei denen ein Virusgenom ähnliches Transkript von transient exprimierten bzw. von Virus exprimierten BDV-Proteinen (L, N, P) repliziert und transkribiert werden kann. Ersteres wurde von Schneider et al. etabliert (Schneider et al., 2003). Bei diesem BDV-unabhängigem System wird das BDV-RNS Mini-Genom intrazellulär von einen T7-Plasmid synthetisiert (in den BSR-T7-Zellen, die T7-RNS-Polymerase exprimieren). Eine Kotransfektion mit Plasmiden, welche die BDV-L, N und P Proteine T7-abhängig exprimieren, ermöglicht die Replikation und Expression des Mini-Genoms. Ein Pol II - BDV-unabhängiges, plasmidgestütztes System wurde von Perez et al. etabliert (Perez et al., 2003). Hier wird das BDV-Mini-Genom intrazellulär durch die Polymerase I von einem Pol I-Plasmid synthetisiert. Eine Kotransfektion mit Plasmiden, welche die BDV-Proteine exprimieren und unter Kontrolle der Polymerase II stehen, ermöglicht die Replikation und Expression des Mini-Genoms.

Beide Systeme zeichnen sich durch unterschiedliche 3'- und 5'-Endsequenzen aus, welche nicht komplett homolog sind. Hierbei ist zu beachten, dass alle bis jetzt untersuchten NCR-Sequenzen von Negativ Strang RNS-Viren in ihrem Ende komplementär und nicht überlappend sind.

Ein drittes BDV-abhängiges reverses Genetiksystem wurde von Ma in der Arbeitsgruppe Pleschka in Gießen etabliert (Ma, 2003). Sein System benutzt die BDV 5'-NCR-Sequenz, welche ohne Überhang komplementär zu 3'-NCR ist.

Es hat sich gezeigt, dass aufgrund der äußerst geringen Replikationsaktivität diese 3 Systeme zur funktionellen Untersuchung des 3'- und 5'NCR bislang nicht benutzt werden können.

Deswegen wurden in dieser Arbeit biochemische Untersuchungen zur Sekundärstruktur der nicht kodierenden Bereiche in der genomischen RNS des Virus der Bornaschen Krankheit durchgeführt, wobei die komplementären nicht überlappenden NCR-Sequenzen (Pleschka et al., 2001) zugrunde gelegt wurden. Hierdurch sollte geklärt werden, ob konservierte "Inverted Repeat"(IR)-Sequenzen *in vitro* zur Bildung von spezifischen Sekundärstrukturen führen, welche eine funktionelle Bedeutung bei der Replikation/ Transkription des BDV-Genoms haben könnten.

Material und Methoden

3. Material

3.1. Chemikalien

Aceton	Roth
Acrylease	Stratagene
Agarose (AgarAgar)	Serva
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth
Ampicillin	Serva
rAdenosinphosphat	Boehringer
Borsäure	Roth
Bis-Tris-Propan-HCl	Roth
Bovines Serum Albumin (BSA)	NEB
Bromphenolblau	Merck
Chloroform	Roth
Desoxinukleotidtriphosphate (dNTPs)	GibkoBRL
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka
Dimethylsulfat (DMS)	Fluka
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
Dithiotreitol (DTT)	Serva
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Formamid	Roth

Glycerin	Roth
Glycogen	Roche
Harnstoff	Roth
Hefeextrakt	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kasein Hydrolysat	Serva
Magnesiumacetat	Roth
Magnesiumchlorid	Gibco
β-Mercaptoethanol	Roth
Methanol	Roth
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Serva
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumhydroxid	Merck
Natriumpyrophosphat Na ₄ P ₂ O ₇ x10H ₂ O	Roth
Natriumsulfit	Roth
Natriumjodid	Roth
Pepton tryptisch verdaut	Merck
Phenol	Roth
Polyethylenglycol	Merck
Resin AG 501-X8	BioRad

Salzsäure	Roth
SDS – s. Natriumdodecylsulfat	
Spermidin	Roth
N,N,N',N' - Tetramethylendiamin (TEMED)	Serva
Tris(hydroxymethyl)aminoethan	Serva
Tris-Acetat	Roth
TritonX-100	Roth
X7 1 1	с.
Xylencyanol	Sigma
3.2. Antibiotika	
Ampicillin, Serva	
Stammlösung: 100mg/ml;	
Endkonzentration im Medium: 100µg/ml.	
3.3. Enzyme	
Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP), 10U/µl	NEB
AMV Reverse Transkriptase, 10U/µl	Promega
DNaseI (RNase free), 10U/µl	Roche
High Fidelity PCR Enzyme Mix, 3,5U/µl	Roche
Nuklease S1, 150U/µl	APB
Protector RNase Inhibitor, 40U/µl	Roche
Proteinase K, 20µg/µl	Ambion
Quick T4 DNA Ligase, 2000U/µl (Cohesive End Ligation Unit)	NEB
Restriktionsendonukleasen	NEB
RNaseOUT TM Ribonuklease Inhibitor, 40U/µl	Invitrogen
RNasin [®] Ribonuklease Inhibitor, 40U/µl	Promega
SuperScriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen
T7-DNA-Polymerase, 8U/µl	usb
T4-Polynukleotidkinase, 10U/µl	NEB
T7-RNA-Polymerase, 50U/µl	NEB
Transcriptor Reverse Transkriptase (TRT), 20U/µl	Roche

Material und Methoden

3.4. Radioaktive Nukleotide

 γ -³²P dATP, 10 μ Ci/ μ l

3.5. Kits

Expand High Fidelity PCR System	Roche
Gel Extraktion Kit Qiaex II	Qiagen
High pure PCR product Purification Kit	Roche
Plasmidisolierungs-Kit "Plasmid Midi Kit"	Qiagen
Plasmidisolierungs-Kit "Plasmid Maxi Kit"	Qiagen
QIAprep spin miniprep kit	Qiagen
Quick Ligation TM Kit	NEB
Rotiphorese Gel System	Roth
T7 Sequencing Kit	usb

3.6. Größenstandards

1 kb DNA Leiter RNA centuryTM -Plus Size Marker

3.7. Plasmide

pBluescript II SK (+) pPOL1HHR CAT 2.1#3.6 pT7 CAT RT (-) pBluescript II SK (+) 3'NCR-BDV pBluescript II SK (+) 5'NCR-BDV

3.8. Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind von MWG Biotech bestellt. BDV 3'NCR-Fw: 5'-GCG CTC TAG ACG TCT CGA GTC TGT TGC GTT AAC AAC-3' BDV 3'NCR-Bw: 5'-GCG CAA GCT TGG ATG AGC ATT CAT CAG GC-3' BDV 5'NCR T7-Fw: 5'-GCG CAA GCT TGT GAG TTT CAC CAG TTT TG-3'

Amersham Biosciences

Peqlab Biotechnologie Ambion

Referenz Stratagene W.Ma,2003

diese Arbeit diese Arbeit BDV 5'NCR T7-Bw:

5'-GCG CTC TAG ACG TCT CGA GTC ACA ACG CGA TGT TGT TTC GTT GTT GGT TTG GGT TCG TGA CGT GGT GAC TGT ATA CCA AAA AAT TCT TAT CCC GTC ATC CAC CGA ATT GGT CAC GCT CCT CCC TGC C-3'

3.9. Bakterienstämme

E.coli XL1 blue: recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, (rk,mk+), supE44, relA1, λ - (F', proAB, lac1^qZ Δ M15, Tn10 Tc^r), Stratagene

3.10. Spezielle Artikel und Geräte

Elektroporation - Biorad E.coli Pulser	Biorad
Elektroporationsküvetten 0,2cm	Biorad
Geltrockner	Fischer
Heizblock mit Regler JumoTron	Werkstatt des MZI; Uni Giessen
Magnet-Heizrührer	Janke&Kunkel Ikamag RH
3mm-Papier	Whatman
Probe Quant TM G-50 Micro Columns	APB
PCR-Maschine Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer
pH-Meter Metrohm 632	Metrohm
Phosphoimager Typhoon 9200	molecular dynamics (APB)
Phosphoimager-Screens "Fuji Imaging Plate"	Fuji
Röntgenfilme Kodak BioMax MS-1	Kodak
Röntgenfilme Kodak X-Omat AR	Kodak
Spannungsgerät Pharmacia LKB ECPS 3000/150	APB
Spektrophotometer DU-70	Beckman
Szintillationzähler 1209 Rackbeta	Wallac
Tischzentrifuge Biofuge 13	Heraeus

3.11. Firmen

Ambion;

Amersham Biosciences; APB (Amersham Pharmacia Biotech) UK Ltd; Hundingdon, Cambrigeshire (UK) Freiburg Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA,England
Beckman;	Krefeld
BioRad;	München
Boehringer;	Mannheim
ICN	USA
Invitrogen	Karlsruhe
Fischer Scientific;	Schwerte
Fluka Riedel-de Haën;	Taufkirchen
Fuji Photo Film Co., LTD;	Japan
Gibco/BRL (Life Technologies);	Karlsruhe
Heraeus Instruments GmbH;	Hanau
Janke&Kunkel, IKA-Maschinenbau GmbH;	Staufen
Kodak;	Rochester, New York (USA)
Merck KgaA;	Darmstadt
Metrohm GmbH & Co. KG;	Filderstadt
Molecular dynamics (APB);	England, Little Chalfont,
	Buckinghamshire HP7 9NA,
MWG Biotech AG;	Ebersberg
NEB (New England Biolabs);	Frankfurt am Main
peqlab Biotechnologie GmbH;	Erlangen
Perkin Elmer;	Wellesley (USA)
Promega Corporation;	Woods Hollow Road Madison
	(USA)
Qiagen;	Hilden
Roche;	Mannheim
Roth, Carl, GmbH;	Karlsruhe
Serva;	Heidelberg
Sigma-Aldrich;	Taufkirchen
Stratagene Europe;	Amsterdam (The Netherlands)
usb;	Cleveland, Ohio (USA)
Wallac (jetzt Perkin Elmer);	Wellesley (USA)
Whatman;	Gerbershausen
Werkstatt des MZI, Uni Giessen	Giessen

3.12. Medien Alle Medien für Bakterienkulturen werden autoklaviert. LB-Medium 10g Pepton 5g Hefeextrakt 5g NaCl auf 1L mit ddH₂O auffüllen LB-Agarplatten LB-Medium mit 2% (w/v) AgarAgar werden autoklaviert. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen auf 50°C als Selektionsmarker (Endkonzentration 100µg/ml) zugesetzt. 2^x-YT-Medium 16g Pepton (oder Tripton) 10g Hefeextrakt 5g NaCl pH auf 7,0 einstellen (mit 5N NaOH) auf 1L mit ddH₂O auffüllen 2^x-YT-Agarplatten 2^x-YT-Medium mit 2% (w/v) AgarAgar werden autoklaviert. Antibiotika wurden nach dem Abkühlen auf 50°C als Selektionsmarker (Endkonzentration 100µg/ml) zugesetzt. NZY Bouillon 10g casein hydrolysate 5g Hefeextrakt 5g NaCl pH auf 7,5 mit NaOH einstellen; autoklavieren NZY⁺ Bouillon 10ml NZY Bouillon 125ml MgCl₂ 1M, steril 125µl MgSO₄ 1M, steril 200ml Glukose 20%, steril gut mischen und bei +4°C aufbewahren

S.O.C.-Medium

von Invitrogen Lagering: bei RT

3.13. Allgemeine Puffer und Lösungen	
Enzympuffer	
2x Quick Ligation Puffer	132mM Tris-HCl
	20mM MgCl ₂
	2mM DTT
	2mM APT
	15% Polyethylenglycol
	pH 7,6 bei 25°C
2x S1-Nuklease Puffer	60mM NaAc, pH 7,4 bei 25°C
	200mM NaCl
	2mM ZnSO ₄
5x Reaction Puffer für AMV Reverse	250mM Tris-HCl, pH 8,3 bei 25°C
Transkriptase	250mM KCl
	50mM MgCl ₂
	50mM DTT
	2,5mM Spermidine
5x First-Strand Buffer	250mM Tris-HCl (pH8,3 bei RT)
	375mM KCl
	15mM MgCl ₂
10x CIP Puffer	500mM Tris-HCl
	1mM EDTA
	pH 8,5 bei 25°C
10x T4-Polynukleotidkinase - Puffer	700mM Tris-HCl
	100mM MgCl ₂
	50mM DTT

10x T7-RNA-Polymerase 400mM Tris-HCl 60mM MgCl₂ 100mM DTT 20mM Spermidine pH 7,9 bei 25°C TRT Reaction Buffer, 5x konzentriert 250mM Tris-HCl (pH8,5 bei RT) 150mM KCl 40mM MgCl₂

Puffer für Restriktionsendonukleasen (NEB)

Konzentration ist in mM angegeben. Diese Puffer werden vom Hersteller als zehnfach Puffer geliefert.

10x Puffer	1	2	3	4
Tris-Acetat	-	-	-	200
Tris-HCl	-	100	500	-
Bis-Tris-Propan-HCl	100	-	-	-
Mg-Acetat	-	-	-	100
MgCl ₂	100	100	100	-
K-Acetat	-	-	-	500
NaCl	-	500	1000	-
DTT	10	10	10	10
pH bei 25°C	7,0	7,9	7,9	7,9

Lösungen für die PCR:

dNTPs, 10mM Mix (je. dNTP 10mM) Jeder NTP wird vom Hersteller als 100mM Lösung geliefert. 400 μ l von jedem dNTP (A,C,G,T) und 600 μ l ddH₂O zusammenmischen; Lösung portionieren. Aufbewahren bei –20°C.

10x PCR-Puffer Expand HF mit 15mM MgCl₂ Roche

Puffer für die Plasmidisolierung:	
Puffer P1	Lösen 6,055g Tris (base), 18g Glukose und 3,722g EDTA·2H ₂ O in 800ml H ₂ O. pH auf 8,0 mit HCl einstellen. Auf 1L mit H ₂ O auffüllen. Es wird vor der Benutzung auf jeden Milliliter Puffer 1µl RNaseA (100µg/µl) zugegeben. Endkonzentration der RNaseA im Puffer ist 100µg/ml.
Puffer P2	8g NaOH Plätzchen in 950ml H ₂ O lösen. 50ml 20%-er SDS-Lösung dazugeben.
Puffer P3	294,45g KAc in 500ml H ₂ O lösen. pH auf 5,5 mit Essigsäure einstellen. Auf 1L mit H ₂ O auffüllen.
Puffer QBT	43,83g NaCl und 10,46g MOPS in 800ml H_2O lösen. pH auf 7,0 einstellen. Zugeben 150ml reinen Ethanol und 15ml 10% Triton X-100. Auf 1L auffüllen.
Puffer QC	58,44g NaCl und 10,46g MOPS in 800ml H_2O lösen. pH auf 7,0 einstellen. 150ml reinen Ethanol dazugeben. Auf 1L mit H_2O auffüllen.
Puffer QF	73,05g NaCl und 6,055g Tris (base) in 800ml H_2O lösen. 150ml reinen Ethanol dazugeben und pH auf 8,5 mit HCl einstellen. Auf 1L mit H_2O auffüllen.
Puffer STE	5,844g NaCl; 1,211g Tris (base) und 372,2mg EDTA \cdot 2H ₂ O in 800ml H ₂ O lösen. pH auf 8,0 mit HCl einstellen. Auf 1L mit H ₂ O auffüllen.

Lösungen für GeneClean:	
6M NaJ	90,8g NaJ und 1,5g Na ₂ SO ₃ in 90ml H ₂ O lösen. Lösung auf 100ml auffüllen, filtrieren. Danach noch 0,5g Na ₂ SO ₃ dazugeben. Aufbewahrung: dunkel, bei 4°C.
New Wash Puffer	Konzentrat: Tris-HCl 1M (pH 7,5), 1M NaCl, 100mM EDTA. Vor Benutzung 1:100 mit 70% EtOH verdünnen.
Lösungen für die Sequenzierung	
2N NaOH	Kurz vor dem Experiment 5N NaOH Lösung auf 2N NaOH verdünnen (2Vol. NaOH 5N + 3Vol. ddH ₂ O)
Enzyme Dilution Buffer (ED-Puffer)	von usb 25mM Tris-HCl (pH 7,5) 5mM DTT 100µg BSA/ml 5% Glycerol
A Mix-Short	von usb 840µMdCTP, dGTP und dTTP 93,5µM dATP 14µM ddATP 40mM Tris-HCl (pH 7,5) 50mM NaCl
C Mix-Short	von usb 840µMdATP, dGTP und dTTP 93,5µM dCTP 17µM ddCTP 40mM Tris-HCl (pH 7,5) 50mM NaCl

G Mix-Short	von usb
	840uMdATP. dCTP und dTTP
	93.5uM dGTP
	14µM ddGTP
	40mM Tris-HCl (pH 7.5)
	50mM NaCl
T Mix-Short	von usb
	840µMdATP, dCTP und dGTP
	93,5µM dTTP
	14µM ddTTP
	40mM Tris-HCl (pH 7,5)
	50mM NaCl
Annealing Buffer	von usb
	1M Tris-HCl (pH 7,5)
	100mM MgCl ₂
	160mM DTT
Labelling Mix - dATP	von usb
	1,375µM je. DCTP, dGTP, dTTP
	333,5mM NaCl
Stop Solution	von usb
	0,3% Bromphenolblau
	0,3% Xylencyanol FF
	10mM EDTA (pH 7,5)
	97,5% deionisierter Formamid
Lösungen für die Modifizierungen	
2x S1-Nuklease Puffer	60mM NaAc, pH 7,4 bei 25°C
	200mM NaCl
	2mM ZnSO ₄

Modifikationspuffer 200mM HEPES 50mM KCl 10mM MgCl₂ pH 8,0 bei 25°C Lösung mit rH₂O ansetzen 6µl Proteinase K (20mg/ml) 3µl 0,5M EDTA 3µl 10% SDS 22,4µl ddH₂O 1µl Mix auf 10ml Ansatz geben; 20min bei 50° inkubieren

Lösungen für Primer Extension Analyse

Proteinase K-Mix

2x PE-Puffer	100mM Tris
	100mM KCl
	20mM MgCl ₂
	20mM DTT
	2 mM dNTPs (jedes)
	1mM Spermidin
	pH 8,3 bei 25°C
	Lösung mit rH ₂ O ansetzen
NaPP:	$Na_4P_2O_7x10H_2O_40mM$
	Lösung mit r H_2O ansetzen
Probenpuffer	98% Formamide
	10mM EDTA
	0,1% Bromphenolblau
	0,1% Xylencyanol
	rH ₂ O sollte benutz werden
Lösungen für die Gele:	
1% Agarose Gel	4g Agarose, 400ml 1xTAE-Puffer.
	Lösung aufkochen, 32µlEthidiumbromid

	vorsichtig zugeben. Gel gießen, wenn Lösung auf 50°C runtergekühlt ist. 1h stehen lassen.
TE-Puffer (pH 8,0)	10mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM EDTA (pH 8,0)
6x Ladepuffer	0,1g Bromphenolblau 60% Glycerin 1% SDS auf 100ml mit TE auffüllen
1 kb DNA Leiter	700μl ddH2O 200μl 6x Ladepuffer 100μl DNA Leiter (peqlab)
Sequenzgel-Verdünner	von Roth
Sequenzgel-Konzentrat (19:1)	von Roth 237,5g Acrylamid 12,5g Methylembisacrylamid 500g Harnstoff auf 1L auffüllen
Sequenzgel-Pufferkonzentrat	von Roth Harnstoff, Tris, Borsäure, EDTA, ddH ₂ O
6% APS	2,4g APS auf 40ml mit ddH ₂ O auffüllen bei +4°C 2 Wochen lang haltbar
6% PAA Gel, 7M Harnstoff	26,5ml Sequenzgel-Verdünner 9,5ml Sequenzgel-Konzentrat 4ml Sequenzgel-Pufferkonzentrat

5	500µl 6%APS
4	0μl TEMED
7,5% PAA Gel, 7M Harnstoff 2	4,1ml Sequenzgel-Verdünner
1	1,9ml Sequenzgel-Konzentrat
4	ml Sequenzgel-Pufferkonzentrat
5	500µl 6%APS
4	0μl TEMED
Puffor für die Flaktronhorses	
1 ujjer jur die Elektrophorese.	e da TDIS
10X 1AE 4	1 42ml Eigensig
1	1,421111 EISESSIG
4	uf 11 mit ddH-O auffüllen
a	ur TE fint ddf120 auffunen
10x TBE 1	08g TRIS
5	5g Borsäure
1	,48g EDTA
a	uf 1L mit ddH ₂ O auffüllen
Andere Lösungen:	
3M NaAc 3	M NaAc Lösung in ddH ₂ O,
q	oH 5.2 bei 25°C
1	
rH ₂ O 1	Esslöffel Resin AG 501-X8 in 1L
d	dH ₂ O geben, 1h bei RT rühren, danach
f	iltrieren (Papierfilter) und autoklavieren.
DEPC-H ₂ O 1	
	ml DEPC in 1L ddH ₂ O geben, Flasche
Z	ml DEPC in 1L ddH_2O geben, Flasche rumachen und stark schütteln,
z	ml DEPC in 1L ddH_2O geben, Flasche rumachen und stark schütteln, rutoklavieren zur Inaktivierung des
z a E	ml DEPC in 1L ddH ₂ O geben, Flasche numachen und stark schütteln, nutoklavieren zur Inaktivierung des DEPC. Lagerung: RT
z a E Phenol/Chloroform/Isoamylalkobol - P	ml DEPC in 1L ddH ₂ O geben, Flasche rumachen und stark schütteln, utoklavieren zur Inaktivierung des DEPC. Lagerung: RT
z a E Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol - P Lösung (*	ml DEPC in 1L ddH ₂ O geben, Flasche rumachen und stark schütteln, nutoklavieren zur Inaktivierung des DEPC. Lagerung: RT Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25 [.] 24 [.] 1) gesättigt mit 10mM Tris-HCl

4. Methoden

4.1. Mikrobiologische Methoden

4.1.1. Kultivierung von E.coli

E. coli wird in Flüssigkultur bei 37°C unter Schütteln (180rpm ermöglicht ausreichende Belüftung) im LB-Medium kultiviert. Eine Übernachtkultur in der stationären Phase besitzt eine Keimzahl von ca. $3x10^9$ Zellen/mL. Durch Zugabe von entsprechenden Antibiotika wird verhindert, dass plasmidtragende Zellen schon nach wenigen Zellteilungen dieses wieder verlieren. Kulturen mit größeren Volumina werden mit einer Vorkultur 1/100 des Endvolumens angeimpft.

Zur Anlegung einer Plattenkultur werden die Bakterien mit einer Impföse auf dem Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Plattenkulturen sind bei 4°C ca. 4 Wochen haltbar.

4.1.2. Dauerkulturen von Bakterien

Eine frische, über Nacht gewachsene Bakterienkultur (850µl) wird mit 150µl 100% sterilem Glycerin gemischt, gevortext, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

4.1.3. Herstellung einer E. coli Zellsuspension für die Elektroporation

Für das Einbringen von Fremd-DNS in *E.coli* mittels Elektroporation benötigt man eine möglichst salzfreie Zellsuspension. Ein zu hoher Salzanteil kann sonst beim Anlegen des elektrischen Feldes zu Kurzschlüssen führen.

Vorkultur: in 10mL Medium (LB) ohne Ampicillin wird Übernachtkultur angesetzt.

Am nächsten Tag wird 1L vorgewärmtes LB-Medium mit 10mL Vorkultur angeimpft. Nach Erreichen der exponentionellen Wachstumsphase (OD_{600nm}=0,8) wird die Kultur 30Min. auf Eis gekühlt und bei 4000g für 15Min. bei 4°C abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wird das Zellsediment im ½ Volumen des Gesamtansatzes mit 1mM HEPES pH7,0 resuspendiert und erneut bei 4000g für 15Min. bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellsediment mit dem ¼ Volumen des Gesamtansatzes mit 1mM HEPES gewaschen. Nach anschließender Zentrifugation werden die Bakterien in 50mL 10%igem eiskaltem Glycerin gewaschen, bei 4000g 15Min. bei 4°C zentrifugiert und in 3mL 10%igem Glycerin aufgenommen und resuspendiert. Sie können nun entweder direkt verwendet oder in 100µl Portionen auf Eis aliquotiert, in Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert werden.

4.1.4. Elektrotransformation (Elektroporation)

100µl der Zellsuspension werden mit 10ng Plasmid-DNS (1-10ng/µl) gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0,2cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgt bei einer Spannung von U= 2-2,5kV. Kapazität=25µFD. Wiederstand=200 Ohm. Die Pulszeit sollte zwischen 4-5ms andauern.

Sofort nach der Elektroporation wird zu dem Transformationsansatz 1mL vorgekühltes SOC-Medium gegeben, und es erfolgt unter Schütteln eine einstündige Inkubation bei 37°C. Anschließend können die Transformanden auf 2xYT- oder LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen werden.

Diese Methode zeichnet sich durch ihre hohe Transformationseffizienz $(10^9-10^{10}$ Transformanden/µg DNS) aus. Ferner hat die Größe der transformierten DNS bis 20kb keinen Einfluss auf die Transformationseffizienz.

4.2. Isolierung und Bearbeitung von DNS

4.2.1. Plasmidisolierung

Plasmid- Minipräparation

Diese Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979). Dabei werden die Bakterienzellen bei alkalischem pH-Wert lysiert. Durch Zugabe von SDS/NaOH werden die Proteine, die chromosomale DNS und die Plasmid-DNS denaturiert. Anschließend wird Kaliumacetat zur Renaturierung der Plasmid-DNS eingesetzt, während die chromosomale DNS und die Proteine in denaturiertem Zustand verbleiben und mit den anderen Zellbestandteilen präzipitieren. Die Ausbeute liegt bei *high copy* Plasmiden bei ca. 20µg DNS pro mL Kultur.

Durchführung:

1,5mL Bakterienkultur werden für 3Min. bei 13000rpm bei RT zentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig abgesaugt. Das Sediment wird in 100µl Puffer P1 resuspendiert (mit Ständer und Vortex) und 5Min. bei RT inkubiert. Danach werden 200µl Puffer P2 zugegeben, der Ansatz wird zehnmal "über Kopf" geschwenkt (jedoch nicht länger als 5Min.). Nach Zugabe von 150µl kaltem Puffer P3 werden die Proben wieder zehnmal über Kopf geschwenkt, gevortext und für 15Min. auf Eis gestellt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation von 10Min. bei 13000rpm und RT. Der Überstand wird abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß mit vorgelegtem 1mL Isopropanol versetzt (über Kopf geschüttelt). Die Präzipitation der Plasmid-DNS erfolgt nun durch eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 13000rpm. Das Präzipitat wird mit 500 μ l Ethanol 70% gewaschen, wiederum für 5Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird anschließend entfernt. Die Plasmid-DNS wird nun 5Min. in der Luft getrocknet und in 30 μ l H₂O aufgenommen.

Plasmid-Midipräparation

Diese Methode dient zur Gewinnung größerer Plasmid-DNS Mengen. Die Präparation erfolgt nach den Angaben der Firma Qiagen, die Puffer und Säulen herstellt, mit denen die DNS nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie gereinigt wird. Auch hier wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet.

Durchführung für Plasmide mit hoher Kopienzahl (high copy plasmid):

Für Plasmide mit hoher Kopienzahl werden 50mL Bakterienkultur 15Min. bei 4°C und 4000g zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen, und das Zellsediment wird in 5mL Puffer P1 resuspendiert. Direkt danach werden 5mL Puffer P2 zugegeben. und nach vorsichtigem Durchmischen wird die Suspension 5Min. bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 5mL kaltem Puffer P3 versetzt und 20Min. auf Eis gestellt. Eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 6000g führt zur Präzipitation der Proteine, der chromosomalen DNS und der restlichen Zellbestandteile. Das Präzipitat wird verworfen und der plasmidhaltige Überstand wird auf eine zuvor mit 4mL Puffer QBT equilibrierte QIAGEN 100 Säule geladen. Nach der Bindung der Plasmid-DNS an das Säulenmaterial wird sie 2x jeweils mit 10mL Puffer QC gewaschen. Anschließend wird die DNS mit 5mL Puffer QF eluiert. Zur Präzipitation wird das Eluat mit 5mL Isopropanol versetzt und 30Min. bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgesaugt, und die DNS wird ins Eppendorfgefäß übertragen, mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und mit 13000 rpm 5Min. zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wird die DNS 5Min. in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 55µl ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der DNS wird gemessen und auf $1\mu g/\mu l$ eingestellt. Die Lagerung der DNS erfolgt bei -20° C.

Durchführung für Plasmide mit niedriger Kopienzahl (low copy plasmid):

200mL Bakterienkultur werden 10Min. bei 4°C und 10000rpm zentrifugiert, der Überstand wird abgegossen und das Zellsediment wird in 8mL Puffer P1 resuspendiert. Direkt danach werden 8mL Puffer P2 zugegeben und nach vorsichtigem Durchmischen wird die Suspension 5Min. bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 8mL kaltem Puffer P3 versetzt und 20Min. auf Eis gestellt. Eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 6000g führt zur Präzipitation der Proteine, der chromosomalen DNS und der restlichen Zellbestandteile. Das Präzipitat wird verworfen, und der plasmidhaltige Überstand wird auf eine zuvor mit 4mL Puffer QBT equilibrierte QIAGEN 100 Säule dreimal geladen (d.h. die durchgelaufene Lösung wird aufgefangen und wieder auf die Säule geladen). Nach der Bindung der Plasmid-DNS an das Säulenmaterial wird sie 3x jeweils mit 10mL Puffer QC gewaschen. Anschließend wird die DNS mit 5mL Puffer QF eluiert. Die weitere Behandlung der Probe erfolgt wie bei der *high copy plasmid* – Midipräparation.

Plasmid-Maxipräparation

Diese Methode dient zur Gewinnung größter Plasmid-DNS-Mengen. Die Präparation erfolgt nach den Angaben der Firma Qiagen, die Puffer und Säulen herstellt, mit denen die DNS nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie gereinigt wird. Auch hier wird das Prinzip der alkalischen Lyse angewendet.

Durchführung:

100mL Bakterienkultur werden 15Min. bei 4°C und 4000g zentrifugiert (2x 50mL), der Überstand wird abgegossen, und das Zellsediment wird in 10mL Puffer P1 resuspendiert. Direkt danach werden10mL Puffer P2 zugegeben, und nach vorsichtigem Durchmischen wird die Suspension 5Min. bei RT inkubiert. Anschließend wird der Ansatz mit 10mL kaltem Puffer P3 versetzt und 20Min. auf Eis gestellt. Eine fünfzehnminütige Zentrifugation bei 4°C und 6000g führt zur Präzipitation der Proteine, der chromosomalen DNS und der restlichen Zellbestandteile. Das Präzipitat wird verworfen, und der plasmidhaltige Überstand wird auf eine zuvor mit 10mL Puffer QBT equilibrierte QIAGEN 500 Säule geladen. Nach der Bindung der Plasmid-DNS an das Säulenmaterial wird sie 2x jeweils mit 30mL Puffer QC gewaschen. Anschließend wird die DNS mit 15mL Puffer QF eluiert. Zur Präzipitation wird das Eluat mit 10,5mL Isopropanol versetzt und 30Min. bei 4°C und 12000rpm zentrifugiert. Das Überstand wird vorsichtig abgesaugt, und die DNS wird ins Eppendorfgefäß übertragen, mit 1mL 70% Ethanol gewaschen und mit 13000rpm 5Min. zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes wird die DNS 15Min. in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 55-105µl ddH₂O aufgenommen. Die Konzentration der DNS wird gemessen und auf $1\mu g/\mu l$ eingestellt. Die Lagerung der DNS erfolgt bei -20° C.

4.2.2. Phenolextraktion

Die Phenolextraktion dient zur Denaturierung und Entfernung von Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Dazu wird Tris/HCL (pH 7,0) -gepuffertes Phenol/ Chloroform/Isoamyl-Alkohol-Gemisch (25:24:1) im Verhältnis 1:1 zugesetzt, durch Vortexen gut gemischt und zur Phasentrennung 2Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Die wässerige obere Phase wird vorsichtig entfernt, während die untere Phenolphase, in der sich die denaturierten Proteine befinden, verworfen wird.

4.2.3. Alkoholfällung von Nukleinsäuren

Bei Zugabe von Alkohol kommt es in Gegenwart relativ hoher Konzentrationen an monovalenten Kationen (0,3-0,5M) zur Aggregation der Nukleinsäuremoleküle, indem ihre Löslichkeit durch Absättigung der negativ geladenen Phosphatgruppen herabgesetzt wird. Die Nukleinsäuren fällen aus, während niedermolekulare Oligonukleotide und Nukleotide in Lösung bleiben. Die Alkoholfällung wird nach zwei Methoden durchgeführt:

Ethanolpräzipitation

Die Nukleinsäurelösung wird mit 1/10 Volumen Natriumacetat 3M, pH 4,5 versetzt. Nach Zugabe des 2,5fachen Volumens absoluten Ethanols wird der Ansatz durchmischt und in flüssigen Stickstoff zur Fällung überführt. Die Temperatur und Inkubationsdauer richten sich nach der Menge der Nukleinsäure. Bei geringen Mengen empfiehlt sich eine Fällzeit von mindestens 1h im Stickstoff, bei größeren Mengen: 1h-bis ÜN bei – 70°C oder ÜN bei –20°C. Die Effizienz der Fällung kann durch Zugabe von Glykogen (10µg/mL) oder tRNS (5µg/mL) erhöht werden. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 13000rpm für 20Min. bei 4°C. Überstand wird abgezogen und das überschüssige Salz wird durch Zugabe von 70%igem Ethanol (300µl) entfernt. Nach erneutem Zentrifugieren für 2Min. bei 13000rpm wird das Ethanol entfernt, und die Nukleinsäure wird in der Luft 5Min. getrocknet. Die DNS kann nun in dem gewünschten Volumen ddH₂O aufgenommen werden.

Isopropanolfällung

Diese Art der Fällung eignet sich für größere DNS-Mengen. Dabei wird die DNS-Lösung mit 0,7-2,5 Volumenteilen Isopropanol, der 1/10 Volumen Natriumacetat 3M, pH 4,5 und 2µl Glykogen versetzt. Die Probe wird gut durchgemischt und die Präzipitation erfolgt direkt durch Zentrifugation für 15Min. bei 13000rpm und RT. Die weitere Behandlung der Probe erfolgt wie bei der Ethanolpräzipitation.

4.2.4. Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei 260nm bestimmt. Das Verhältnis der Extinktion bei 260nm und 280nm bestimmt den Reinheitsgrad der Nukleinsäurelösung. Es sollte bei DNS 1,8 und bei RNS 2 betragen.

Für die Bestimmung der Konzentration gilt: dsDNS OD_{260} 1=50µg/mL; ssDNS OD_{260} 1=33µg/mL; RNS OD_{260} 1 = 40µg/mL.

4.2.5. Restriktion von DNS

Die Restriktion von Plasmid-DNS wurde nach den allgemein üblichen Standartvorschriften (Sambrock et al., 1989) durchgeführt. Dabei werden nur Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet (Zabenau und Roberts, 1979). Die hydrolytische Spaltung der DNS erfolgt innerhalb der Erkennungssequenz, wobei glatte oder überhängende 3'-OH bzw. 5'-PO₄²⁻ Enden entstehen. Die Restriktionsbedingungen werden entsprechend den Empfehlungen der Enzymhersteller gewählt.

Typischer Reaktionsansatz:

1µg Plasmid-DNS entsprechender 10x Enzympuffer BSA (10x, enzymabhängig) 0,2-1U Enzym auf 10µl Endvolumen mit st.ddH₂O auffüllen 1-2h bei entsprechender Temperatur inkubieren.

Die Vollständigkeit der Spaltung wurde auf analytischen Agarosegelen überprüft. Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen stehen folgende Methoden zur Verfügung: Phenolextraktion; Hitzeinaktivierung 10Min. bei 65-70°C, Zugabe von EDTA (15-20mM Endkonzentration) oder Aufreinigung durch präparatives Agarosegel.

4.2.6. Ligasereaktion

Die DNS-Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiester - Bindung zwischen einer benachbarten freien 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe. Dabei werden sowohl versetzt liegende offene Phosphodiesterbindungen als auch direkt gegenüberliegende geschlossen. Dieser Vorgang benötigt ATP.

Reaktionsansatz (Ligationskit Roche):

1μl Vektor-DNS2-7μl Insert-DNS2μl 5xPuffergut mischen

10μl 2x Puffer 1μl Ligase (5U/μl) gut mischen, 0,5-2h bei RT stehen lassen

Reaktionsansatz (Ligationskit NEB):

1μl Vektor-DNS (1μg/μl)
3-9μl Insert-DNS
10μl 2x Puffer
1μl Ligase (2000U/μl)
gut mischen, 0,5 h bei RT stehen lassen

Der Ansatz wird anschließend für die Elektroporation mit *High Pure Purification Kit* von Roche entsalzen. 20µl Ligationsansatz wird mit 100µl *BindingBuffer* gemischt und auf die Säule gegeben. Die Ansatz wird 30sec bei 13000rpm zentrifugiert, erst mit 500µl, danach mit 200µl *WashBuffer* gewaschen. Die Säule wird 30sec bei 13000rpm getrocknet. Anschließend wird die Probe mit 100µl *ElutionBuffer* eluiert (2Min. bei RT stehen lassen, danach 1Min. 13000rpm).

4.2.7. Dephosphorilierung von DNS

Die Alkalische Phosphatase entfernt im alkalischen Milieu (pH 9,5-10,5) die endständige 5'-Phosphat-Gruppe von einzel- und doppelsträngiger DNS sowie von RNS. Die Dephosphorilierung verhindert bei Klonierungen eine Zirkularisierung des Vektors ohne den Einbau von Fremd-DNS und erhöht damit die Klonierungseffizienz. CIP (calf intestinal phosphatase) (NEB, 10U/µl) wird bei dem Verdau des Vektors zum Reaktionsansatz zugegeben (1-2µl CIP pro Reaktionsansatz).

4.2.8. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR dient der selektiven Anreicherung von DNS mit definierter Länge und Sequenz. Nach der Denaturierung der DNS binden sich die Oligonukleotide an ihre komplementäre Sequenz auf der Ziel-DNS und dienen damit als *Primer* für eine hitzestabile DNS-Polymerase, die den Gegenstrang synthetisiert. Die neusynthetisierten Doppelstränge werden wieder denaturiert und können als Ausgangsmoleküle für eine neue Gegenstrangsynthese dienen. Die Wiederholung der DNS-Denaturierung, Oligonukleotidbindung und spezifischer DNS-Synthese führt nach jedem Reaktionsschritt zu einer Verdopplung der Ziel-DNS und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentionellen etwa 10⁶-10⁷fachen Anreicherung der Ziel-DNS. Die Oligonukleotide für die PCR werden dabei so gewählt, dass sie mindestens 15nt zur Zielsequenz komplementär sind.

Reaktionsansatz A (Roche Expand High Fidelity PCR Kit):

36μl ddH₂O
2μl dNTPs, jedes 10mM
5μl *Fw-Primer* (10pmol/μl)
5μl *Bw-Primer* (10pmol/μl)
2μl Plasmid-DNS (10ng/μl)

Reaktionsansatz B (Roche Expand High Fidelity PCR Kit):

39µl ddH₂O

10µl 10x PCR-Puffer Expand HF mit MgCl₂

1µl High Fidelity PCR Enzyme Mix, 3,5U/µl

Kurz vor Start Lösung B zur Lösung A zugeben, mit der Pipette gut mischen und sofort in die PCR-Maschine reinstellen.

Programm für eine PCR-Standardreaktion:

2Min. 95°C (30sec 95°C / 30sec 55°C / 20sec 72°C) x25 10Min. 72°C ∞ 4°C

Nach Beendigung der PCR werden 5µl des Ansatzes auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

Der Ansatz wird anschließend für andere Schritte mit *High Pure Purification Kit* von Roche aufgereinigt. 100µl des PCR-Ansatzes wird mit 500µl *BindingBuffer* gemischt und auf die Säule gegeben. Der Ansatz wird 30sec bei 13000rpm zentrifugiert, erst mit 500µl, danach mit 200µl *WashBuffer* gewaschen. Die Säule wird 30sec bei 13000rpm getrocknet. Anschließend wird die Probe mit 100µl *ElutionBuffer* eluiert (2Min. bei RT stehen lassen, danach 1Min. 13000rpm). Die DNS steht dann für weitere Schritte zur Verfügung. Lagerung bei -20°C.

4.2.9. DNS-Sequenzierung (radioaktiv)

Dabei wurde die Didesoxy -Methode verwendet (Sanger et al., 1977). Sie basiert auf der unvollständigen enzymatischen Synthese des komplementären Doppelstranges. Damit die DNS nach dem Sanger-Verfahren sequenziert werden kann, muss sie in einzelsträngiger Form vorliegen. Dies ermöglicht die Hybridisierung eines Oligonukleotides, das damit den Startpunkt für eine DNS-Polymerase festlegt, die dann mit der Gegenstrangsynthese beginnen kann. Das Oligonukleotid ist am 5'-Ende mit γ -³²P-ATP markiert, das die Identifizierung der Sequenzierungsprodukte ermöglicht. Anschließend wird der Reaktionsansatz auf die 4 basespezifischen Ansätze verteilt, in denen sich jeweils die 2',3'-Didesoxy-Nukleotid-5'-Triphosphate befinden. Diese werden ebenfalls von der DNS-Polymerase als Substrat erkannt, wobei der Einbau eines solchen Nukleotides aufgrund fehlender 3'OH-Gruppe zum Abbruch der Synthese führt. Da diese Kettenabbrüche statistisch erfolgen, werden DNS-Moleküle mit unterschiedlicher Länge synthetisiert. Diese werden nach Beendigung der Reaktion hitzedenaturiert und anschließend auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel der Länge nach aufgetrennt. Die Identifizierung der Sequenz erfolgt dann mittels Autoradiographie des Geles.

Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNS wurde der T7 Sequencing Kit von USB verwendet.

Durchführung:

Denaturierung der DNS:
 6μl Plasmid-DNS (1μg/μl)
 8μl NaOH 3N
 28μl H₂O

Der Ansatz wird 10Min. bei RT inkubiert und anschließend durch Zugabe von 4 μ l ddH₂O, 7mL 3M NaAc pH 4,5 und 120 μ l absolutem Ethanol in flüssigem Stickstoff gefällt. Nach einer fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 13000rpm wird der Überstand abgezogen. Die DNS wird mit 70% igem Ethanol gewaschen, in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 11 μ l H₂O resuspendiert.

2. Hybridisierung des Primers:	11µl DNS
	2µl Primer (10pmol/µl)
	<u>2µ1 Annealing- Puffer</u>
	15µl Gesamtvolumen

Nach den Angaben des Herstellers wird der Ansatz erst 5Min. bei 65°C inkubiert, danach wird dieser für 10Min. in 37°C überführt. Anschließend erfolgt eine Abkühlung auf Raumtemperatur (10Min.).

3. Primer- Verlängerungsreaktion: 15μl Hybridisierungs-Mix
 3μl Labelling-Mix A
 1μl rH₂O
 2μl T7-DNS-Polymerase (8U/μl)

in Verdünnungspuffer (ED-Puffer)1:4 kurz vorher verdünnt).

20µl Gesamtvolumen

Die Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur, die Inkubationszeit richtet sich danach, wie nah man die Sequenz nach dem *Primer* lesen möchte. Generell gilt, je näher die Sequenz nach dem *Primer* benötigt wird, desto kürzer sollte die Inkubationszeit sein. Unsere Proben haben wir 3Min. bei RT inkubiert.

4. Termination:

Je 4,5µl des Ansatzes werden in 4 zuvor vorbereitete Reaktionsgefäße überführt, in denen sich je 2,5µl Terminationsmix mit den entsprechenden ddNTPs befinden. Die Terminationsreaktion läuft 5Min. bei 37°C und wird durch Übertragung auf Eis und Zugabe von 5µl Stoplösung beendet. Die Proben (3µl davon) werden für 5Min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

4.2.10. Nicht-radioaktive Sequenzierung (automatische Sequenzierung, MWG)

Es wird die Dye-Terminations-Technik verwendet. Die Didesoxinukleotide sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die entstehenden Abbruchbanden werden somit farbmarkiert und werden vom Gerät während der Elektrophorese mittels Laser angeregt und gemessen. Als Markierung werden die Farbstoffe aus dem ABI Big Dye 3.1 Kit verwendet. Die Sequenzierung läuft auf dem 3730xl von ABI. Als Qualitätsstandard wird PHRED20 (nach Phil Green) verwendet. Mit dieser Auswertung weist ungefähr nur eine von 10^2 Basen einen Fehler auf.

Die Leseweiten dieser Methode sind deutlich länger als bei Sequenzierung von Hand, und kann auch G-C-reiche Bereiche lesen, deswegen wird sie für die Sequenzierung der Klonen nach der Klonierung verwendet.

4.2.11. ³²P-Endmarkierung von Oligonukleotiden

Diese Phosphorilierungsreaktion wird von der Polynukleotidkinase durchgeführt. Dabei wird ein γ -Phosphatrest auf eine 5'-Hydroxyl-Gruppe übertragen.

Reaktionsansatz:	3µl Primer (10pmol/µl)
	1µ1 10x T4-Polynukleotidkinase-Puffer
	5μl [γ- ³² P]ATP (10μci/μl)
	<u>1µl T4-Polynukleotidkinase (10U/µl)</u>
	10µl Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wird 30Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 40µl ddH₂O gestoppt und über eine ProbeQuantTM G-50 Micro Column gereinigt, wobei die nicht inkorporierten Nukleotide sich an das Säulenmaterial binden und das radioaktiv markierte Oligonukleotid als Eluat aufgefangen wird.

Durchführung:

Die Säule wird 15sek gevortext. Danach wird der Boden abgebrochen, Deckel locker geschraubt. Säule wird ins Eppendorfgefäß reingestellt und 1Min. bei 2600rpm (735xg) zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule wird sie in das neue Eppendorfgefäß gestellt und nochmals 1Min. bei 2600rpm zentrifugiert. Zum Sammeln der Eluate wird die Säule ins neue Eppendorfgefäß gestellt, mit der Probe geladen (50µl) und 2Min. bei 2600rpm zentrifugiert. Danach wird die Säule entsorgt und 1µl der Probe wird zur Bestimmung der Einbaurate mit einem Szintillations-Zähler gemessen.

4.3. Elektrophorese Techniken

4.3.1. Agarosegel

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNS werden 0,8-2%ige Agarosegele verwendet. Dazu wird die entsprechende Menge Agarose (10mg/mL) in einem Elektrophoresepuffer (1xTAE) durch Erhitzen gelöst und 8µl Ethidiumbromid (1mg/ml) pro 100mL Gel dazugegeben. Das Gel wird in Flachbettgelschlitten gegossen. Den Proben wird vor dem Auftragen auf das Gel 1/6 Volumen 6x Ladepuffer zugesetzt. Die Elektrophorese erfolgt bei 40-150mA und 100-300V für 1h. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht fotografiert.

4.3.2. Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen (Gene Clean -Methode)

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wird das entsprechende DNS-Fragment unter der UV-Lampe (lange Wellenlänge - 369nm) möglichst schnell mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit 1mL 6M NaJ versetzt. Die Probe wird gut gemischt und 10Min. bzw. bis die Agarose vollständig geschmolzen ist, bei 60°C inkubiert. Anschließend wird 10µl Glasmilch dazugegeben, und die Probe wird für 10Min. bei RT geschüttelt. Nach einer zweiminütigen Zentrifugation bei 13000rpm wird der Überstand abgenommen, vorsichtig zum Präzipitat 200µl New Wash Puffer gegeben und ohne vorher zu vortexen 1Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Die Glasmilch wird danach noch zweimal mit 200µl New Wash Puffer gewaschen. Dies dient zur Entfernung der Salze, die zur Bindung des DNS-Fragmentes an die Glasmilch notwendig waren. Zur Eluierung der DNS wird die Glasmilch in 50µl ddH₂O aufgenommen (vortexen bis Pellet vollständig gelöst ist) und für 5Min. bei 37°C (Wasserbad) inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 5Min. bei 13000rpm wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und noch mal für 1Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird wieder ins neues Eppendorfgefäß überführt, und die Qualität der Extraktion anschließend auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

4.3.3. Polyacrylamid/Harnstoffgel

Für die elektrophoretische Auftrennung der Sequenzreaktion, der *Primer Extension*-Analyse wird ein 7,5% (bzw. 6-10%) Polyacrylamid-7M Harnstoffgel verwendet. Es handelt sich dabei um dünne, denaturierende und hochauflösende Polyacrylamidgele, die DNS-Moleküle, deren Länge sich nur um ein Nukleotid unterscheiden, auftrennen können. Die Länge der Glasplatten beträgt 40cm und die Dicke der *Spacer* 0,04cm. Vor dem Gießen des Gels werden die Platten sorgfältig mit Aceton, danach mit Ethanol gereinigt. Anschließen wird eine der beiden Platten mit Acrylease beschichtet, um das Ablösen des Gels nach der Elektrophorese zu erleichtern. Alle Lösungen für das Gel stammen von der Firma Roth.

Gelzusammensetzung (6% Gel):26,5mL Sequenzgel-Verdünner9,5mL Sequenzgel-Konzentrat4mL Pufferkonzentrat 10x500μl 6% APS40μl TEMED40mL GellösungGelzusammensetzung (7,5% Gel):24,1mL Sequenzgel-Verdünner11,9mL Sequenzgel-Konzentrat4mL Pufferkonzentrat 10x500μl 6% APS

40µl TEMED

40mL Gellösung

56

Gelzusammensetzung (8% Gel):

23,34mL Sequenzgel-Verdünner 12,66mL Sequenzgel-Konzentrat 4mL Pufferkonzentrat 10x 500µl 6% APS <u>40µl TEMED</u> 40mL Gellösung

Gelzusammensetzung (10% Gel):

20,17mL Sequenzgel-Verdünner 15,83mL Sequenzgel-Konzentrat 4mL Pufferkonzentrat 10x 500µl 6% APS <u>40µl TEMED</u> 40mL Gellösung

Die Lösung wird in das vorher aufgebaute Gelsystem gegossen und für 1h polymerisiert. Die Elektrophorese wird bei 2500V, 150A, 40W durchgeführt. Als Puffer wird 1xTBE verwendet. Vor dem Auftragen der Proben sollte das Gel eine Lauftemperatur von 50°C aufweisen (Vorlauf 2h). Die Elektrophorese erfolgt 2-3h. Danach wird das Gel 1,5-2h getrocknet und auf einen PhosphoImager bzw. Röntgenfilm ÜN aufgelegt.

4.3.4. Polyacrylamidgel zur RNS-Analyse

Dabei handelt es sich ebenfalls um denaturierende Polyacrylamidgele, die zur Überprüfung der T7-Transkripte dienen.

Gelzusammensetzung für 10x10 Gele:	4,2g Harnstoff
	2mL 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
	1mL 10x TBE

Mit ddH₂O auf 10mL auffüllen, 5-10Min. rühren bis der Harnstoff sich gelöst ist, danach

100μ1 6% APS 10μ1 TEMED

dazugeben, mit der Pipette gut mischen und ins vorher aufgebaute Gelsystem gießen, 15Min. fest werden lassen. Die Elektrophorese erfolgt bei 100V, 300mA ca. 1h. Als Puffer wird 1xTBE verwendet. Vor dem Aufladen des Gels werden die Proben 3Min. lang bei 65°C zur Vermeidung der Sekundärstrukturen aufgeheizt.

4.3.5. Autoradiographie

Die Position radioaktiver Banden in Gelen wird durch Auflegen eines Röntgenfilmes Radioisotope Durch die Strahlungsenergie der ermittelt. werden die Silberhalogenkristalle, die in die Festphase des Röntgenfilmes eingebettet sind, negativ geladen und zu metallischem Silber reduziert. Dadurch entsteht ein latentes Bild aus Silberpartikeln. Durch die Entwicklung des Films wird das Bild verstärkt, und die anschließende Fixierung entfernt überschüssiges Silberhalogenid. Da die Filmschwärzung direkt proportional zur Radioaktivitätsmenge ist, können diese Autoradiogramme quantitativ ausgewertet werden.

4.3.6. Phosphoimaging

Neben der Autoradiographie bietet sich auch die Möglichkeit radioaktiv markierte Banden mittels des Phosphoimagingsystems zu analysieren. Dazu werden spezielle *Screens* auf die entsprechenden Gele gelegt. In die Matrix dieser *Screens* sind BaFBrEu-Kristalle eingebettet, die durch radioaktive Strahlung ihren Ladungszustand ändern bzw. angeregt werden. Durch das Abscannen dieser *Screens* in dem dazugehörigen Ablesegerät (PhosphoImager) mit einem HeNe-Laser (Rotlicht 600nm) wird die Veränderung des Ladezustandes in Form von Phospho-stimulierter-Luminiszenz (PSL) gemessen und mittels der entsprechenden Software auf einen Bildschirm übertragen. Das Material ist im Vergleich zu einem Röntgenfilm 250mal sensitiver gegenüber der von ³²P emmitierter β -Strahlung. Da auch hier die Menge an Radioaktivität proportional der gemessenen PSL ist, können die durch dieses System visualisierten Banden direkt quantifiziert werden.

4.4. RNS-Techniken

4.4.1. in vitro Transkription

Dieses Verfahren dient der zellfreien Herstellung von RNS. Das als Matrize dienende DNS-Fragment wird in einen Transkriptionsvektor hinter den T7-Promotor kloniert. Der Vektor wird am 3' Ende des DNS-Fragmentes mittels eines Restriktionsenzyms linearisiert. Die vollständige Linearisierung muss auf einem analytischen Agarosegel überprüft werden. Die Transkription startet nachfolgend am T7-Promoter und endet an der Spaltstelle des Vektors. Zur RNS-Synthese wird die T7-RNS-Polymerase, ein hoch prozessives Enzym des T7-Phagen, verwendet. In Gegenwart von rNTPs können von 1µg Plasmid-DNS ca. 20µg RNS produziert werden.

Reaktionsansatz: $2\mu l$ geschnittenes Plasmid-DNS ($1\mu g/mL$) $1\mu l$ 10xT7-RNS-Pol. Transkriptionspuffer $1\mu l$ DEPC-H2O $1\mu l$ rATP, 100mM $1\mu l$ rCTP, 100mM $1\mu l$ rGTP, 100mM $1\mu l$ rUTP, 100mM $0,5\mu l$ RNasin (40U/ μ l) $1,5\mu l$ T7-RNS-Polymerase (50U/ μ l), NEB

Die Reaktion läuft 2h bei 37°C. Anschließend wird eine fünfzehnminütige DNase-Behandlung mit 0,5µl RNase-freier DNaseI (2U/µl) bei 37°C gemacht. Nach Zugabe von 190µl DEPC-H₂O und 200µl Phenol/Chloroform-Lösung wird eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt: die Lösung wird nach kurzem kräftigen Schütteln 2Min. bei 13000rpm bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abpipettiert, 2 mal mit Chloroform-Lösung gewaschen und anschließend mit 1/10 Volumen 3M NaAc pH4,5 (20µl) und 2,5 Volumenteile kaltem Ethanol 99% (500µl) versetzt und die RNS 1h bei -70°C gefällt. Die Qualität der *in vitro* Transkription wird anschließend auf einem denaturierenden 4%igen Polyacrylamidgel überprüft.

4.4.2. Chemische Modifikation von RNS

RNS-Sekundärstrukturen können u.a. durch den Einsatz von methylierenden und carboxylierenden Agenzien ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden Dimethylsulfat (DMS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet. DMS führt zu einer Methylierung von Cytidinen (Position N3), Adenosinen (Position N1) und Guanosinen (Position N7), während DEPC eine Carboxylierung von Adenosinen an Position N7 des Imidazolrings ermöglicht (s.Abb. 16, 17). Diesen Agenzien sind nur einzelsträngig vorliegende Nukleotide zugänglich. Die modifizierten Nukleotide wurden anschließend durch eine *Primer-Extention*-Analyse bestimmt. Da diese modifizierten Nukleotide nicht mehr in der Lage sind, Watson-Crick Basenpaarungen einzugehen, bricht die cDNS-Synthese durch die Reverse Transcriptase an dem davor liegenden Nukleotid ab. Dies ist durch zusätzliche Signale auf dem Autoradiogramm zu erkennen. Die Positionen der modifizierten Nukleotide können dann mit den Strukturvorschlägen des Computers verglichen werden.



Abbbildung 16: Modifizierungen der Nukleotiden: *DMS führt zu einer Methylierung von Adenosinen (Position N1), Cytidinen (Position N3) und Guanosinen (Position N7).*

Durchführung:

Das RNS- Transkript wurde 10min bei 65°C denaturiert und danach 2h auf RT abkühlen lassen. 4µg RNS-Transkriptes (1µl) werden in 200µl Modifikationspuffer aufgenommen. Anschließend werden dem Ansatz DMS (0,5; 1; 5%) bzw. DEPC (10; 20%) zugesetzt, Lösung wird mit der Pipette gemischt und 90Min. auf Eis inkubiert. Diese Arbeiten werden unter Abzug durchgeführt, da DMS sehr giftig beim Einatmen



Abbildung 17: DEPC ermöglicht eine Carboxylierung von Adenosinen an Position N7 des Imidazolrings.

und krebserregend ist. Nach Beendigung der Reaktion wird die RNS durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc (22µl) und 2,5V EtOH (550µl) gefällt. Überschüssiges DMS bzw. DEPC wird anschließend durch zweimaliges Waschen mit 500µl EtOH 70% entfernt. Die RNS wird in die Luft getrocknet und kann nachfolgend in der *Primer-Extention*-Analyse eingesetzt werden. Zur Modifizierung sollte nur frisches DMS und DEPC verwendet werden, ferner sind die Puffer nur mit Schwermetallfreiem ddH₂O anzusetzen.

4.4.3. Enzymatische Modifikation von RNS

RNS-Sekundärstrukturen können u.a. durch den Ansatz von S1-Nuklease ermittelt werden. S1-Nuklease ist eine Endonuklease, welche die spezifische Degradierung der einzelsträngigen DNS und RNS zu den 5'-Mononukleotiden katalysiert. Ihr pH-Optimum liegt bei 4,5. Die Reaktion wird aber bei pH 7,5 durchgeführt um Änderung der nativen Konformation der RNS zu vermeiden. Bei diesen Bedingungen kompensiert eine Erhöhung der Konzentration der Nuklease den Verlust ihrer Aktivität. Die Schnittstellen werden anschließend durch *Primer-Extention*-Analyse bestimmt. Die cDNS-Synthese durch die Reverse Transkriptase bricht an den Schnittstellen ab. Dies ist durch zusätzliche Signale auf dem Autoradiogramm zu erkennen. Die Positionen der modifizierten Nukleotide können dann mit den Strukturvorschlägen des Computers verglichen werden.

Durchführung:

Das RNS- Transkript wurde 10min bei 65°C denaturiert und danach 2h auf RT abkühlen lassen.

Reaktionsansatz: $25\mu l 2xS_1$.Modifikationspuffer $22\mu l rH_2O$ $1\mu l tRNS (1\mu g/\mu l)$ $1\mu l RNS$ -Transkriptes $(4\mu g/\mu l)$ $1\mu l S_1$ -Nuklease $(50U/\mu l)$

Lösung wird mit der Pipette gemischt und 3-7Min. bei 37°C inkubiert. Nuklease S₁ wird mit 5µl ProteinaseK-Mix 20Min. bei 50°C inaktiviert. Nach Zugabe von 150µl DEPC-H₂O und 200µl Phenol/Chloroform-Lösung wird eine Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt: die Lösung wird nach kurzem kräftigen Schütteln 2Min. bei 13000rpm bei RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wird abpipettiert und mit 1/10 Volumen 3M NaAc pH 4,5 (20µl) und 2,5 Volumenteilen kaltem Ethanol 99% (500µl) versetzt und die RNS 1h bei -70°C gefällt. Die RNS wird in der Luft getrocknet und kann nachfolgend in der *Primer-Extention*-Analyse eingesetzt werden.

4.4.4. Primer-Extention-Analyse

Diese Methode dient u.a. der Bestimmung der Sekundärstrukturen von RNS-Molekülen. Man verwendet dazu ein endmarkiertes Oligonukleotid, welches komplementär zu einem Bereich der RNS ist, der etwa 100 Nukleotide vor der untersuchten Sequenz entfernt liegt.

Nach der Hybridisierung wird die RNS enzymatisch in Gegenwart von dNTPs von der Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Die Länge der cDNS wird durch die Länge der RNS bestimmt. Die entstandene cDNS wird auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch die parallel laufende DNS-Sequenz im Sequenzgel werden die exakten Positionen der Modifizierungen (d.h. einzelsträngige Bereiche) bestimmt (s. Abbildung 18-20). Die Qualität der Ergebnisse hängt sehr von der Prozessivität der Reversen Transkriptase ab, die z.B. durch komplexe Sekundärstrukturen daran gehindert werden kann, die RNS-Matrize vollständig durchzulesen. Die Reaktion wurde nach einem modifizierten "AMV Reverse Transkriptase Primer Extention" Protokoll der Firma Promega, nach dem "SuperScriptIII Reverse Transkriptase" Protokoll der Firma Invitrogen und nach dem







AMV- reverse Transcription

Hybridisierung des Primers:

4-8μg RNS-*in vitro* Transkript (Pellet)
5μl 2xPE-Puffer
5μl radioaktiv gelabellter Primer

Zur Auflösung der Sekundärstrukturen wird der Reaktionsansatz 2Min. lang auf 95°C erhitzt. Anschließend wird er direkt auf 48°C überführt und ca. 1h dort belassen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgt die cDNS-Synthese. Dem Hybridisierungsansatz wird folgendes hinzu pipettiert:

10μl Hybridisierungsansatz
5μl 2xPE-Puffer
1,4μl NaPP_i 40mM
2,6μl rH₂O
1μl AMV-Reverse Transkriptase (9U/μl)

Die Synthese der cDNS wird für 1h bei 42°C durchgeführt.

SuperScriptIII reverse Transkription

Hybridisierung des Primers: 4-8µg RNS-*in vitro* Transkript (Pellet) 7µl rH₂O 1µl 10mM dNTP-Mix jeder 5µl radioaktiv gelabellter Primer

Zur Auflösung der Sekundärstrukturen wird der Reaktionsansatz 5Min. lang auf 65°C erhitzt. Anschließend wird er direkt auf Eis überführt und 1Min. dort belassen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgt die cDNS-Synthese. Dem Hybridisierungsansatz wird folgendes hinzupipettiert:

13μl Hybridisierungsansatz
4μl 5xFirst Strand Buffer
1μl 0,1M DTT
1μl RNaseOUT (40U/μl)
1μl SuperScriptIII Reverse Transcriptase (200U/μl)

Vortemperierung: 5Min. 25°C. Die Synthese der cDNS wird für 1h bei 50-55°C durchgeführt. Danach erfolgt Deaktivierung (15Min. bei 70°C).

reverse Transkription mit Transcriptor reverse TranskriptaseHybridisierung des Primers:4-8μg RNS-in vitro Transkript (Pellet)9μl rH2O

3µl radioaktiv gelabellter Primer

Zur Auflösung der Sekundärstrukturen wird der Reaktionsansatz 5Min. lang auf 65°C erhitzt. Anschließend wird er direkt auf Eis überführt und 1Min. dort belassen. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgt die cDNS-Synthese. Dem Hybridisierungsansatz wird folgendes hinzupipettiert:

12μl Hybridisierungsansatz
4μl 5xFirst Strand Buffer
2μl dNTPs
1μl Protector RNase Inhibitor (40U/μl)
1μl Transcriptor Reverse Transcriptase (20U/μl)

Vortemperierung: 5Min. bei RT. Die Synthese der cDNS wird für 1h bei 55-65°C durchgeführt. Danach erfolgt Deaktivierung (5Min. bei 85°C).

Fällung der Nukleinsäuren

Danach werden die Nukleinsäuren des Ansatzes durch Zugabe von 1/10 Volumen NaAc 3M (2µl), 2µl Glycogen und 50µl Isopropanol gefällt. Nach dem zweifachen Waschen mit 70% igem EtOH werden die Proben in 5µl DEPC-H₂O und 5µl Probenpuffer aufgenommen. Anschließend werden die Proben 10Min. lang bei 95°C denaturiert und zur Analyse gelelektrophoretisch aufgetrennt.

5. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Sekundärstruktur (dsRNS und ssRNS Bereiche) der nicht kodierenden Bereiche in der genomischen RNS des Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) nachzuweisen und strukturell zu untersuchen. Die RNS-Transkripte wurden mit chemischen Agenzien oder enzymatisch in den einzelsträngigen Bereichen modifiziert. Danach wurde die RNS mit einem radioaktiv -endmarkierten Oligonukleotid *"annealt"*. Nach der Hybridisierung wurde die RNS enzymatisch in Gegenwart von dNTPs von der Reversen Transkriptase in cDNS umgeschrieben. An den modifizierten Stellen in der RNS kommt es zum Abbruch der cDNS-Synthese wodurch die ssRNS-Bereiche erkannt werden können. Die entstandene cDNS wurde auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch die parallel laufende DNS-Sequenz im Sequenzgel wurden die exakten Positionen der Modifizierungen bestimmt (s. Abb. 18).

5.1 Konstruktion der RNA-Expressionsplasmide

Alle in dieser Arbeit entworfenen Plasmide wurden auf Basis des pBluescript II SK (+) Vektors hergestellt. Mittels PCR wurde aus dem von Herrn Ma zur Verfügung gestellten Plasmid pPOL1HHR CAT 2.1#3.6, das beide 3'- und 5'-NCR des BDV-Stammes H1766 (s. Abb. 21, 22) und einen Teil des CAT-Gens enthält, mit entsprechenden Primern das benötigte Fragment mittels PCR synthetisiert, welches an



Abbildung 21: Plasmidkonstrukte pBluescript II SK (+) 3'-NCR (A) und pBluescript II SK (+) 5'-NCR (B). Diese Konstrukte enthalten als Basis pBlueskript (hier als Linie oder Schwarz-weiss gestreift dargestellt), den T7-Promoter (in Grün dargestellt), einen Teil des CAT-Gens (in Weiß dargestellt) und die 3'- bzw. 5'-NCR des BDV Stammes H1766 (in Rot dargestellt). Mit grauem Pfeil ist die Richtung des CAT-Gens gezeigt.

den Enden durch den Primer generierte XbaI- und HindIII- Schnittstellen hat. Danach wurde ein enzymatischer Verdau mit XbaI und HindIII zur Generierung von Enden "mit Überhang" durchgeführt. Gleichzeitig wurde auch der Vektor (pBluescript II SK (+)) mit den gleichen Enzymen geschnitten und danach mit CIP dephosphoryliert. Alle Fragmente wurden danach auf dem Agarosegel und mittels der "GeneClean" Methode aufgereinigt. Nach anschließender Ligation und Klonierung wurden durch Sequenzierung die richtigen Klone bestimmt. Zur Erzeugung eines definiertes Endes des T7-Transkripts wurden die Plasmide mit SapI geschnitten und anschließend die T7-Transkription durchgeführt (s. Abb. 22).

A: 5⁻-

Start

Sapl

B:5⁻-

Start

Sapl

Abbildung 22: 3'-NCR (A) und 5'-NCR (B) RNS-Transkripte. In Schwarz ist T7-Promotor; in Blau ist Sequenz das Plasmid pBluescript dargestellt; in Grün: Teil des CAT-Gens; in Rot (A): 3'- bzw. (B): 5'-NCR. Mit grünem Rahmen sind STOP-Kodon (in B) bzw. die START-Stelle (in A) des CAT-Gens angezeigt. Die unterstrichenen Nukleotide weichen von der Sequenz von BDV-H1766 ab (in 3'-NCR: A21G; in 5'-NCR: T73C, G86A, T88C).

5.2. Primer Labelling (Primer-Markierung)

Zur Erhöhung der Intensität der cDNA-Banden auf dem Sequenzgel wurde eine Validierung des Primer-Labelling durchgeführt. Es wurde die Menge des Primers und des γ^{32} P-ATP variiert (es wurden entweder 3µl Primer (10pmol/µl) und 5µl ATP (10µCi/µl), weiter 3/5 genannt, oder 5µl Primer (10pmol/µl) und 3µl ATP (10µCi/µl), weiter 5/3 genannt, eingesetzt). Die Dauer der Reaktion wurde auf 0,5h, 1h und 2h festgelegt. Nach der Reaktion wurde die Radioaktivität der Proben bestimmt. Nach der anschließenden Primer-Aufreinigung wurde die Radioaktivität der Proben noch mal gemessen. Entsprechend der eingesetzten Mengen war die Radioaktivität der 3/5-Proben vor der Aufreinigung etwa um 35% höher als die der 5/3-Proben. Nach der Aufreinigung zeigten die Ansätze 3/5 mit $\frac{1}{2}$ h Reaktionsdauer die höchste Radioaktivität (s. Tabelle 1). Die zusätzliche zweite Aufreinigung der Proben führte zum starken Verlust der Primermenge um 95% (s. Abb. 23).

Menge der Primer /radio- aktivmarkier- ten ATP (µl)	Dauer der Reaktion (h)	Radioaktivität vor der Aufreinigung (cpm/µl)	Radioaktivität nach der Aufreinigung (cpm/µl) doppelte Aufr.			
5/3	1/2h	838.276	1	156.433	3	746
3/5		1.338.529	2	239.815	4	11.472
5/3	1h	860.349	5	162.133		
3/5		1.309.178	6	198.980		
5/3	2h	852.946	7	165.738		
3/5		1.506.259	8	167.424		

Tabelle 1: Bestimmung der optimalen Zeit der Primer Labelling.

Die Qualität der Aufreinigung wurde auf 10% PAA-Gel überprüft (s. Abb. 23).



Abbildung 23: Validierung des Primer Labelling (Aufreinigung mit Spin-Säule). Angegeben sind die Dauer der Reaktion und die Menge der eingesetzten Primer und der radioaktiv markierten Nukleotide.
Außerdem habe ich verschiedene Methoden der Aufreinigung getestet: die schon seit langem benutzte Fällung mit Ethanol oder eine alternative Methode mit ProbeQuantTM G-50 Micro Column. Es wurde die Menge des Primers und des γ -³²P-ATP in diesem Experiment variiert (es wurden entweder 3µl Primer (10pmol/µl) und 5µl ATP (10µCi/µl), oder 5µl Primer (10pmol/µl) und 3µl ATP (10µCi/µl), eingesetzt). Die Dauer der Reaktion wurde auf 1/2h festgesetzt. Vor und nach der Aufreinigung (Spin-Säule oder EtOH-Fällung) wurde die Radioaktivität der Proben bestimmt. Um den Verlust der Primer bei der Aufreinigung berücksichtigen zu können, wurde zusätzlich die Konzentration der Primer in der Lösung photometrisch bestimmt (s. Tabelle 2).

Obwohl der mit der Ethanol-Fällung aufgereinigte Primer eine höhere Radioaktivität zeigt (Banden 7 und 8, s. Abb. 24), ist dies nicht mit einer guten Aufreinigungsqualität verbunden, sondern es bleiben auch freie Nukleotide in der Lösung, welche die Gesamtradioaktivität der Lösung erhöhen. Auf dem Gel (s. Abb. 24) erkennt man, dass die Proben 7 und 8 nach der EtOH-Fällung noch etwas restliche Nukleotide enthalten. Obwohl die Proben nach der Säulenaufreinigung weniger radioaktiv sind, habe ich diese Aufreinigungsmethode bevorzugt, weil sie Zeitersparnis und eine hohe spezifische Qualität (s.Spalte cpm/µg, Tabelle 2) bietet. In späteren *Primer Extention* Experimenten konnte ich bestätigen, dass beide Arten der Aufreinigung der eingesetzten Primer vergleichbare Ergebnisse liefern. Ich entschloss mich deswegen, die schnellere Spin-Methode zu benutzen (Variante mit 3µl Primer und 5µl radioaktiv markierten ATP).

Menge der	Methode der	Variante	Radioaktivität	Konzentration	cpm/µg
Primer und der	Aufreinigung		(cpm)	der Primer	
radioaktiven Nukleotid (µl)				(µg/ml)	
5/3	Spin-Säule	vor der	882.980	2033,7	434
3/5		Aufreinigung	1.688.992	2263,1	746
5/3		nach der	152.891	120,5	1269
3/5		Aufreinigung	254.893	37,5	6797
5/3	Fällung	vor der	887.522	1501,3	591
3/5		Aufreinigung	1.540.711	2381,3	647
5/3		nach der	728.665	733,1	994
3/5		Aufreinigung	912.224	86,5	10546

Tabelle 2: Qualität des Primer Labelling bei zwei verschiedenen Methoden der Aufreinigung.



Abbildung 24: Validierung des Primer Labelling. Angegeben sind die Art der Aufreinigung und die Menge der eingesetzten Primer und der radioaktiv markierten Nukleotide.

5.3. RNS-Modellierung (Strukturvorschläge)

Die Vorhersage der RNA-Sekundärstruktur wurde mit Version 3.0 des *Mfold*-Programms durchgeführt, das von der Gruppe Zuker in den USA entwickelt wurde (Zuker, 2003; http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/). Alle Strukturvorschläge wurden für 37°C Lösungstemperatur der RNS und 1M NaCl Ionenbedingungen (keine bivalenten Ionen) gemacht.

Nach Gibbsschem Gesetz "ändern sich alle Systeme bei konstanter Temperatur und bei konstantem Druck in der Weise, dass der Betrag der freien Energie ein Minimum anstrebt". Bei konstanter Temperatur und konstantem Druck setzt sich der Betrag ΔG ($\Delta G=G_{Produkte}-G_{Reaktanden}$) einer Reaktion aus zwei Anteilen zusammen: aus der Änderung des Wärmeinhaltes beim Vergleich von Reaktanden und Produkten und aus der Änderung des Ordnungsgrades im System. Gibbs konnte zeigen, dass die freie Energie durch die Formel G= H- TS gegeben ist. Dabei ist H die Bindungsenergie (Enthalpie) des Systems, T die Temperatur in Grad Kelvin, und S ein Maß für die Unordnung (Entropie). Bei konstanter Temperatur läuft eine Reaktion nur dann spontan ab, wenn die freie Energieänderung ΔG in der folgenden Gleichung negativ ist: $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$. Die Enthalpie H der Reaktanden oder Produkte entspricht der Summe

aller ihrer Bindungsenergien. Damit entspricht die Gesamtänderung der Enthalpie ΔH der Gesamtänderung der Bindungsenergien.

Die Stabilität der Strukturen wurde durch Bestimmung von ΔG (Niveau der freien Energie) ermittelt. Je niedriger die freie Energie des Moleküls, desto stabiler ist die vorhergesagte Struktur.

1) Das 3'-Ende

In der Abbildung 22 sind die Sequenzen des 3`NCR und des 5`NCR in Rot gezeigt. Als Strukturvorhersage des Computers habe ich 2 verschiedene Modelle für die 3'-NCR erhalten (s. Abb. 25). Im Kästchen sind die Inverted Repeat –Motive gezeigt, die das Potential haben, eine Stem-Loop-Struktur zu formen. Die Strukturen enthalten IR 1 und 3 (Struktur 1) und IR 2 und 3 (Struktur 2). IR1 befindet sich in einem hoch konservierten Bereich der 3'-NCR und enthält das Startkodon AUG (U₁ im Transkript) für das erste Protein – Nukleoprotein. IR2 ist auch hoch konserviert und befindet sich am äußeren Ende der 3'-NCR. IR3, welches sich eher in der Mitte der 3'-NCR befindet, ist weniger konserviert, wenigstens bei den Stämmen He/80 und No/98 (s. Abb. 14).





Als Plasmidkonstruktion / Sequenzierung schon beendet waren, fand ich in Laufe unserer Experimente eine Mutation an der Position 21 von A zum G, die sich in hochkonserviertem Bereich befindet und deswegen auch die Sekundärstruktur beeinflussen könnte. Deswegen hatte ich auch für diesen Fall eine Computermodellierung durchgeführt und 5 mögliche Sekundärstrukturen erhalten. Diese beinhalten die vorherigen Strukturen 1 und 2, ebenso wie 3 zusätzliche Strukturen, die den Strukturen 1 und 2 ähneln (s. Abb. 26). Alle diese Strukturen haben ein vergleichbares Delta G-Niveau ((-)10,2 - (-)8,56), deswegen sollte die Mutation die Ergebnisse unserer Experimente nicht beeinflussen. Es ist interessant zu bemerken, dass die Strukturen 3 und 4 der Struktur 1 ähneln und ein ähnliches IR-Motiv haben (<u>IR1+IR-/3/4</u>). Auch die Strukturen 2 und 5 ähneln sich (<u>IR2+IR3/4</u>). IR4 befindet sich in der Mitte der 3'-NCR und ist weniger konserviert, wenigstens bei den Stämmen He/80 und No/98 (s. Abb. 14).

Da im Genom das N-Gen auf die 3'-NCR folgt, habe ich auch für den Fall mit zusätzlicher N-Gen-Sequenz einen Strukturvorschlag ermittelt. Die dadurch neu entstandenen Strukturen sind in der Abbildung 27 dargestellt. Bemerkungswerterweise haben alle diese Strukturen das IR2; zusätzlich haben die Strukturen 2N1 und 2N3 das IR3. Die Struktur 2N1 besteht aus Struktur 2 des 3'-NCRs mit einem zusätzlichen Stem-Loop, der durch die Faltung eines Teils des N-Gens entstanden ist.

2) *Das 5'-Ende*

Für die 5'-NCR-Sequenz habe ich ein Modell als Strukturvorhersage des Computers erhalten (s. Abb. 28). Die vorgeschlagenen Struktur erhält IR5, das sich in einem hoch konservierten Bereich der 5'-NCR befindet. Zusätzlich enthält die vorhergesagte Struktur die IR 6, 7 und 8, die weniger konserviert sind und sich in dem mittleren Teil der Struktur befinden.

Das für die Experimente benutzte Konstrukt beinhaltet 4 Abweichungen zur Sequenz des H1766-BDV-Stamms. Das sind in der Abbildung 22 unterstrichene Nukleotide. Drei davon (T73C, G29A, T88C) kommen im Stamm No/98 auf den gleichen Positionen vor, und nur eine Mutationen (G86A) kommt in keinem der BDV-Stämme vor. Außerdem befinden sich 3 der 4 Abweichungen in der variablen Region des 5'-NCRs (T73C, G86A, T88C), deswegen haben wir diese Änderungen als nicht relevant eingestuft.

Da im Genom auf das 5'-NCR das L-Gen folgt, habe ich auch für diesen Fall die Strukturvorschläge des Computers ermittelt. Die dadurch neu entstandenen Strukturen L1 und L2 sind in der Abbildung 29 dargestellt. Die Strukturen erhalten das IR5, wie auch Strukturvorschlag für die 5'-NCR allein. Interessanterweise ähneln alle Strukturen der 3'NCR mit IR2 und die Struktur der 5'NCR mit IR5 dem "*Corcscrew*"-Modell der Influenza Viren!





Struktur 2N2



Abbildung 27: Mögliche Sekundärstrukturen der genomischen 3'-NCR mit zusätzlichem Teil des N-Gens.

Zusätzlich haben wir auch die RNS-Struktur der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR als Strukturvorhersage des Computers erhalten (s. Abb. 30). Ursprünglich befindet sich zwischen den beiden Enden das virale Genom. Diese zwischen den Enden liegende Sequenz ist vor der Analyse entfernt worden, um die Analyse und die Modelle zu vereinfachen. Für diese Sequenz habe ich 5 verschiedene Modelle als Strukturvorhersage des Computers erhalten (s. Abb. 30), die einander sehr ähneln und









Abbildung 29: Mögliche Sekundärstrukturen der genomischen 5'-NCR mit zusätzlichem Teil des L-Gens.



Abbildung 30: Mögliche Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR. Blau: Grenze zw. 3'- und 5'-NCR; roter Rahmen markiert gleiches Stem-Loop-Bild.



Abbildung 31: Mögliche Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR und einer unspezifischen Sequenz A_{50.}

ein ähnliches Energieniveau haben ((-)43,10 - (-)41,60). Alle vorgeschlagenen Strukturen erhalten IR A und B und ähneln der *"Panhandle"*-Struktur der Infuenza Viren. Mit einem blauen Strich ist die Grenze zwischen den 5'-und den 3'-NCR gezeigt. Auch wenn zwischen den beiden Enden eine unspezifische Sequenz vorliegt, wie die N₅₀-Sequenz in der Abbildung 31, erhält man für die Strukturen 1-4 das gleiche Stem-Loop-Bild, wie auch bei der Faltung der beiden Enden alleine, welches somit der *"Panhandle"*-Modell der Influenza Viren entspricht.

Die Struktur 5 enthält interessanterweise IR 2 und IR 5 (entsprechend für das singuläre 3'- und das 5'-Ende des Konstrukts), obwohl auch eine Paarung zwischen den beiden

Enden stattfindet. Damit entsprechen die Struktur eher dem "Corcscrew"-Modell der Influenza Viren.

5.4. RNS-Modifizierungen

RNS-Sekundärstrukturen können u.a. durch den Einsatz von methylierenden und carboxylierenden Agenzien ermittelt werden. In dieser Arbeit wurden Dimethylsulfat (DMS) und Diethylpyrocarbonat (DEPC) verwendet. DMS führt zu einer Methylierung von Cytidinen (Position N3), Adenosinen (Position N1) und Guanosinen (Position N7), während DEPC eine Carboxylierung von Adenosinen an Position N7 des Imidazolrings ermöglicht (s. Abb. 16, 17). Diesen Agenzien sind nur einzelsträngig vorliegende Nukleotide zugänglich. Die gepaarten Nukleotide werden nicht modifiziert. Die modifizierten Nukleotide wurden anschließend durch eine *Primer-Extention*-Analyse bestimmt. Da diese modifizierten Nukleotide nicht mehr in der Lage sind Watson-Crick Basenpaarungen einzugehen, bricht die cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase an dem davor liegenden Nukleotid ab. Dies ist durch zusätzliche Signale auf dem Autoradiogramm zu erkennen. Die Primer Extention- Produkte sind auf 1 nt (im Bezug auf DNA-Sequenz) verschoben. Die Positionen der modifizierten Nukleotide können dann mit den Strukturvorschlägen des Computers verglichen werden.

Es wurden verschiedene Konzentrationen von modifizierenden Agenzien getestet. Die Chemikalien wurden vor dem Experiment mit einem Reaktionspuffer gemischt, und zwar so, dass das Endvolumen 200µl entsprach. DMS wurde in den Konzentrationen 0,5%; 1%; 5% getestet. DEPC wurde in der Konzentration 10% eingesetzt (s. Abb. 32). Der Einsatz höherer Mengen an modifizierenden Agenzien hatte keinen Erfolg, da die Reste der Chemikalien trotz des Waschens einen negativen Einfluss auf die Aktivität der Reversen Transkriptase und entsprechend auf die Endergebnisse hatten. Die Modifizierung wurde bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt: bei +1°C (auf Eis), bei +20°C (Raumtemperatur) und bei 37°C. Die besten Ergebnisse lieferten die Proben, die bei +1°C auf Eis modifiziert wurden (s. Abb. 32). Die höheren Temperaturen beeinflussten sehr wahrscheinlich die Stabilität und die Lebensdauer der RNS. Empfehlenswert war die Modifizierung 2h bei +1°C (auf Eis).

Es ist zu bemerken, dass die Benutzung von Reaktionsgefäßen mit beschichteter Oberfläche (silikonisiert) sowohl für die RNS-Transkription als auch für die Primer Extention (Reverse Transkription) von großem Vorteil war. Bei der Fällung der Nukleinsäuren verläuft die Pelletbildung in diesen Gefäßen viel effektiver, auch für die Arbeiten mit radioaktivmarkierten Proben sind diese Gefäße zu empfehlen.

5.5. Primer Extention

5.5.1. Validierung der Primer Extention- Experimente

Die modifizierte RNS wurde in Primer Extention Experimenten eingesetzt. Die Qualität der Ergebnisse wurde von mehreren Faktoren beeinflusst, wie z.B. der Art der RNSabhängigen DNS-Polymerase (Reversen Transkriptase), der Konzentration des Acrylamids im Gel und dem Alter der RNS. Die besten Ergebnisse lieferten Experimente mit frischer oder bis zwei Wochen alter RNS. Die Verwendung von RNS, die älter ist als 2 Wochen, ist nicht zu empfehlen, da RNS auch bei -80°C nicht lange haltbar ist und häufiges Einfrieren und Auftauen (auch auf Eis) die Stabilität sehr stark beeinträchtigt.

Folgende Arten der Reversen Transkriptase wurden getestet: AMV Reverse Transkriptase, Transkriptor Reverse Transkriptase, SuperScript II RT, SuperScript III RT. Die besten Ergebnisse lieferten die Transkriptor Reverse Transkriptase und die SuperScript III (s. Abb. 33), sehr wahrscheinlich aufgrund deren hoher Thermostabilität: Reverse Transkription mit Superscript III wurde bei 50°C durchgeführt, mit Transkriptor RT bei 55°C. Es ist zu vermuten, dass die hohen Temperaturen die Sekundärstrukturen der Transkripte reduzieren und damit ein besseres Durchlesen der Sequenz ermöglichen.

Die Konzentration des Acrylamids im Gel ist auch ein einflussreicher Faktor für die Qualität der Ergebnisse der Primer Extention. Von uns wurden folgende Konzentrationen des Acrylamids getestet: 6%, 7,5%, 8%, 10%. Bei niedrigeren Konzentrationen (6%) war die Schärfe der Banden nicht optimal, und die Handhabung der Gele war wegen ihrer Konsistenz sehr problematisch. Bei hohen Konzentrationen des Acrylamids im Gel (10%) waren die Taschen zwar fest, und die Schärfe der Banden war ausreichend, aber das Aufkleben der Gele auf Whatman-Papier stellte ein großes Problem dar. Wegen niedrigerer Elastizität der Gele wurden sie beim Trocknen oft zerrissen, was die Qualität der Endergebnisse negativ beeinflusste. Als optimal stellte sich Konzentration des Acrylamids im Gel von 7,5% heraus. Unter diesen Bedingungen wurden sowohl bei der Handhabung als auch in Hinsicht auf die Bandenschärfe die besten Ergebnisse erzielt.

5.5.2. 3'-NCR: Auswertung der Daten

Die erzeugten T7-RNS-Transkripte wurden mit Chemikalien behandelt, die nur die einzelsträngigen Regionen der Nukleinsäuren modifizieren können. Danach wurde die Primer Extention ausgeführt, wobei die cDNS unter Benutzung von $[\gamma^{-32}P]$ -markierten Primern synthetisiert wird. Die Reverse Transkriptase bricht die cDNS-Synthese an den modifizierten Stellen des RNS-Moleküls ab. Wenn dieser cDNS-Mix auf einem Polyacrylamid-Gel separiert wird, können die Produkte sichtbar gemacht werden. Eine zusammen mit den Proben aufgetragene Kontrollsequenzierung des gleichen Sequenzierungsabschnitts wurde für die genaue Bestimmung der Positionen der Banden (sprich: der Stellen der Modifikationen) benutzt. Diese sollten die einzelsträngigen RNS-Strukturen darstellen. Die fehlenden Banden kennzeichnen die doppelsträngige RNS-Struktur. Das Plasmid wurde für diese Experimente mit SapI geschnitten.

Für die 3'-NCR-Analyse wurden während des Verlaufs der Doktorarbeit über 70 Experimente gemacht. In den Abbildungen 32 und 33 sind 2 Gele als Beispiel dargestellt.

In der Abbildung 34 sind die Ergebnisse aller 70 3'-NCR-Experimente zusammengefasst. Im Teil A ist die RNS-Sequenz der 3'-NCR und die entsprechende cDNS Sequenz gezeigt. Im Teil B sind 5 Strukturvorschläge des Computers (s. Seite 76) dargestellt: in Rot sind einzelsträngige Bereiche, in Grün doppelsträngige Bereiche gezeigt. Im Teil C sind die Ergebnisse aller Experimente zusammengestellt. Diese sind sortiert nach der Art der Modifikation (DMS 0,5%; 1%; 5%; DEPC 10%). Mit gelber Farbe sind in dieser Tabelle geschützte Bereich markiert, in denen keine Modifizierungen stattfinden können. Es sind aber selten einzelne Signale auch von den Nukleotiden in dieser U-Zone zu finden, wo theoretisch keine Modifizierungen stattfinden können. Die Ursachen dieses Phänomens sind sehr wahrscheinlich unspezifische Wechselwirkungen den Nukleotiden zwischen und den Modifikationsagenzien und sind als Ausnahme zu betrachten.

Im Teil D dieser Tabelle ist die Häufigkeit der erhaltenen Signale für die jeweilige Position aufgeführt. Die intensiven Signale wurden rot markiert.

Die dominanten Signale wurden dann auf die vorhergesagten Computermodelle aufgetragen (s. Abb. 35). Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein intensives Einzelstrangsignal (>15%); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signal (10-15%). Von allen 5 Modellen entsprechen Modell 3 und 5 am besten den Ergebnissen. Die Struktur 3 beinhaltet IR 1 und 3, die Struktur 5 IR 2 und 3. Meine Ergebnisse zeigen, dass eine alternative Faltung des IR 1 und 2 möglich ist. In Struktur

Ergebnisse







		4
		N
		12
	777000	4
		<mark>9</mark>
		Q
		<u>8</u>
		5
		-
		H
	1 1 2 2 3 3 3 2 1 3 2 3 3 3 3 3 3 3 3 3	244
	1 1 0 8 7 2 5	<u> </u>
	0422	7
	0 0 1 1 1 3 3	46
		8
	 0	4
	4400+++	<mark>1</mark>
		2
		2
	13 13 12	34
		-
		1
	440-0	<u>5</u>
		-
		2
	440-	e <u>-</u>
	<u></u>	ut I
		e F
	4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4 4	
		9L
		∎ d
		el H
		d H
<u> - 0 6 4 0</u>	0,5% 5% 11% 10% 11n	–
Aod.	0MS 0MS 0EPC 0EPC	a l
		-
В	O O	\Box

 RNS
 A
 C
 A
 C
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 A
 C
 D
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 U
 C
 U
 C
 U
 C
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 U

∢



Experimenten vorgekommen sind (in > 15% *aller Experimente vorgekommen*).

Blinde" Zone

Doppelstrangregion

- Einzelstrangregion



86



Abbildung 36: Alternative Strukturen der 3'-NCR mit "freiem" und "gebundenem" ATG. Das U aus dem ATG ist mit einem Dreieck gezeigt. Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Einzelstrangsigna (>15%); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives. Signal (10-15%).

3 ist U aus dem ersten Startkodon ATG innerhalb des Stem-Loop des IR 1, und in Struktur 5 ist es einzelsträngig vorhanden (s. Abb. 36). Diese Anordnung könnte eine funktionelle Bedeutung haben.

5.5.3. 5'-NCR: Auswertung der Daten

Für die 5'-NCR-Analyse wurde das *pBlueskript-5'-NCR*-Plasmid zur Synthese der RNS an der XbaI- Stelle geschnitten. Es wurden über 20 Experimente gemacht. In der Abbildung 37 ist ein Gel als Beispiel dargestellt.

Als Kontrolle (s. Abb. 37) habe ich die nicht modifizierte RNS analysiert. Die Reverse Transkription dieser Proben erfolgte bei 50°C mit SuperScript Reverse Transkriptase. Im rechten Teil des Gels sind identisch modifizierte Proben aufgetragen, die jedoch mit dem Transkriptor Reverse Transkriptase bei 62°C transkribiert wurden. Mit roten Kreisen sind die entdeckten Signale gezeigt. Es fällt auf, dass bei den Proben, die mit







SuperScript III transkribiert wurden erheblich mehr Signale auftreten. Vermutlich hat die Transkription mit der Transkriptor Reversen Transkriptase wegen der hohen Inkubationstemperatur der Transkription nicht optimal stattgefunden. Die hohe Temperatur beeinträchtigte wahrscheinlich die Stabilität des Enzyms und/oder der RNS. In den Abbildungen 38 und 39 sind die Ergebnisse aller 20 5'-NCR-Experimente zusammengefasst. Die dominanten Signale habe ich auf das vorhergesagte Computermodell aufgetragen (s. Abb. 40). Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Einzelstrangsignal (vorgekommen in mehr als 15% der Experimente); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signal (vorgekommen in 10-15% der Experimente); Ein sehr starkes Signal am 5'-Ende, das wir nach der Computervorhersage erwartet hatten, hat sich in unseren Experimenten bestätigt: jedes Nukleotid aus dem ersten Loop wurde in unseren Experimenten modifiziert; d.h., es lag einzelsträngig vor. Sehr stabil zeigte sich das Inverted Repeat 7 (IR 7): hier wurden keine Modifikationen festgestellt.

5.5.4. 3'+ 5'-NCR: Auswertung der Daten

Für die Erzeugung der Transkripte wurden die vorher konstruierten Plasmide benutzt. Das 5'-NCR-Plasmid wurde vor der Transkription an der XbaI-Schnittstelle geschnitten. Beide 3'- und 5'-NCR-Transkripte wurden "annealt" (1:1 gemischt, bis 65°C aufgeheizt und danach im Laufe von 2h auf RT abgekühlt). Danach wurden die Transkripte mit Chemikalien behandelt, die nur die einzelsträngigen Regionen der Nukleinsäuren modifizieren können. Anschließend wurde die Primer Extention ausgeführt, wobei die cDNS unter Benutzung von $[\gamma^{-32}P]$ -markierten Primern vom 3'-NCR aus synthetisiert wird. Da das 5'-NCR-Transkript kürzer ist als das 3'-NCR-Transkript, lagern sich die Primer nur an dem 3'-NCR Molekül an. Die Reverse Transkriptase bricht die cDNS-Synthese an den modifizierten Stellen des RNS-Moleküls ab. Wenn dieser cDNS-Mix auf ein Poliacrylamidgel aufgetragen wird, kann man die Banden verschiedener Länge sehen. Die zusammen mit den Proben aufgetragene Sequenz wurde für die genaue Bestimmung der Positionen der Banden (sprich: der Stellen der Modifikationen) benutzt. Diese sollen die einzelsträngigen RNS-Strukturen darstellen. Die fehlenden Banden kennzeichnen die doppelsträngige RNS-Struktur. Da nur das 3'-NCR-RT-Transkript entsteht, kann man nur die Sequenz der 3'-NCR auf dem Gel sehen.



Abbildung 40: Einzelstrang-Signale und Sekundärstruktur des BDV-5'-NCR. *Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Einzelstrangsignal (in >15% der Experimente vorgekommen); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives (in 10-15% der Experimente vorgekommen).*

Für die 3'-+5'-NCR-Analyse wurden während der gesamten Doktorarbeit 27 Experimente gemacht. In der Abbildung 41 ist ein Gel als Beispiel dargestellt. Die besten Ergebnisse zeigten die Proben, die mit Superscript III Reverse Transkriptase bei 55°C synthetisiert wurden. Die Transkriptionstemperatur 62°C war für die Transkriptor Reverse Transkriptase nicht optimal (sehr wahrscheinlich zu hoch). Die Stabilität des Enzyms war beeinträchtigt. Mit roten Kreisen sind die entdeckten Signale gezeigt.





RNS

∢

cDNS

Abbildung 42: Experimentelle Resultate der 2D-Analyse der BDV-3'-und 5'-NCR. Es wurden nur die Signale ausgewertet, die mindestens in 10 Experimenten vorgekommen sind (in >15% aller Experimente vorgekommen).

94



Auf der Abbildung 43 sind die Ergebnisse der 3´+5´-NCR-Experimente zusammengefasst.

Struktur 5

Abbildung 43: Einzelstrang-Signale und Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Gegenwart der 5'-NCR. Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Einzelstrangsignal (in >15% aller Experimente vorgekommen); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signal (in 10-15% aller Experimente vorgekommen). Blau: Grenze zw. 3'- und 5'-NCR.





-	5 5	5 5		
-	3	3	1	3
ო	7	9	2	5
333	7 7 7	6666	2 2 1	5 5 5
с С	3	3		
2	4 6	3 6	1 3	1 7
- 				
с С	2 2	2 2	3 3	7 7
-	2 2	2 2	1	-
DMS 0,5%	DMS 1%	DMS 5%	DEPC10%	DEPC _{20%}

1		
	7	
	1	
	-	
	1	
ļ		
ļ		
ļ		
ļ	23	
	22	
ļ		
	123	
	33	
	•	
	4 0	
	2	
ļ		
	11	
	-	
ļ		
	7 27	
	3	
	10	
	1	
Į	М	
	_	
	C	٦.

Experimente: 27.

Einzelstrangregion



Abbildung 44: Experimentelle Resultate der 2D-Analyse im Vergleich zu Modelvorhersagen für 3'- und 5'-NCR mit einer inserierter unspezifischen Sequenz. Es wurden nur die Signale ausgewertet, die mindestens in 15% aller Experimenten vorgekommen sind.



Abbildung 45: Mögliche Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR und einer unspezifischen Sequenz.

Von allen 5 Modellen ohne inserierten unspezifischen Sequenz zwischen den 3'- und 5'-NCR entspricht Modell 4 am besten unseren Ergebnissen (s. Abb. 46).

In der Abbildung 44 sind die Ergebnisse aller Experimente mit inserierten unspezifischen Sequenz zwischen den 3'- und 5'-NCR schematisch zusammengefasst. Von allen Modellen mit inserierten unspezifischen Sequenz zwischen den 3'- und 5'-NCR (s. Abb. 45) zwischen den 3'- und 5'-NCR entsprechen Modelle 4 und 5 am besten unseren Ergebnissen. Struktur 4 beinhaltet IR A und B, Struktur 5 beinhaltet IR 2 und 5, wie in der Vorhersage für die einzelnen Enden alleine. Beide Strukturen können in den verscheiden Prozessen des Virus-Lebenszyklus wichtig sein und funktionelle Bedeutung haben.



Abbildung 46: Einzelstrang-Signale und Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Gegenwart der 5'-NCR. Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Signal (> in 15% aller Experimente); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signa (in 10-15% aller Experimente).



Abbildung 47: Einzelstrang-Signale und Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Gegenwart der 5'-NCR mit einer unspezifischen Sequenz dazwischen (Struktur 4). Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Signal (> in 15% aller Experimente vorgekommen); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signal (in 10-15% aller Experimente vorgekommen).



dG = -29.74 (initially -31.10) 5'+50N+3'-NCR

Struktur 5

Abbildung 48: Einzelstrang-Signale und Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Gegenwart der 5'-NCR mit einer unspezifischen Sequenz dazwischen (Struktur 5). Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können. Die dunkelroten Kreise bezeichnen ein sehr intensives Signal (> in 15% aller Experimente vorgekommen); die hellroten Kreise bezeichnen ein mittelintensives Signal (in 10-15% aller Experimente vorgekommen).

6. Diskussion

6.1. Sekundärstruktur der NCRs

Die viralen Polymerasen von Negativ-Strang-RNS-Viren sind verantwortlich für die Transkription (Erzeugung subgenomischer mRNS) und die RNS-Replikation (s. Abb. 49). In beiden Fällen bindet die Polymerase am 3'-Ende der genomischen RNS zur Initiation der Reaktion. Die 3'-NCR (engl., non coding region, - nicht kodierende Region) des Minus-Stranges fungiert dabei als Promotor für die Synthese des Plus-Stranges und bei der mRNS-Synthese. Die Bindung der Polymerase ist von der Sekundärstruktur des Endes abhängig und essenziell für die Initiierung der viralen Replikation (Modrow et al., 2003). Es ist von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass bei verschiedenen Virusgruppen die nicht kodierenden Bereiche (jede einzeln und Sekundärstrukturen zusammen) spezifische bilden. die bei dem viralen Vermehrungsprozess eine wichtige Rolle spielen (s. Einleitung und Dildine and Semler, 1992; Flick and Hobom, 1999; Hsu et al., 1987).

6.1.1. 3'-NCR

Basierend auf der Primer Extention-Analyse konnte ich zwei unterschiedliche Strukturen (Modell 3 und Modell 5) für die 3'-NCR postulieren (s. Abb. 36). Die Struktur 3 beinhaltet IR 1 und 3, Struktur 5 enthält IR 2 und 3. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass alternative Faltungen von IR 1 und 2 möglich sind. In der Struktur 3 liegt das U aus dem ersten Startkodon ATG innerhalb des Stem-Loops des IR 1, während es in Struktur 5 einzelsträngig vorhanden ist (s. Abb. 36). Diese Flexibilität könnte für die Regulation der viralen Replikation und Transkription von Bedeutung sein. Denkbar sind alternative Strukturen für die Replikation und für die Transkription, die sich gegenseitig ausschließen. Das heißt, die Existenz von 2 möglichen alternativen Strukturen der 3'-NCR ließe sich funktionell mit einem Promotor erklären, der bei verschiedenen Bedingungen verschiedene Konformationen annimmt und entsprechend verschiedene Prozesse steuert.

Rosario et al. (2005) haben die minimale Größe (25nt) des genomischen Promotors am 3'-Ende des Borna Virus Genoms mittels Mini-Genom-Untersuchungen definiert. Entsprechend unseren Ergebnissen wäre das IR 2 der wichtigste Teil des BDV 3'-NCR-Promotors.

Als alternative Lösung für die Struktur 5 (s. Abb. 36) habe ich aufgrund der experimentellen Signale eine weitere Struktur postuliert, die sehr gut zu unseren Ergeb-



Abbildung 49: Replikations- und Transkriptionsschema von Negativstrang-RNS-Viren. Ausgehend vom in der negative Richtung orientierten Genom (- Strang) wird vom 3'-Promotor aus eine komplementäre Kopie gebildet (cRNS, +Strang), die als Matrize für neue vRNS-Transkripte dient (da wird vom 3'-Promotor der cRNS wiederum ein komplementärer Transkript gebildet). Außerdem wird vom vRNS ausgehend vom 3'-NCR-Promotor die virale mRNS transkribiert, welche anschließend in die virale Proteine translatiert wird.

nissen passt (s. Abb. 50). Diese Struktur beinhaltet IR2 und 2 kurze zusätzliche *Inverted Repeats* (s. Abb. 50). Es ist bemerkenswert, dass sich das Translations-Start-Kodon bei dieser Konformation im *Stem* der 3'-*Hairpin*-Struktur direkt hinter einem *Loop* befindet, eine Anordnung, die die Initiation der Transkription erleichtern könnte (Modrow et al., 2003). Für eine bessere Übereinstimmung mit den experimentellen Ergebnissen habe ich einen Teil vom *Stem* der IR3 aufgeschmolzen und damit den *Loop* vergrössert. Das Einfügen ähnlicher Änderungen wurde auch von den anderen Autoren durchgeführt und gilt als anerkannt. So, empfehlen Matthews et al. (2004), vorhergesagte Strukturen zu ändern, wenn sie mit den Daten der Primer Extention nicht im Einklang stehen.



Abbildung 50: Das alternative Modell der BDV 3'-NCR vRNS. Die experimentellen Signale sind als Kreise dargestellt. Die Farbe der Signale signalisiert die Häufigkeit ihres Auftretens: dunkelrote Signale kommen häufiger vor als hellrote. Mit gelben Kreisen gekennzeichnete Uracile sind als "Blinde Zone" anzunehmen, da dort keine Modifikationen stattfinden können.

Auch Weik et al. änderten aufgrund der experimentellen Daten eine vorhergesagte Struktur am 5'-Ende des Ebola Virus Genoms (s. Abb. 51) (Weik et al., 2002).



Abbildung 51: Sekundärstrukturen der Startregion des Nukleoprotein-Gens des Ebola Virus. Die vom Computer vorhergesagten (links) bzw. experimentell bestimmten (rechts) Strukturen sind dargestellt. Gezeigt ist das 5 Ende des +Stranges. Nach Weik et al., 2002.

6.1.2. 5'-NCR

Die Sequenz der 5`-NCR der vRNS ist auf der Ebene der cRNS der Promotor zur Bildung der neuen vRNS und spielt daher eine wichtige Rolle bei der Initiation der viralen Replikation. Eine in der Computervorhersage als *"Stem-Loop"-Struktur* identifizierte Region, gebildet aus IR5 (s. Abb. 28), konnte in unseren Experimenten bestätigt werden: jedes Nukleotid aus dem *Loop* wurde modifiziert und lag somit einzelsträngig vor (s. Abb. 40). Sehr stabil hingegen zeigten sich die *Inverted Repeats* (IR 5-8): hier wurden nur sehr schwache bis keine Modifikationen festgestellt (s. Abb. 40). Da die experimentellen Daten mit den vorhergesagten Daten übereinstimmen, ist die Existenz dieser Struktur sehr wahrscheinlich. Da das 5'-Ende der vRNS als 3'-Promotor der cRNS für die Synthese der neuen vRNS funktioniert, muss es von der gleichen viralen Polymerase erkannt werden, die das 3'-Ende der vRNS erkennt. Aus diesem Grund erscheint die Ähnlichkeit der Struktur beiden Enden (3' und 5') nahe liegend. Für die Erkennung des Promotors ist nicht nur die Struktur, sondern auch die Sequenz entscheidend. Es erscheint logisch, dass wenn das 5'-Ende der vRNS zum 3'-Ende der cRNS wird, es zur Komplementarität der Sequenzen führt, schließt aber die anderen Strukturen nicht aus.

6.1.3. Interaktionen zwischen 3'- und 5'-NCR

Von den 5 Strukturvorhersagen bei der Interaktion der beiden Enden entspricht Modell 4 am besten unseren Ergebnissen (s. Abb. 30, 43). Dieses Modell deckt sich auch mit der *Panhandle*-Theorie. Beide Enden sind komplementär zueinander und bilden einen langen *Stem*. Die *Panhandle*-Konformation spielt eine wichtige Rolle beim Erkennungsprozess der viralen Polymerase. Wie in der Einleitung dargestellt, werden drei verschiedene Funktionen der *Panhandle*-Struktur beim Replikationsprozess des Influenza Virus diskutiert:

- Sie dient als Signal f
 ür das Umschalten zwischen der mRNS-Synthese und der cRNS-Synthese.
- 2) Sie dient als Terminations-Signal bei der Synthese der viralen mRNS.
- 3) Die *Panhandle*-Struktur funktioniert als Initiierungsstelle für die Verpackung der viralen Nukleoproteinkomplexe in den viralen Partikel (Hsu et al., 1987).

Die Panhandle-Konformation des BDV-Genoms bleibt bestehen, auch wenn sich eine unspezifische Sequenz zwischen den 3'- und 5'-Enden befindet (s. Abb. 31, 45). Diese Strukturen scheinen ein häufiges Phänomen bei den Viren mit einzelsträngigem Genom zu sein. An den 3'- und 5'-Enden mehrerer viraler Genome (z.B. bei dem Parvovirus B19 [Genus *Erythrovirus*, Unterfamilie *Parvovirinae*], beim Influenza Virus) befinden sich palindromische Sequenzabschnitte, die als ITR (*inverted terminal repeat*) - Regionen bezeichnet werden. Sie können sich zu einer *Panhandle*- oder *Corcskrew*-Struktur zurückfalten und die Ausbildung von haarnadelartigen Abschnitten an den Genomenden ermöglichen. Da nicht nur die Sequenzen des 3'- und 5'-ITRs der Parvoviren und der Influenza Viren an den Genomenden zueinander komplementär sind, sondern auch kurze Bereiche innerhalb der Wiederholungseinheiten, können sich durch die Ausbildung von doppelsträngigen Bereichen *Stem-Loop*-Strukturen ausbilden. Alternativ hierzu können die Genome *Panhandle*-Strukturen bilden (s. Abb. 52) (Modrow et al., 2003).

Schon 2001 schlugen Pleschka et al. eine *Panhandle*-Konformation für die Enden des Borna Virus vor (s. Abb. 53). Die Struktur 4 (s. Abb. 47) ist eine zusammenfassende Darstellung der Panhandle-Struktur. Die experimentellen Daten passen sehr gut mit diesem Modell zusammen.



Abbildung 52: Genom des Parvovirus B19 (einzelsträngige DNS). Die einzelsträngigen, linearen DNS-Genome besitzen an ihren Enden komplementäre Wiederholungen ITR (inverted terminal repeats). Nach Modrow et al., 2003.



Abbildung 53: "Panhandle"-Struktur des BDV. Nach Pleschka et al., 2001.

Aber aufgrund der computer-gestützten Strukturvorschläge für die 3'- und 5'-Enden des Borna Virus (s. Abb. 31) welche dem "*Corkskrew*"-Modell entsprechen und auch experimentellen Ergebnisse haben wir neue, alternative Modelle für die Sekundärstruktur beider Genomenden entwickelt. In den Abbildungen 54-55 ist die mögliche Sekundärstruktur der viralen Genomenden dargestellt. Diese Struktur ist als weitere Alternative zum *corkscrew*-Modell (s. Abb. 9) auf Grund der *Primer Extention*-Ergebnisse entwickelt worden. In dieser Struktur hat jeweils das 3'- und das 5'-Ende einen terminalen Stem-Loop. Interessanterweise liegen sich die 3'- und 5'-*Stem-Loop*s direkt gegenüber und stellen damit ein spezifisches *corcskrew*-Bild dar. Die folgende doppelsträngige Region vervollständigt das *corcskrew*-Modell.

Die vorgeschlagene Struktur der vRNS hat eine "gebogene" Konformation. Dies könnte die Aktivität der Polymerase und den nukleären RNP-Export beeinflussen, wie bei Influenza Viren dokumentiert (Tchatalbachev et al., 2001). Hier wurde gezeigt, dass die virale Polymerase mit der "nach unten" gewölbten vRNS assoziiert. Dies führt zum spezifischen nukleären Export der RNPs, welche die vRNS enthalten und differenziert dadurch zwischen RNPs mit vRNS und denen mit cRNS (die entsprechend "nach oben" gewölbt ist) und nicht verpackt werden.

Die vorgeschlagene Struktur hat aufgrund des U-Nukleotides, das am 5'-Ende der vRNS keinen Paarungs-Partner findet, eine "nach oben" gebogene Konformation. Da ein Nukleotid übrig bleibt, ähnelt der Strukturvorschlag den Strukturvorschlägen von Flick und Hobom für Influenza Viren (s. Abb. 11).

In der vorgeschlagenen Struktur (s.Abb. 54) befindet sich das START-Kodon in einem kleinem Stem, was die Initiation der Transkription beeinflussen könnte (Modrow et al., 2003). Das STOP-Kodon befindet sich bei der vorhergesagten Struktur in einem Doppelstrang-Bereich. Das könnte der Ablauf der Transkriptionstermination beeinflüssen.

Schneemann et al. haben in einer früheren Arbeit konservierte Signale in der Borna Virus-Genomsequenz identifiziert. Als CTIS ("*conserved transcription initiation site*") wurde die Sequenz AUUGUUUUACUUGU und als Terminationsort (*conserved transcritpion termination site*) die Sequenz AUUUUUU identifiziert (Schneemann et al., 1994). Die Bereiche sind auf der Struktur markiert (s.Abb. 54-55).

In der vorgeschlagenen Struktur liegt die CTIS teilweise einzelsträngig (d.h. auch im Loop) vor. Das erleichtert die Bindung der viralen Polymerase am Promotor-Sequenz der RNS-Moleküls und somit die Initiation der Transkription.

Um festzustellen, ob dieses Modell tatsächlich existiert, wird die Mutationsanalyse benötigt, was mir nicht möglich war, da die zeitnah existierenden Reversen Genetiksysteme für BDV eine zu schwache Aktivität hatten (Schneider et al., 2003; Perez et al., 2003; Ma, 2003). Das System von Rosarion et al. (2005) könnte hier weiterhelfen.

Bei verschiedenen einzelsträngiger RNS- und DNS-Viren werden verschiedene Modelle des Genoms diskutiert. So hatten Crow et al. mittels Primer Extention gezeigt, dass für die erfolgreiche Replikation des Influenza Virus eine doppelsträngige Formation zwischen den 3'- und 5'-Enden der cRNS benötigt wird (Crow et al., 2004).

Brownlee et al. zeigten, dass das 3'-Ende der vRNS des Influenza Virus in Protektionsexperimenten mit gebundener viralen Polymerase eine nicht so kritische Rolle spielt. Es wurde vermutet, dass das 3'-*hairpin* eher eine kurzlebige Übergangsstruktur ist, die vor der Initiation der Transkription schmilzt (Leahy et al., 2001).

Whelan et al. hatte mittels mRNS-Analyse für Vesikular Stomatitis Virus (*Rhabdoviridae*) gezeigt, dass für eine effiziente Termination der Transkription bei der mRNS-Synthese die Gen-Endsequenz so positioniert sein muss, dass es zur minimalen Distanz zwischen den Gen-Start-Sequenz und der Gen-Endsequenz kommt (Whelan et al., 2000). Auch bei dem Borna Virus kann die Termination der Transkription nach einem ähnlichem Mechanismus erfolgen, wobei das 3'- und das 5'-Enden zusammenkommen, wie in der Abb. 54 und 55.


Abbildung 54: Struktur für die BDV-3´-und 5´-NCRs.



Abbildung 55: Experimentelle Befunde für die Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs.





Struktur L3



Struktur L4

Abbildung 57: Mögliche Sekundärstrukturen der genomischen 5'-NCR des H1766 mit zusätzlichem Teil des L-Gens.



Abbildung 58: Mögliche Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR (Stamm H1766). Blau: Grenze zw. 3'- und 5'-NCR; roter Rahmen markiert gleiches Stem-Loop-Bild.

6.2. H 1766: Sekundärstrukturvorschläge.

Da das für die Experimente benutztes Konstrukt für die 5'-NCR von H1766 vier nicht relevanten Abweichungen zur Originalsequenz des H1766-BDV-Stamms beinhaltete (s. Abb. 22 + Text Seite 74), war es für mich von Interesse, Modell der Sekundärstrukturen für die Originalsequenz der 5'-NCR von H1766 alleine und in der Gegenwart der 5'-NCR mit den Strukturvorschlägen der experimentell verwendeten 5'-NCR zu vergleichen.



Abbildung 59: Mögliche Sekundärstrukturen der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR (beides H1766) und einer unspezifischen Sequenz A₅₀ (Strukturen 2,3 5-9) in Anwesenheit eines Teils des L-Gens (am 5'-Ende) und des N-Gens (am 3'-NCR).

Für die 5'-NCR-Sequenz habe ich 7 verschiedene Modelle als Strukturvorhersage des M-Fold Programms erhalten (s. Abb. 56), die einander sehr ähneln und ein ähnliches Energieniveau haben ((-)22,8 – (-)20,9). Alle vorgeschlagenen Strukturen erhalten IR5, IR6, IR7 und IR8. IR5 befindet sich in einem hoch konservierten Bereich der 5'-NCR. IR 6, 7 und 8 sind weniger konserviert (s. Abb. 56).

Da im Genom auf die 5`-NCR das L-Gen folgt, habe ich auch für diesen Fall die Strukturvorschläge geprüft. Die entstandenen Strukturen L1 bis L4 sind in der Abbildung 57 dargestellt. Die Strukturen erhalten das IR5, wie auch Strukturvorschläge für die 5'-NCR allein. Die Struktur L2, L3 und L4 erhalten außer IR5 auch das IR8.

Interessanterweise ähneln alle Strukturen der 3'-NCR mit IR2 und alle Strukturen der 5'-NCR mit IR5 dem "*Corcscrew*"-Modell der Influenza Viren.

Von allen sieben vorhergesagten Modellen der 5'-NCR entsprach Modell 1 am besten meinen Ergebnissen. Eine Region, welche in den Computervorhersagen als "*Stem-Loop*"-Struktur identifiziert wurde (gebildet aus IR5) konnte in unseren Experimenten bestätigt werden: jedes Nukleotid aus dem *Loop* wurde modifiziert und lag somit einzelsträngig vor. Die *Inverted Repeats* (IR 5-8) zeigten sich sehr stabil: hier wurden nur schwache oder gar keine Modifikationen festgestellt. Da die experimentellen Daten mit den vorhergesagten übereinstimmen und die Struktur 1 das niedrigste Niveau der freien Energie hat, ist Existenz dieser Struktur sehr wahrscheinlich.

Zusätzlich habe ich auch die RNS-Struktur der 3'-NCR in Anwesenheit der 5'-NCR als Strukturvorhersage des Computers erhalten (s. Abb. 58). Ursprünglich befindet sich zwischen den beiden Enden das virale Genom. Diese zwischen den Enden liegende Sequenz ist vor der Analyse entfernt worden, um die Analyse und die Modelle zu vereinfachen. Für diese Sequenz habe ich 7 verschiedene Modelle als Strukturvorhersage des Computers erhalten (s. Abb. 58), die einander sehr ähneln und ein ähnliches Energieniveau haben. Alle vorgeschlagenen Strukturen (ΔG : (-)43,26 – (-) 34,9) enthalten IR A und B und ähneln der "*Panhandle*"-Struktur der Infuenza Viren.

Auch wenn eine unspezifische Sequenz zwischen den beiden Enden vorliegt (wie z.B., die A₅₀-Sequenz in der Abbildung 59), erhält man für die Strukturen 1-3 das gleiche Stem-Loop-Bild, wie auch bei der Faltung der beiden Enden alleine, welches somit dem *"Panhandle"-Modell der Influenza Viren entspricht. Die Strukturen 4-9 enthalten interessanterweise IR 2 und IR 5 (entsprechend für das singuläre 3′- und das 5′-Ende des Konstrukts). Strukturen 5, 6 und 8 schließen auch IR 6, 7 und 8 ein, die bei der Einzellfaltung der 5′-NCR sehr spezifisch auftreten. Außerdem lagern sich weitere Bereiche der beiden Enden aneinander, was zu einer erhöhten Stabilität führen sollte.*

Damit entsprechen die Strukturen eher dem *"Corcscrew"-*Modell der Influenza Viren. Die Strukturen 7-9 stellen das Genom als System mit zwei nicht direkt kontaktierenden Enden dar.

Von den sieben Strukturvorhersagen für die Interaktion der beiden Enden entspricht Modell 2 am besten unseren Ergebnissen. Dieses Modell deckt sich auch mit der *Panhandle*-Theorie. Beide Enden sind komplementär zueinander und bilden einen langen *Stem*. Die Panhandle-Konformation des BDV-Genoms bleibt bestehen, auch wenn sich eine unspezifische Sequenz zwischen den 3'- und 5'-Enden befindet (s. Abb. 59, Strukturen 1-3).

Schon 2001 schlugen Pleschka et al. eine *Panhandle*-Konformation für die Enden des Borna Virus vor (s. Abb. 50). Die Struktur S1 (s. Abb. 60) ist eine zusammenfassende Darstellung der *Panhandle*-Struktur (beinhaltet IR A und IR B). Die experimentellen Daten für die beiden Enden (mit rotem oder rosa-farbendem Pfeil gezeichnet) passen sehr gut mit diesem Modell zusammen (s. Abb. 61). Andererseits, sprechen die Signale aus der Einzellenden-Analyse gegen diese Struktur. Vor allem die Signale vom 5'-Ende passen sehr schlecht auf dieses Modell (mit roten Kreisen dargestellt, s. Abb. 61).

Aufgrund der computer-gestützten Strukturvorschläge für die 3'- und 5'-Enden des Borna Virus (s. Abb. 59) welche dem "*Corkskrew*"-Modell entsprechen und den experimentellen Ergebnisse habe ich neue alternative Modelle für die Sekundärstruktur beider Genomenden entwickelt. In den Abbildungen 62-73 sind diese möglichen Sekundärstrukturen der viralen Genomenden dargestellt. Die Strukturen P1-P6 sind als weitere Alternativen zum *corkscrew*-Modell auf Grund der *Primer Extention*-Ergebnisse entwickelt. In diesen Strukturen hat jeweils das 3'- und das 5'-Ende einen terminalen *Stem-Loop*. Interessanterweise liegen die 3'- und 5'-*Stem-Loop*s sich direkt gegenüber und stellen damit ein spezifisches *corcskrew*-Bild dar. Die folgende doppelsträngige Region vervollständigt das *corkskrew*-Modell.

Fünf von sechs vorgeschlagenen Strukturen der vRNS haben eine "nach oben" gebogene Konformation (Ausnahme: Struktur P2). Die Biegerichtung der RNS könnte die Aktivität der Polymerase und den nukleären RNP-Export beeinfussen, wie bei Influenza Viren dokumentiert (Tchatalbachev et al., 2001).





Abbildung 61: Experimentelle Befunde für die postulierte S1-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 62: Postulierte Struktur "P1" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 63: Experimentelle Befunde für die postulierte P1-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 64: Postulierte Struktur "P2" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 65: Experimentelle Befunde für die postulierte P2-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 66: Postulierte Struktur "P3" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 67: Experimentelle Befunde für die postulierte P3-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 68: Postulierte Struktur "P4" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 69: Experimentelle Befunde für die postulierte P4-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 70: Postulierte Struktur "P5" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 71: Experimentelle Befunde für die postulierte P5-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55.



Abbildung 72: Postulierte Struktur "P6" für die BDV-3´-und 5´-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 54.



Abbildung 73: Experimentelle Befunde für die postulierte P6-Struktur der BDV 3'-und 5'-NCRs des Stamms H1766. Legende: s. Abb. 55. Die Struktur P2 hat eine "nach unten" gebogene Konformation, wie die vRNS des Influenza Virus. Im Gegensatz dazu haben die Strukturen P1, P3, P4, P5 und P6 aufgrund des U-Nukleotides, das am 5′-Ende der vRNS keinen Paarungs-Partner findet, eine "nach oben" gebogene Konformation.

Bei allen Strukturvorschlägen (P1-P6) befindet sich das START-Kodon in einem kleinem Stem, was die Initiation der Transkription beeinflussen könnte (Modrow et al., 2003).

Das STOP-Kodon befindet sich bei der Struktur P4 in einem einzelsträngigen Bereich. Bei den Strukturen P1, P2, P3, P5 und P6 ist das STOP-Kodon in einem Doppelstrang-Bereich. Es ist zu bemerken, dass sich in den Strukturen P4 und P6 das STOP-Kodon im *Loop* eines kleinen *Stem-Loops* befindet (s. Abb. 69 und 73). Dies könnte den Ablauf der Transkriptionstermination beeinflüssen.

In allen vorgeschlagenen Strukturen (P1-P6) liegt die CTIS (,,<u>c</u>onserved <u>transcription</u> <u>initiation site</u>") teilweise einzelsträngig (d.h. im Loop) vor. Das könnte die Bindung der viralen Polymerase am Promotor-Sequenz der RNS-Moleküls erleichtern und somit die Initiation der Transkription.

Von allen Modellen finde ich die Modelle P1 und P6 am interessantesten, weil sie am besten zu experimentellen Ergebnissen passen. Um festzustellen, welches Modell öfter vorkommt, wird die Mutationsanalyse benötigt, was mir nicht möglich war, da zum Zeitpunkt der experimentalen Arbeiten noch kein Reverses Genetiksystem für BDV existierte, welches eine ausreichend hohe Replikationsaffinität besaß.

Es ist wichtig zu bemerken, dass die für die Originalsequenz der vRNS-Enden von H1766 vorhergesagten Strukturen das gleiche IR2-IR5-StemLoop-Bild zeigen, wie die Strukturen, welche die 5'-NCR mit den vier Abweichungen zur H1766 Originalsequenz beinhalten (s. Abb. 54-55 und 60-73). Das zeigt, dass die vier Änderungen in der Sequenz für die Sekundärstrukturen nicht relevant waren.

6.3. Mögliche Rolle des CAA-Motivs in der NCR des BDV.

Beide BDV Enden zeigen spezifische CAA-*direct repeates (DR)*, die sich im konservierten Teil der Endsequenzen befinden (s. Abb. 14, 15). Man findet 5 CAA*repeates* im 3'-Ende der vRNS und 6 CAA-Wiederholungen am 3'-Ende der cRNS (s. Abb. 14 und 15). In meinen Strukturmodellen für die NCR-Sequenzen des BDV-Genoms (s. Abb. 54, 60-73) sind die DR*s* mit einem blauen Rahmen gekennzeichnet. In der Struktur S1 der vRNS (s. Abb. 60 und 61) sehr nahe zu den 3'- und 5'-Genomenden findet sich ein CAA/GUU-Paar.

Sowohl in dem Strukturvorschlag für die in den Experimenten verwendete Sequenz (s. Abb. 54) als auch in den mit P bezeichneten Strukturen (Vorschläge für die H1766-SequenzH1766) (s. Abb. 60-73) finden sich mehrere CAA/GUU-Paare in den kleinen Stems im 3'- und 5'-NCR und auch in den 3'-5'-Loops (s. Abb. 60-73).

Insgesamt stellt man fest, dass sich von fünfzehn CAA/GUU-DRs im Genom des Borna Virus neun in den beiden terminalen Hairpins der 3'- und 5'-Enden (IR2 und IR5) des Corcskrew-Modell finden. Drei davon in den Loopstrukturen der beiden Hairpins. Es ist wichtig zu bemerken, dass beide terminale Stem-Loops (IR2 und IR5) hochkonserviert sind. Am 3'-Ende zeigen die Stämme: V, H1766, He/80 und No/98 eine 100-prozentige Übereinstimmung. Ebenfalls am 5'-Ende, mit der Ausnahme eines As im 4. CAA-DR des Stamms No/98 (statt A in Position 2 steht da ein C: CAA/CCA) zeigen die Sequenzen eine 100% Übereinstimmung. Die hohe Konservierung der CAA-DRs und der IR2 und IR5 lässt vermuten, dass die terminalen Sequenzen und die CAA-Motive eine wichtige Rolle bei der Strukturbildung und eventuell bei der viralen Transkription und Replikation spielen. (CAA)_n-DRs kommen in der Leader-Sequenz der meisten Tobacco Mosaik Viren (TMV; positiv orientiertes RNS-Genom; Genus Tobamovirus) vor (Gallie et al., 1992). Zusammen mit den 3 Kopien von spezifischen "ACAAUUAC"-DRs machen diese Elemente insgesamt 72% der 68nt langen 5'-Leader-NCR-Sequenz des U1 TMV-Stamms aus. Die Kombination aus einer Kopie des "ACAAUUAC"-Directed Repeats mit einer 24 Basen langen (CAA)8-Sequenz wurde als grundlegendes regulatorisches Element der TMV-Translation und Replikation identifiziert (Gallie et al., 1992). Hierbei war das CAA-Element das entscheidende für die Translation und für die virale Replikation. Schon 2 von 8 Kopien der CAA-DR waren ausreichend um die Aktivität des Leaders zu steigern (Gallie et al., 1992). Das Oktamer-Motiv 5'-CAAACAAA, das den Nukleotiden 3-10 in der RNS des Masern Virus (Genus Morbilivirus, Familie Paramyxoviridae, Ordnung Mononegavirales) entspricht, ist bei den Paramyxoviren sehr verbreitet (Horiike et al., 1991) und befindet sich auch in der NCR des Plus-Stranges des Vesikular Stomatitis Virus (Genus Vesiculovirus, Familie Rhabdoviridae, Ordnung Mononegavirales) (Colonno et al., 1978).

Aufgrund der Tatsache, dass mindestens 13 der CAA-Motive (87%) in den Enden des BDV-Genoms hochkonserviert sind und solche Motive sich in den NCRs von weiteren Vertretern der MNV wieder finden, ist eine funktionelle Rolle dieser Motive bei dem viralen Vermehrungszyklus von Borna Virus nicht auszuschließen.

6.4. Mögliche Rolle der Pseudoknot-Strukturen in der NCR des BDV.

RNS-Pseudoknots sind Strukturen, die in der RNS-Welt weit verbreitet (Deogun et al., 2004; Dieman et al., 1997) und zum Teil unverzichtbar für die funktionelle RNS-Strukturen sind, z.B., bei der Transkription des viralen Genoms, wie bei dem satellite tobacco mosaik Virus oder Tobamovirus (einzellsträngiges RNS-Genom, positiv orientiert, Familie *Tobamovirus*) (Pleij, 1994).

Durch Messungen thermodynamischer Parameter einiger Pseudoknot-Modelle wurde gezeigt, dass diese Strukturen äußerst instabil sind und ihre Bildung sehr von Ionbedingungen abhängig ist (Wyatt et al., 1990; Theimer et al., 1998). Daher sind solche Strukturen sehr schlecht nachweisbar.

In dem Strukturvorschlag für die experimentelle Sequenz konnte ich eine mögliche Pseudoknot-Bindung finden (s. Abb. 74). Die UAA-Nukleotide des 2. Loops am 3'-Ende können mit den UUA-Nukleotiden des upstream-liegendes 3'-Ende interagieren (s. Abb. 74).

In den aufgeführten Vorschlägen für die H1766-Originalsequenz der 3'- und der 5'-NCR-Region konnte ich zwei mögliche Pseudoknot-Strukturen finden (s. Abb. 75, 76). Eine Pseudoknot-Struktur findet sich in der Struktur P1 (s. Abb. 75). Die UAA-Nukleotide des 2. Loops am 3'-Ende können mit den UUA-Nukleotiden des upstreamliegendes 3'-Ende interagieren (s. Abb. 75). Die zweite Bindung findet sich in der Struktur P2 zwischen CAA-Nukleotiden im Loop des IR2 und UUG-Nukleotiden des Loops in IR4 (s. Abb. 76).

Die in der Pseudoknotbildung beteiligte Sequenz in dem Strukturvorschlag P2 ist nur zu 50% konserviert (für die Stämme He/80 und No/98). Im Gegensatz dazu ist die Nukleotidsequenz, welche die Pseudoknotstruktur in Strukturmodell P3 bildet, hochkonserviert (ca. 80%). Ob die gefundenen möglichen Pseudoknots eventuell eine regulatorische Rolle in der viralen Transkription und/oder Replikation spielen muss sich zeigen.

Es ist interessant zu bemerken, dass die gefundene Pseudoknotbindung mit der Pseudoknotbindung in der Struktur P1 für H1766 übereinstimmt (s. Abb. 74, 75).



Abbildung 74: Pseudoknot-Struktur für die BDV-3´-und 5´-NCRs. Legende – s. Abb. 54.



Abbildung 75: Mögliche Pseudoknot-Bindung in der Struktur P1. (ist mit grauen Punktier -Linien dargestellt). Legende: s.Abb. 54.



Abbildung 76: Möglicher Pseudoknot in der Struktur P2. Die vorgeschlagene Struktur ist mit grau-punktier Linien dargestellt. Legende: s.Abb. 54.

6.5. Polyadenylierungssignal und Transkriptionsterminationssignal: die Positionierung in verschiedenen Strukturmodellen des 3´- und 5´-Enden.

Die Translationsterminationssignale im BDV-Genom besitzen zwei charakteristische Merkmale: eine Folge von Uridinresten in der transkribierten RNS und ein davor liegende GC-reiches IR, wobei beide Bereiche durch mehrere Nukleotide voneinander getrennt sein können (Modrow, 2003). Die Basenpaarungen zwischen den Uridinresten und den Adenosinresten sind im Vergleich zu den anderen Watson-Krick-Basenpaarungen instabil. Wenn ein selbstkomplemetärer RNS-Bereich synthetisiert wird, bilden die komplementären Sequenzen untereinander Basenpaare aus, sodass eine Haarnadelstruktur (Stem-Loop) entsteht. Wahrscheinlich führt dieses Stem-Loop dazu, dass die RNS-Polymerase die Transkription abbricht. Die beiden Strukturmerkmale ermöglichen vermutlich den Transkriptionsabbruch und die Freisetzung der mRNS aus dem Transkriptionskomplex (Modrow et al., 2003).

Die Poly-U-Sequenz in der Nähe des 5'-Ende der vRNS des Influenza Virus ist erforderlich für die Polyadenilierung der synthetisierten mRNS (Zheng et al., 1999). Die virale Polymerase des Influenza Virus benutzt den *Stuttering*-Mechanismus für die Synthese des Poly-A-Schwanzes (Zheng et al., 1999). Auch andere Vertreter der Mononegavirales, wie z.B., das Borna Virus synthetisieren wahrscheinlich den Poly-A-Schwanz durch Stottern der Polymerase am Poly(A)-Signal (Pringle et al., 1997). Bei den Orthomyxoviren besteht das Polyadenilierungssignal aus 5-7 Uridinresten, die sich 15-22nt entfernt von 5'-Ende der vRNS befinden (Li X., Palese P., 1994; Luo et al., 1991; Weber et al., 1996).

Bei den Borna Viren findet man in den Strukturmodellen P1, P2 und P4 ein Polyadenilierungssignal auch im Loop eines langen Stem-Loops. In den Modellen P3, P5 und P6 liegt das Polyadenilierungssignal im Stem eines Stem-Loops.

In unserem Strukturvorschlag (s. Abb. 54) findet sich das Polyadenilierungssignal im Loop eines langen Stem-Loops (s. Abb.54), was eine Rolle für das Stottern der Polymerase am Poly(A)-Signal spielen könnte.

7. Zusammenfassung.

Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Sekundärstruktur der nicht kodierenden Endbereiche (NCR) in der genomischen RNS des Virus der Bornaschen Krankheit (BDV) nachzuweisen und strukturell zu untersuchen.

Basierend auf der Primer Extention-Analyse konnte ich zwei unterschiedliche Strukturen für die 3'-NCR postulieren. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass alternative Faltungen von IR 1 und 2 möglich sind. In einer Struktur liegt das erste Nukleotid aus dem Startkodon ATG innerhalb des Stem-Loops, während es in der zweiten Struktur einzelsträngig vorhanden ist. Diese Flexibilität könnte für die Regulation der viralen Replikation und Transkription von Bedeutung sein. Denkbar sind alternative Strukturen für die Replikation und für die Transkription, die sich gegenseitig ausschließen. Das heißt, die Existenz von zwei möglichen alternativen Strukturen der 3'-NCR ließe sich funktionell mit einem Promotor erklären, der bei verschiedenen Bedingungen verschiedene Konformationen annimmt und entsprechend verschiedene Prozesse steuert.

Auch für das 5'-NCR konnte ich eine Struktur postulieren, auf der auch meine experimentelle Ergebnisse sehr gut passen. Da das 5'-Ende der cRNS als 3'-Promotor für die Synthese der vRNS funktioniert und es von der gleichen viralen Polymerase erkannt werden muss, die das 3'-Ende erkennt (als Promotor für die cDNS- Synthese) erscheint die Ähnlichkeit der Struktur beiden Enden (3' und 5') nahe liegend. Für die Erkennung des Promotors ist nicht nur die Struktur, sondern auch die Sequenz entscheidend. Wenn das 5'-Ende der vRNS zum 3'-Ende der cRNS wird, führt das zur Komplementarität der Sequenzen, schließt aber die anderen Strukturen nicht aus.

Für den Fall, dass die beiden Enden in einem Konstrukt zusammen sind, konnte ich eine *Panhandle*-Struktur postulieren. Beide Enden sind komplementär zueinander und bilden einen langen *Stem*. Die *Panhandle*-Konformation spielt eine wichtige Rolle beim Erkennungsprozess der viralen Polymerase (Modrow, 2003).

Aufgrund der weiteren Vorschläge für die 3'- und 5'-Enden des Borna Virus habe ich auch ein alternatives Modell entwickelt, das dem "*Corkskrew*"-Modell für Influenza

Viren ähnelt. In dieser Struktur hat jeweils das 3'- und das 5'-Ende einen terminalen Stem-Loop. Interessanterweise liegen die 3'- und 5'-*Stem-Loops* sich direkt gegenüber und stellen damit ein spezifisches *corcskrew*-Bild dar. Die folgende doppelsträngige Region vervollständigt das *corcskrew*-Modell.

Um festzustellen, welches Modell öfter Vorkommt, wird die Mutationsanalyse benötigt, was mir nicht möglich war, da es zu dieser Zeit noch kein Reverses Genetiksystem für BDV existiert, das gut in Praxis funktionierte.

Ich habe eine grundsätzliche Strukturanalyse für die Sekundärstruktur der Sequenz des BDV-Stammes H1766 durchgeführt und aufgrund der Analyse mehrere Vorschläge für die Sekundärstruktur der nicht kodierenden Bereiche und des ganzen Genoms entwickelt.

Im Laufe dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass konservierte "Inverted Repeat"(IR)-Sequenzen *in vitro* zur Bildung von spezifischen Sekundärstrukturen führen, welche eine funktionelle Bedeutung bei der Replikation/ Transkription des BDV-Genoms haben könnten. Diese ähneln den Strukturvorschlägen für die Genomenden der Influenza Viren, die ebenfalls ein Einzelstrang RNS Genom mit negativer Polarität besitzen, welches in beiden Fällen im Kern der infizierten Zelle repliziert/transkribiert wird. Diese Gemeinsamkeit unterscheidet die *Orthomyxoviridae* und *Bornaviridae* von allen anderen RNS-Viren die im Zytoplasma replizieren. Daher können diese analogen Strukturen funktionelle Gemeinsamkeiten widerspiegeln, die sich aufgrund der Replikationsstrategie diesen Viren ergeben. Zukünftige Analysen werden helfen dieses Bild zu vervollständigen und unsere Kenntnisse über die molekularen Bedingungen für die Replikation von BDV erweitern.

8. Literaturverzeichnis.

Amsterdam, J. D., Winokur, A., Dyson, W., Herzog, S., Gonzales, F., Rott, R., Koprowski, H. (1985). Borna disease virus. A possible etiologic factor in human affective disorders. Arch Gen Psychiatry *42*, 1093-1096.

Becht, H. u. J. R. (1996). Borna Disease Pages. Virus Infections of Vertebrates, 235-244.

Becht, H. u. J. R. (1996). Virus Infections of Vertebrates. Borna Disease Pages, 235-244.

Bechter, K., Herzog, S., Schüttler, R. (1992). Possible significance of Borna disease for humans. Vertabrates Elsevier, Amsterdam, 235-244.

Bilzer, T., Planz, O., Lipkin, W. I., and Stitz, L. (1995). Presence of CD4+ and CD8+ T cells and expression of MHC class I and MHC class II antigen in horses with Borna disease virus-induced encephalitis. Brain Pathol *5*, 223-230.

Bode, L. (1995). Human infections with Borna disease virus and potential pathogenic implications. Curr Top Microbiol Immunol 190, 103-130.

Bode, L., Durrwald, R., and Ludwig, H. (1994). Borna virus infections in cattle associated with fatal neurological disease. Vet Rec 135, 283-284.

Bode, L., Ferszt, R., and Czech, G. (1993). Borna disease virus infection and affective disorders in man. Arch Virol Suppl 7, 159-167.

Bode, L., Riegel, S., Lange, W., and Ludwig, H. (1992). Human infections with Borna disease virus: seroprevalence in patients with chronic diseases and healthy individuals. J Med Virol *36*, 309-315.

Bode, L., Steinbach, F., and Ludwig, H. (1994). A novel marker for Borna disease virus infection. Lancet 343, 297-298.

Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F., and Ludwig, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients. Nat Med 1, 232-236.

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

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

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

Caplazi, P., Waldvogel, A., Stitz, L., Braun, U., and Ehrensperger, F. (1994). Borna disease in naturally infected cattle. J Comp Pathol 111, 65-72.

CR, P. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. Arch Virol 11, 2251-2256.

CR, P. (1999). Virus taxonomy - 1999. The universal system of virus taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. Arch Virol 2, 421-429.

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

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

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

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

Danner, K. (1982). Borna-Virus und Borna-Infektionen. Vom Miasma zum Modell. Enke-Verlag, Stuttgart.

Danner, K. (1982). Borna-Virus und Borna-Infektionen. Von Miasma zum Modell. (Stuttgart: Enke-Verlag).

Danner, K., and Mayr, A. (1979). In vitro studies on Borna virus. II. Properties of the virus. Arch Virol 61, 261-271.

De La Torre, J. C., Gonzalez-Dunia, D., Cubitt, B., Mallory, M., Mueller-Lantzsch, N., Grasser, F. A., Hansen, L. A., and Masliah, E. (1996). Detection of borna disease virus antigen and RNA in human autopsy brain samples from neuropsychiatric patients. Virology 223, 272-282.

Dildine, S. L., and Semler, B. L. (1992). Conservation of RNA-protein interactions among picornaviruses. J Virol 66, 4364-4376.

Duchala, C. S., Carbone, K. M., and Narayan, O. (1989). Preliminary studies on the biology of Borna disease virus. J Gen Virol 70 (Pt 12), 3507-3511.

Dürrwald, R. (1993). Die natürliche Borna-Virus-Infektion der Einhufer und Schafe. Untersuchungen, zu neueren diagnostischen Methoden (ELISA, PCR) und zur Antikörperkinetik bei Pferden nach Vakzination mit Lebendimpfstoff. VetMedDiss, FU Berlin.

Dürrwald, R. (1993). Die natürliche Borna Virus Infektion der Einhufer und Schafe (Berlin: Vet. Med. Diss.).

Elford, W. J., Galloway, I.A. (1993). Filtration of the virus of Borna disease through graded collodion membranes. British Journal of Experimental Pathology 14, 196.

Flick, R., and Hobom, G. (1999). Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. J Gen Virol *80*, 2565-2572.

Flüß, M. (2002). Ein Beitrag zur Epidemiologie der Bornaschen Krankheit (Dissertation). InstfVirologie im FB Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität.

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*, 4012-4019.

Fu, Z. F., Weihe, E., Zheng, Y. M., Schafer, M. K., Sheng, H., Corisdeo, S., Rauscher, F. J., 3rd, Koprowski, H., and Dietzschold, B. (1993). Differential effects of rabies and borna disease viruses on immediate-early- and late-response gene expression in brain tissues. J Virol 67, 6674-6681.

Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F. B., Ando, T., and Oya, A. (1994). Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. Biochem Biophys Res Commun *199*, 425-432.

Gellert, M. (1995). ["In the beginning the horse is sad"--a historical abstract of Borna disease]. Tierarztl Prax 23, 207-216.

Haller, A. A., and Semler, B. L. (1995). Stem-loop structure synergy in binding cellular proteins to the 5' noncoding region of poliovirus RNA. Virology 206, 923-934.

Hatalski, C. G., Lewis, A. J., and Lipkin, W. I. (1997). Borna disease. Emerg Infect Dis 3, 129-135.

Heaton, L. A., Zuidema, D., Jackson, A.O. (1987). Structure of the M2 protein gene of sonchus yellow net virus. Virology, 234-241.

Heinig, A. (1969). Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe, In Handbuch der Viruskrankheiten der Tiere, H. Röhrer, ed. (Jena: Fischer Verlag), pp. 83.

Heinig, A. (1969). Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe. In HRöhrer, ed Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren Fischer, Jena, 83-148.

Heinig, A. (1969). Die Bornasche Krankheit der Pferde und Schafe., In Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren, H. Röhrer, ed. (Jena: Fischer), pp. 83-148.

Herzog, S., Frese, K., Richt, J. A., and Rott, R. (1994). Ein Betrag zur Epizootiologie der Bornaschen Krankheit der Pferde. Wien Tietärztl Mschr *81*, 374-379.

Herzog, S., Kompter, C., Frese, K., and Rott, R. (1984). Replication of Borna disease virus in rats: agedependent differences in tissue distribution. Med Microbiol Immunol (Berl) *173*, 171-177.

Herzog, S., Wonigeit, K., Frese, K., Hedrich, H. J., and Rott, R. (1985). Effect of Borna disease virus infection on athymic rats. J Gen Virol *66 (Pt 3)*, 503-508.

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.

Imbert, I., Dimitrova, M., Kien, F., Kieny, M. P., and Schuster, C. (2003). Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. J Gen Virol *84*, 1549-1557.

Iwahashi, K., Watanabe, M., Nakamura, K., Suwaki, H., Nakaya, T., Nakamura, Y., Takahashi, H., and Ikuta, K. (1997). Clinical investigation of the relationship between Borna disease virus (BDV) infection and schizophrenia in 67 patients in Japan. Acta Psychiatr Scand *96*, 412-415.

Joest, E. K., and Degen, K. (1911). Untersuchungen über die pathologische Histologie, Pathogenese und postmortale Diagnose der seuchenhaften Gehirnrückenmarksentzündung (BK) des Pferdes. Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere *9*, 1-98.

Kao, M., Namis, A. N., Rupprecht, C. E., Fu, Z. E., Shankar, V., Koprowski, H., and Dietzschold, B. (1993). Detektion of serum antibodies against Borna disease virus in sera and cerebrospinal fluid of horses in the USA. Vet Rec *132*, 241-244.

Kishi, M., Nakaya, T., Nakamura, Y., Kakinuma, M., Takahashi, T. A., Sekiguchi, S., Uchikawa, M., Tadokoro, K., Ikeda, K., and Ikuta, K. (1995). Prevalence of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from blood donors. Med Microbiol Immunol (Berl) *184*, 135-138.

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

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

Lange, H., Herzog, S., Herbst, W., and Schliesser, T. (1987). Seroepidemiologische Untersuchungen zur Bornaschen Krankheit (Ansteckende Gehirnn- und Rückenmarkentzündung) der Pferde. Tierärztl Umsch *12*, 938-946.

Legay, V., Sailleau, C., Dauphin, G., and Zientara, S. (2000). Construction of an internal standard used in RT nested PCR for Borna Disease Virus RNA detection in biological samples. Vet Res *31*, 565-572.

Li, M. L., Ramirez, B. C., and Krug, R. M. (1998). RNA-dependent activation of primer RNA production by influenza virus polymerase: different regions of the same protein subunit constitute the two required RNA-binding sites. Embo J *17*, 5844-5852.

Lieb, K., Hallensleben, W., Czygan, M., Stitz, L., and Staeheli, P. (1997). No Borna disease virus-specific RNA detected in blood from psychiatric patients in different regions of Germany. The Bornavirus Study Group. Lancet *350*, 1002.

Lipkin, W. I., Travis, G. H., Carbone, K. M., and Wilson, M. C. (1990). Isolation and characterization of Borna disease agent cDNA clones. Proc Natl Acad Sci U S A 87, 4184-4188.

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

Lundgren, A. L., Czech, G., Bode, L., and Ludwig, H. (1993). Natural Borna disease in domestic animals others than horses and sheep. Zentralbl Veterinarmed B *40*, 298-303.

Lundgren, A. L., Lindberg, R., Ludwig, H., and Gosztonyi, G. (1995). Immunoreactivity of the central nervous system in cats with a Borna disease-like meningoencephalomyelitis (staggering disease). Acta Neuropathol (Berl) *90*, 184-193.

Lundgren, A. L., Zimmermann, W., Bode, L., Czech, G., Gosztonyi, G., Lindberg, R., and Ludwig, H. (1995). Staggering disease in cats: isolation and characterization of the feline Borna disease virus. J Gen Virol 76 (*Pt 9*), 2215-2222.

Mayr, A. (1972). Borna virus: a new model for slow virus research. Ann Inst Pasteur (Paris) 123, 545-552.

Mayr, A., and Danner, K. (1972). Production of Borna virus in tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med 140, 511-515.

Metzler, A., Minder, H. P., Wegmann, C., and Zindel, W. (1979). Die Bornasche Krankheit, ein veterinärmedizinisches Problem von regionaler Bedeutung. Schweiz Arch Tierheilk *121*, 207-211.

Nakamura, Y., Kishi, M., Nakaya, T., Asahi, S., Tanaka, H., Sentsui, H., Ikeda, K., and Ikuta, K. (1995). Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells from healthy horses in Japan. Vaccine *13*, 1076-1079.

Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., and Rott, R. (1983). Behavioral disease in rats caused by immunopathological responses to persistent borna virus in the brain. Science 220, 1401-1403.

Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., and Rott, R. (1983). Pathogenesis of Borna disease in rats: immune-mediated viral ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioral abnormalities. J Infect Dis *148*, 305-315.

Narayan, O., Herzog, S., Frese, K., Scheefers, H., und Rott, R. (1983). Borna disease in rats: immune modulation of viral encephalitis resulting in changes of behaviour. L'Igiene Moderna *80*, 995.

Nicolau, O., Galloway, I.A. (1928). Borna disease and enzootic encephalomyelitis of sheep and cattle. Privy Counc Med Res Counc Spec Rep Ser 121, 7.

Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C. O., Suchy, A., Staeheli, P., and Schwemmle, M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. J Virol 74, 5655-5658.

Nowotny, N., and Weissenbock, H. (1995). Description of feline nonsuppurative meningoencephalomyelitis ("staggering disease") and studies of its etiology. J Clin Microbiol *33*, 1668-1669.

Ochs, K., Saleh, L., Bassili, G., Sonntag, V. H., Zeller, A., and Niepmann, M. (2002). Interaction of translation initiation factor eIF4B with the poliovirus internal ribosome entry site. J Virol 76, 2113-2122.

Peeples, M. E., and Collins, P. L. (2000). Mutations in the 5' trailer region of a respiratory syncytial virus minigenome which limit RNA replication to one step. J Virol 74, 146-155.

Planz, O., Bilzer, T., and Stitz, L. (1995). Immunopathogenic role of T-cell subsets in Borna disease virus-induced progressive encephalitis. J Virol 69, 896-903.

Planz, O., Rziha, H. J., and Stitz, L. (2000). Bornavirus isolates of human origin. Lancet 355, 656-657.

Pleschka, S., Staeheli, P., Kolodziejek, J., Richt, J. A., Nowotny, N., and Schwemmle, M. (2001). Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. J Gen Virol *82*, 2681-2690.

Pleschka, S., Staeheli, P., Kolodziejek, J., Richt, J. A., Nowotny, N., and Schwemmle, M. (2001). Conservation of coding potential and terminal sequences in four different isolates of Borna disease virus. J Gen Virol *82*, 2681-2690.

Pringle, C. R. (1996). Virus taxonomy 1996 - a bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. Arch Virol 11, 2251-2256.

Pringle, C. R. (1999). Virus Taxonomy - 1999

The Universal System of Virus Taxonomy, updated to include the new proposals ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses during 1998. Arch Virol 144, 421-429.
Richt, J. A., Alexander, R. C., Herzog, S., Hooper, D. C., Kean, R., Spitsin, S., Bechter, K., Schuttler, R., Feldmann, H., Heiske, A., *et al.* (1997). Failure to detect Borna disease virus infection in peripheral blood leukocytes from humans with psychiatric disorders. J Neurovirol *3*, 174-178.

Richt, J. A., Alexander, R. C., Herzog, S., Hooper, D. C., Kean, R., Spitsin, S., Bechter, K., Schuttler, R., Feldmann, H., Heiske, A., *et al.* (1997). Failure to detect Borna disease virus infection in peripheral blood leukocytes from humans with psychiatric disorders. J Neurovirol *3*, 174-178.

Richt, J. A., Clements, J. E., Herzog, S., Pyper, J. M., Wahn, K., and Becht, H. (1993). Analysis of virusspecific RNA species and proteins in Freon-113 preparations of the Borna disease virus. Med Mikrobiol Immunol *182*, 271.

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

Richt, J. A., Herzog, S., Haberzettl, K., and Rott, R. (1993). Demonstration of Borna disease virusspecific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. Med Microbiol Immunol (Berl) *182*, 293-304.

Richt, J. A., Herzog, S., Schmeel, A., Frese, K., Clements, J. E., and Rott, R. (1995). Current knowledge about Borna disease and its causative agent, In Equine infectious diseases, H. Nakajima, and W. Plowright, eds. (Newmarket: R. and W. Publications Ltd.).

Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., and Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. Emerg Infect Dis *3*, 343-352.

Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., and Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. Emerg Infect Dis *3*, 343-352.

Richt, J. A., and Rott, R. (2001). Borna disease virus: a mystery as an emerging zoonotic pathogen. Vet J *161*, 24-40.

Richt, J. A., VandeWoude, S., Zink, M. C., Clements, J. E., Herzog, S., Stitz, L., Rott, R., and Narayan, O. (1992). Infection with Borna disease virus: molecular and immunobiological characterization of the agent. Clin Infect Dis *14*, 1240-1250.

Rott, R., and Becht, H. (1995). Natural and experimental Borna disease in animals. Curr Top Microbiol Immunol 190, 17-30.

Rott, R., Herzog, S., Fleischer, B., Winokur, A., Amsterdam, J., Dyson, W., and Koprowski, H. (1985). Detection of serum antibodies to Borna disease virus in patients with psychiatric disorders. Science 228, 755-756.

Rott, R., Herzog, S., Richt, J., and Stitz, L. (1988). Immune-mediated pathogenesis of Borna disease. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A] 270, 295-301.

Sauder, C., Muller, A., Cubitt, B., Mayer, J., Steinmetz, J., Trabert, W., Ziegler, B., Wanke, K., Mueller-Lantzsch, N., de la Torre, J. C., and Grasser, F. A. (1996). Detection of Borna disease virus (BDV) antibodies and BDV RNA in psychiatric patients: evidence for high sequence conservation of human blood-derived BDV RNA. J Virol 70, 7713-7724.

Schneemann, A., Schneider, P. A., Lamb, R. A., and Lipkin, W. I. (1995). The remarkable coding strategy of borna disease virus: a new member of the nonsegmented negative strand RNA viruses. Virology 210, 1-8.

Schneemann, A., Schneider, P. A., and Lipkin, W. I. (1995). The atypical strategies used for gene expression of Borna disease virus, a nonsegmented, negative-strand RNA virus. Uirusu 45, 165-174.

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

Stitz, L., and Rott, R. (1994). Borna disease virus, In Encyclopaedia of Virology, pp. 149-154.

Stitz, L., Soeder, D., Deschl, U., Frese, K., and Rott, R. (1989). Inhibition of immune-mediated meningoencephalitis in persistently Borna disease virus-infected rats by cyclosporine A. J Immunol *143*, 4250-4256.

Todd, S., and Semler, B. L. (1996). Structure-infectivity analysis of the human rhinovirus genomic RNA 3' non-coding region. Nucleic Acids Res 24, 2133-2142.

Tucker, T. J., Smuts, H., Eickhaus, P., Robson, S. C., and Kirsch, R. E. (1999). Molecular characterization of the 5' non-coding region of South African GBV-C/HGV isolates: major deletion and evidence for a fourth genotype. J Med Virol *59*, 52-59.

VandeWoude, S., Richt, J. A., Zink, M. C., Rott, R., Narayan, O., and Clements, J. E. (1990). A borna virus cDNA encoding a protein recognized by antibodies in humans with behavioral diseases. Science 250, 1278-1281.

Waltrip, R. W., 2nd, Buchanan, R. W., Summerfelt, A., Breier, A., Carpenter, W. T., Jr., Bryant, N. L., Rubin, S. A., and Carbone, K. M. (1995). Borna disease virus and schizophrenia. Psychiatry Res 56, 33-44.

Wang, C., Le, S. Y., Ali, N., and Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. Rna *1*, 526-537.

Yu, H., Isken, O., Grassmann, C. W., and Behrens, S. E. (2000). A stem-loop motif formed by the immediate 5' terminus of the bovine viral diarrhea virus genome modulates translation as well as replication of the viral RNA. J Virol 74, 5825-5835.

Zimmermann, W., Breter, H., Rudolph, M., and Ludwig, H. (1994). Borna disease virus: immunoelectron microscopic characterization of cell-free virus and further information about the genome. J Virol *68*, 6755-6758.

Zimmermann, W., Durrwald, R., and Ludwig, H. (1994). Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction. J Virol Methods *46*, 133-143.

Zuev, V. A. (1977). [Slow infections: development of the problem and classification of the agents]. Vestn Akad Med Nauk SSSR, 78-83.

Zwick, W. (1939). Bornasche Krankheit und Encephalomyelitis der Tiere, In Handbuch der Viruskrankheiten (Jena: G.Fischer Verlag), pp. 252-354.

Zwick, W. (1939). Bornasche Krankheit und Enzephalomyelitis der Tiere, In Handbuch der Viruskrankheiten, E. Gildenmeister, E. Haagen, and O. Waldmann, eds. (Jena: Fischer), pp. 254-354.

Zwick, W., Seifried, O., and Witte, J. (1927). Experimentelle Untersuchungen über die seuchenhafte Gehirn- und Rückenmarksentzündung der Pferde (Bornasche Krankheit). Zeitschrift für Infektionskrankheiten, Parasitäre Krankheiten und Hygiene der Haustiere *30*, 42-136.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen der Arbeit, die anderen Quellen im Wortlaut oder Sinn entnommen wurden, sind durch Angaben der Herkunft kenntlich gemacht.

Gießen, Januar 2007

Lebenslauf

Name:	Maria Pancratius, geb. Schmidt/Chmidt
Geburtsdatum:	29.01.1978
Geburtsort:	Kasan, Russland
Ausbildung:	
09/85-05/95:	Allgemeinbildende Mittelschule Nr. 101, Kasan, Russland
07/95:	Abitur
09/95-09/00:	Studium an der Fakultät der Biologie der Universität Kasan, Russland (Schwerpunkt – Mikrobiologie)
04/00-08/00:	Diplomarbeit im Institut für Hygiene und Umweltmedizin (RWTH Aachen)
09/00:	Abschlussprüfung. Diplom mit Auszeichnung. Abschlussnote: sehr gut
04/01–08/04:	Promotion an der Uni Giessen, Institut für Med. Virologie; Graduiertenkolleg "Biochemie von Nukleoprotein- komplexen"
Seit 11/04 -	Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Anatomie und Zellbiologie der JLU Giessen, AG Signaltransduktion

Gießen, Januar 2007

Danksagung

Viele Menschen sind dafür verantwortlich, dass ich meine Doktorarbeit in Deutschland angefangen und erfolgreich beendet habe. Hiermit möchte ich mich bei allen herzlich bedanken:

Frau Prof. Dr. O.Iljinskaja (Abt. Mikrobiologie, Fakultät der Biologie, Universität Kasan, Russland), meine ehemalige Betreuerin in Russland, knüpfte Kontakte zu Wissenschaftlern in Gießen. Sie half mir bei meinen ersten Schritten in der Wissenschaft und gab mir genug Selbstvertrauen, um mich nach Deutschland für die Diplom- und Doktorarbeit zu bewerben.

Herr Dr. A. Eisenträger (Institut für Hygiene und Umweltmedizin, RWTH Aachen) akzeptierte meine Bewerbung und gab mir die Möglichkeit, hier in Deutschland meine Diplomarbeit anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. S.Pleschka (Institut für Med. Virologie, JLU Giessen) für den Vorschlag des interessanten Themas dieser Arbeit und auch für die Möglichkeit, mich weiter zu entwickeln. Ich bedanke mich für den Arbeitsteamgeist, mit dem er uns alle angesteckt hat, für die kritisch-konstruktiven Gespräche und dafür, dass er immer ein Ansprechpartner war und mir mit Tat und Rat zur Seite stand. Auch für sein immerwährendes Bemühen, diese Arbeit zum Gelingen zu führen, bedanke ich mich herzlich.

Herrn Prof. W.Gehrlich (Institut für Med. Virologie) und Herrn Prof. H.-J- Thiel (Institut für Veterinär Virologie) danke ich für die freundliche Aufnahme in das Institut.

Frau Prof. G.Klug (Institut für Molekulare und Mikrobiologie, JLU Giessen) danke ich für die Möglichkeit, in ihrem Institut ein 4-monatiges Praktikum zu machen um die Primer Extention- Methode kennen zu lernen.

Bei Frau Dr. S.Jäger möchte ich mich herzlich für die investierte Zeit, sorgfältige Hilfe und für die wertvollen Anweisungen zur Methode bedanken. Es hat wirklich doch noch funktioniert!

Der Deutschen Forschungsgesellschaft und dem Graduiertenkolleg "Biochemie von Nukleoproteinkomplexen" gilt mein Dank für die Unterstützung im Rahmen eines Doktorandenstipendiums. Herrn Prof. Pingoud (Institut für Biochemie, JLU Giessen; Graduiertenkolleg "Biochemie von Nukleoproteinkomplexen") danke ich für die Durchsicht des Manuskripts und für sein ständiges Interesse an den Studentenseminaren im Rahmen des Graduiertenkollegs.

Frau Dr. J.Michel (Institut für Biochemie, JLU Giessen; Graduiertenkolleg "Biochemie von Nukleoproteinkomplexen"). Für ihre tolle Betreuung im Graduiertenkolleg, ihre volle Hilfsbereitschaft und für ihre Gabe, in einer auswegslosen Situation immer noch eine Lösung zu finden, bedanke ich mich herzlich.

Herrn Prof. R.Middendorff (Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU Giessen) danke ich für die großzügige Möglichkeit, während meines Dienstes im Institut an der Doktorarbeit zu wirken.

Frau Katharina Wagner und Herrn Dr. Hans-Dieter Müller (Institut für Anatomie und Zellbiologie, JLU Giessen) gilt mein Dank für die sorgfältige orthographische Kontrolle des Manuskripts. Vielen Dank!

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Virologie für ihre Hilfsbereitschaft, Rat und Tat bedanken.

Besonderen Dank an Wenjun, Julia, Henju und Sandra für die schöne Arbeitsatmosphäre in 407/405 und für die grosse Hilfe im Laboralltag.

Nelli, Jurij, Katja Kuchmina und den zwei Ullis – danke für alles!

Vielen Dank an meine Familie: allen meinen Eltern (Ludmila, Sascha; Henny und Arnold), allen Geschwistern, Oma Nastja, Opa Reinhold und besonders meinem Mann Arno.

Ohne eure Unterstützung hätte ich es nicht soweit gebracht. Habt vielen Dank dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt und mir zur Seite standet. Betrachtet diese Arbeit auch als euren Erfolg. Ich danke euch.

Maria Pancratius

Gießen, Januar 2007