

Aus dem Institut für Virologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Till Rügenapf

Funktionelle Charakterisierung der pestiviralen
Ribonuklease E^{ms}

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
YVONNE HAUSMANN
Tierärztin aus Grünberg

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. T. Rümenapf

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. Pingoud

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Februar 2003

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Prof. Dr. Till Rügenapf im Institut für Virologie des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen angefertigt. Die Arbeit wurde als Projekt sowohl im Graduiertenkolleg „Biochemie von Nukleoproteinkomplexen“ als auch im Sonderforschungsbereich 535 „Invasionsmechanismen und Replikationsstrategien von Krankheitserregern“ durch die DFG gefördert.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei:

Prof. Dr. Till Rügenapf für die wissenschaftliche Betreuung, die interessante Fragestellung, die große Diskussionsbereitschaft und die nette Atmosphäre in unserer Arbeitsgruppe,

Prof. Dr. Heinz-Jürgen Thiel für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können und die Diskussionsbereitschaft,

Prof. Dr. Alfred Pingoud für die nette Betreuung innerhalb des Graduiertenkollegs sowie die Diskussionsbereitschaft,

Manuela Heimann und Karin Müller für viele Tipps und Tricks und ihre Unterstützung bei meiner Arbeit,

Anke Himmelreich, Thomas Krey, Karin Maurer und Kristina Kluge für die nette Zusammenarbeit,

all den anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für ihre freundliche Hilfsbereitschaft,

Dr. Markus Sauerborn für die gute Zusammenarbeit,

meinen Eltern für die Unterstützung,

und bei Markus!

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	9
<u>1.1 KLASIFIZIERUNG DES VIRUS DER KLASSISCHEN SCHWEINEPEST IN DAS GENUS PESTIVIRUS</u>	9
<u>1.2 GENOMORGANISATION DER PESTIVIREN</u>	10
<u>1.3 E^{RNS} (E= ENVELOPE; RNS= „RIBONUCLEASE SECRETED“)</u>	13
<u>1.4 RIBONUKLEASE-AKTIVITÄT DES E^{RNS}</u>	14
<u>1.5 ZIELSETZUNG DER ARBEIT</u>	21
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	23
<u>2.1 MATERIAL</u>	23
<u>2.1.1 Chemikalien</u>	23
<u>2.1.2 Auftragspuffer</u>	24
<u>2.1.3 eukaryontische Zelllinien</u>	25
<u>2.1.4 prokaryontische Zellen</u>	25
<u>2.1.5 Enzyme</u>	25
<u>2.1.6 vorgefertigte Systeme (Kits)</u>	26
<u>2.1.7 radioaktiv markierte Nukleotide</u>	26
<u>2.1.8 Plasmide</u>	26
<u>2.1.9 Oligonukleotide</u>	27
<u>2.1.10 Antikörper</u>	28
<u>2.1.11 Verbrauchsmaterialien</u>	29
<u>2.1.12 Geräte</u>	29
<u>2.1.13 spezielle Computerprogramme</u>	30
<u>2.2 METHODEN</u>	32
<u>2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen</u>	32
<u>2.2.1.1 Medien und Puffer</u>	32
<u>2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten</u>	33
<u>2.2.1.3 Transfektion von DNA in PK 15- und BHK 21-Zellen bzw. von RNA in Sk 6-Zellen</u>	33
<u>2.2.1.4 Wachstumskurven</u>	34
<u>2.2.1.5 Titration zur Bestimmung des Virustiters</u>	35
<u>2.2.1.6 Indirekter immunhistochemischer Nachweis</u>	36
<u>2.2.1.7 Sandwich-ELISA</u>	36
<u>2.2.1.8 Zellyse</u>	38
<u>2.2.1.9 SDS-PAGE nach Laemmli</u>	38
<u>2.2.1.10 Immunoblot-Analyse von Proteinen (western blot)</u>	39
<u>2.2.2 Proteinexpression in Bakulovirussystem und Proteinaufreinigung</u>	40
<u>2.2.2.1 Medien und Puffer</u>	40
<u>2.2.2.2 Anzucht von SF 21-Zellen</u>	41
<u>2.2.2.3 Infektion von Zellen</u>	42
<u>2.2.2.4 Extraktion von E^{ms} aus SF 21-Zellen</u>	42
<u>2.2.2.5 Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)</u>	42
<u>2.2.2.6 Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose</u>	43
<u>2.2.2.7 Reinigung des rekombinanten E^{ms}</u>	44
<u>2.2.2.8 Konzentrierung des E^{ms}</u>	44
<u>2.2.2.9 BCA Proteinbestimmung</u>	44
<u>2.2.3 Molekularbiologische Methoden</u>	45
<u>2.2.3.1 Anzucht von Bakterien</u>	45

2.2.3.2 Plasmidisolierung	45
Minipräparation (Macherey & Nagel)	45
Midipräparation (Macherey & Nagel)	46
2.2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien	47
2.2.3.4 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	47
2.2.3.5 Phenol/Chloroform Extraktion von DNA	48
2.2.3.6 Ethanolpräzipitation von DNA und RNA	48
2.2.3.7 Isopropanolpräzipitation von DNA	48
2.2.3.8 Quantifizierung von DNA-/RNA-Proben	49
2.2.3.9 Restriktionsspaltung von DNA	49
2.2.3.10 Dephosphorylierung von DNA/RNA	50
2.2.3.11 DNA- bzw. RNA-Agarose-Gelelektrophorese	50
2.2.3.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	51
2.2.3.13 Ligation von DNA-Fragmenten	51
2.2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	52
2.2.3.15 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „<i>QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis</i>“	53
2.2.3.16 Sequenzierung von DNA	54
Sequenzierung von DNA mittels „<i>Cycle-Sequencing</i>“ mit Fluoreszenzfarbstoff-	
markiertem Primer	55
Radioaktive Sequenzierung	55
2.2.3.17 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen	56
Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 L Sequenziergerät	56
PAA-Sequenzgele und PAA-Gele	57
2.2.4 RNA-Methoden	59
2.2.4.1 <i>in vitro</i> Transkription	59
2.2.4.2 Radioaktive Markierung von RNA-Molekülen an deren 5'-Ende	61
2.2.4.3 Abtrennen von nicht eingebauten Nukleotiden mit Hilfe von G 15-Sephadex-	
Säulen	61
2.2.4.4 Aufreinigung von <i>in vitro</i> Transkripten mit Hilfe des „<i>RNeasy™ Total RNA Kits</i>“	62
2.2.4.5 Aufreinigung von <i>in vitro</i> Transkripten über PAA-Gele	62
2.2.5 Nachweis radioaktiver Reaktionsprodukte	63
2.2.5.1 Messung der Radioaktivität von <i>in vitro</i> Transkripten	63
Bestimmung der RNA-Konzentration anhand der eingebauten Radioaktivität	63
2.2.5.2 Autoradiographie	63
2.2.5.3 Phosphorimaging	63
2.2.6 Bestimmung der RNase-Aktivität	64
2.2.6.1 limitierender Verdau	64
2.2.6.2 Degradationstest	66
Spaltspezifität	67
Bestimmung der Enzymkinetik (K_m und v_{max})	67
Mutagenesestudien der RNase E^{rns}	69
2.2.6.3 RNase-Assay	69
2.2.7 Klonierungen	70
2.2.7.1 Synthese der RNA-Substrate <i>Sub-AGC</i>, <i>Sub-ApU</i>, <i>Sub-CpU</i>, <i>Sub-GpU</i> und	
 <i>Sub-UpU</i>	70
2.2.7.2 Klonierungsstrategie der E^{rns}-Deletionsmutanten	71
2.2.7.3 Mutation von N-Glykosylierungsstellen	72
2.2.7.4 Synthese von zwölf Gesamtklonen inklusive mutierter N-	
 Glykosylierungsstellen	72

<u>2.2.8 Proteinmodellierung</u>	73
<u>3. ERGEBNISSE</u>	75
A) <u>BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER RIBONUKLEASE E^{RNS}</u>	75
<u>3.1 Substratspezifität</u>	75
<u>3.1.1 Bestimmung der Spaltspezifität von E^{RNS} im limitierenden Verdau</u>	75
<u>3.1.2 Charakterisierung der NpU Spaltstelle</u>	79
<u>3.1.3 Bestimmung der Enzymkinetik mit definierten NpU Substraten</u>	87
B) <u>STRUKTURELL/FUNKTIONELLE CHARAKTERISIERUNG DER RIBONUKLEASE E^{RNS}</u>	97
<u>3.2 Mutagenesestudien der RNase E^{RNS}</u>	97
<u>3.2.1 Mutagenesestudien des aktiven Zentrums in Anlehnung an RNase Rh</u>	97
<u>3.2.2 Modell der Ribonuklease E^{RNS}</u>	104
<u>3.2.3 Experimentelle Bestimmung der minimalen Ribonukleasedomäne</u>	109
<u>3.3 Deletion von N-Glykosylierungsstellen</u>	113
<u>3.3.1 Einfluss von N-Glykosylierung auf die Ribonukleasefunktion</u>	114
<u>3.3.2 Einfluss von N-Glykosylierung auf das Viruswachstum</u>	123
<u>4 DISKUSSION</u>	130
<u>4.1 SUBSTRATSPEZIFITÄT DER RIBONUKLEASE E^{RNS}</u>	130
<u>4.2 MUTAGENESESTUDIEN DER RNASE E^{RNS}</u>	134
<u>4.2.1 aktives Zentrum</u>	134
<u>4.2.2 minimale Ribonuklease</u>	138
<u>4.3 EINFLUSS VON N-GLYKOSYLIERUNG AUF DIE RIBONUKLEASEFUNKTION UND DAS</u> <u>VIRUSWACHSTUM IN ZELLKULTUR</u>	140
<u>4.4 FAZIT</u>	145
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	146
<u>6 SUMMARY</u>	147
<u>7 LITERATURVERZEICHNIS</u>	148

Abkürzungen

aa	„amino acids“-Aminosäuren
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BDV	„Border Disease“ Virus
BSA	bovines Serumalbumin
BVDV	Virus der bovinen Virusdiarrhoe
°C	Grad Celsius
cDNA/cRNA	komplementäre DNA/RNA
Ci	Curie
CIAP	Alkalische Phosphatase „ <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> “
cpm	counts per minute
C-terminal	carboxyterminal
C-Terminus	Carboxyterminus
CTP	Cytosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
defiz.	defizient
Dulbecco's MEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherischia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
ES-Komplex	Enzym-Substrat Komplex
f	femto
ffU	“focus forming Units” (Zellareale, die, da sie virales Antigen enthalten, spezifisch angefärbt wurden)
Fa.	Firma
FKS	foetales Kälberserum
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde
IgG	Immunglobulin G
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
Km	Michaelis-Menten Konstante
KSPV	Virus der klassischen Schweinepest
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
m	milli
μ	mikro

mAk	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> RNA
n	nano
N	normal (chem.)
NGS	N-Glykosylierungsstelle
nt	Nukleotid
N-terminal	aminoterminal
N-Terminus	Aminotermminus
OD	optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
p.i.	post infectionem
QC	„ <i>QuikChange</i> “
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuklease
SDS	Sodiumdodecylsulfat
T	Thymin
tRNA	<i>transfer</i> RNA
Tab.	Tabelle
TAE	Tris Acetat EDTA-Puffer
TBE	Tris Borat EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit (<i>units</i>)
U	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
v_{max}	Maximalgeschwindigkeit
w/v	Gewichtprozent
W	Watt
wt	Wildtyp

1. Einleitung

1.1 Klassifizierung des Virus der klassischen Schweinepest in das Genus Pestivirus

Pestiviren sind kleine behüllte RNA Viren mit einer Größe zwischen 40-60 nm (*Horzinek et al.*, 1971; *Enzmann & Weiland*, 1978; *Moennig & Plagemann*, 1992). Das vermutlich ikosaedrische Nukleokapsid (*Horzinek et al.*, 1967) umgibt die virale Nukleinsäure und ist seinerseits von einer Lipidhülle mit eingelagerten Glykoproteinen umgeben. Aufgrund ihrer Lipidhülle sind die Pestiviren empfindlich gegen Substanzen wie Chloroform, Äther und Detergenzien. Das Genus Pestivirus innerhalb der Familie *Flaviviridae* wird aus dem Virus der klassischen Schweinepest (KSPV), den Erregern der bovinen Virusdiarrhö/Mucosal Disease (BVDV) des Rindes und der „Border Disease“ des Schafes sowie einem Isolat von der Giraffe (giraffe-1) gebildet (*Wengler et al.*, 1995, *Heinz et al.*, 2000). In die Familie der *Flaviviridae* sind neben Pestiviren noch Flaviviren und Hepaciviren eingeordnet. Gemeinsam ist ihnen eine ähnliche Genomorganisation. Eine auffällige Ähnlichkeit besteht zwischen Pestiviren und Hepaciviren, da beide eine ungewöhnliche Translationsinitiation verfolgen (*Rice et al.*, 1996).

Zum Wirtsspektrum der Pestiviren gehören außer den paarhufigen landwirtschaftlichen Nutztieren auch Wildschweine und Wildwiederkäuer. Die Bezeichnung der vier Virusspezies geht auf die Tierart zurück, aus der sie ursprünglich isoliert wurden und in der sie Krankheitssymptome verursachen. Während unter natürlichen Bedingungen die KSPV-Infektion nur in Schweinen nachgewiesen werden konnte, ist das Wirtsspektrum von BVDV und BDV weniger eingengt. So gelang der Nachweis von BVDV in Schafen und Ziegen (z. B. *Becher et al.*, 1997 und 1999).

Die klassische Schweinepest hat als Tierseuche in vielen Ländern mit intensiver Schweinehaltung eine große wirtschaftliche Bedeutung (*Edwards et al.*, 2000; *Saatkamp et al.*, 2000). KSPV-Infektionen zeigen in ihrer klinischen Ausprägung eine große Variationsbreite von akuter Erkrankung, die mit hoher Letalität einhergeht, über chronische Verläufe bis hin zu subklinischen Krankheitsverläufen mit niedriger Letalität. Als Folge staatlicher Bekämpfungsmaßnahmen hat sich das Krankheitsbild zu einem mildereren, häufig unspezifischen Verlauf gewandelt, wobei meist chronische Formen der Erkrankung beobachtet werden (*Dunne et al.*, 1973; *Moennig & Plagemann*, 1992; *Thiel et al.*, 1996).

BVDV-Stämme werden aufgrund von Sequenzvergleichen und serologischer Kreuzreaktion in die beiden Genotypen BVDV I und BVDV II unterteilt (*Pellerin et al.*, 1994; *Ridpath et al.*, 1994). Die „klassischen“ BVDV-Stämme, die eine milde Diarrhö und Fertilitätsstörungen bei Rindern verursachen, sind als BVDV I zusammengefasst. Einige der unter BVDV II eingeteilten (neuen) BVDV-Stämme sind dagegen für schwere, durch hohes Fieber und Hämorrhagien gekennzeichnete Krankheitsausbrüche verantwortlich (*Pellerin et al.*, 1994; *Ridpath et al.*, 1994). Kürzlich wurde ein Pestivirus-Isolat von der Giraffe als weitere Spezies in das Genus Pestivirus eingegliedert, da es keiner der anderen Spezies zugeteilt werden konnte (*Heinz et al.*, 2000). Weiterhin wird diskutiert, ob zwei Pestivirusisolate, „Reindeer-1“ und „Bison“, eine weit entfernte verwandte Subgruppe von BDV darstellen, oder jeweils eine neue Spezies bilden (*Becher et al.*, 1999). Neuere Sequenzvergleiche und serologische Kreuzreaktionen bestärken die Einteilung als eigenständige Spezies (*Avalos-Ramirez et al.*, 2001).

1.2 Genomorganisation der Pestiviren

Das pestivirale Genom besteht aus einer etwa 12,5 kb langen einzelsträngigen RNA. Aufgrund von Duplikationen viraler oder Insertionen zellulärer Sequenzen erreicht das Genom bei einigen BVDV-Isolaten eine Größe von bis zu 16,5 kb (*Meyers & Thiel*, 1996). Die RNA liegt, wie bei allen Vertretern der Flaviviridae, in positiver („messenger sense“) Orientierung vor und besitzt einen einzelnen großen Leserahmen, der etwa 4000 Aminosäuren umfasst (*Collett et al.*, 1988a; *Meyers et al.*, 1989; *Moormann et al.*, 1990; *Deng & Brock*, 1992). Eingerahmt wird dieses offene Leseraster von nicht kodierenden Sequenzen (sogenannte „nicht translatierende Regionen“: NTR), die am 5'-Ende fast 400 Nukleotide bzw. am 3'-Ende über 200 Nukleotide umfassen (*Collett et al.*, 1988a; *Meyers et al.*, 1989; *Moormann et al.*, 1990). Die nicht translatierte Region am 5'-Ende weist eine komplexe Sekundärstruktur auf und hat die Funktion einer internen Ribosomenbindungsstelle („*internal ribosomal entry site*“, IRES), wodurch die Initiation der Translation vermittelt wird (*Poole et al.*, 1995; *Rijnbrand et al.*, 1997). Somit unterscheiden sich Pestiviren und das Hepatitis C-Virus bezüglich Initiation der Translation fundamental von Flaviviren, deren Translation durch die „*Cap*“-Struktur am 5'-Terminus vermittelt wird (*Poole et al.*, 1995; *Tsukijama-Kohara et al.*, 1992). Auch für die 3'-NTR konnte die Ausbildung einer charakteristischen Sekundärstruktur nachgewiesen werden, die eine *cis*-aktive Funktion für die Replikation besitzt (*Yu et al.*, 1999). Das 3'-Ende des viralen Genoms ist nicht polyadenyliert (*Purchio et al.*, 1983; *Collett et al.*, 1988a; *Meyers et al.*, 1989).

Das durch die Translation der genomischen RNA entstehende Polyprotein (Abb. 1) wird ko- und posttranslational durch viruskodierte Proteasen und Proteasen der Wirtszelle prozessiert, wodurch die reifen Virusproteine, vier Struktur- und sieben bzw. acht Nichtstrukturproteine, entstehen (Collett *et al.*, 1988b, 1988c und 1991; Rümenapf *et al.*, 1993; Stark *et al.*, 1993).

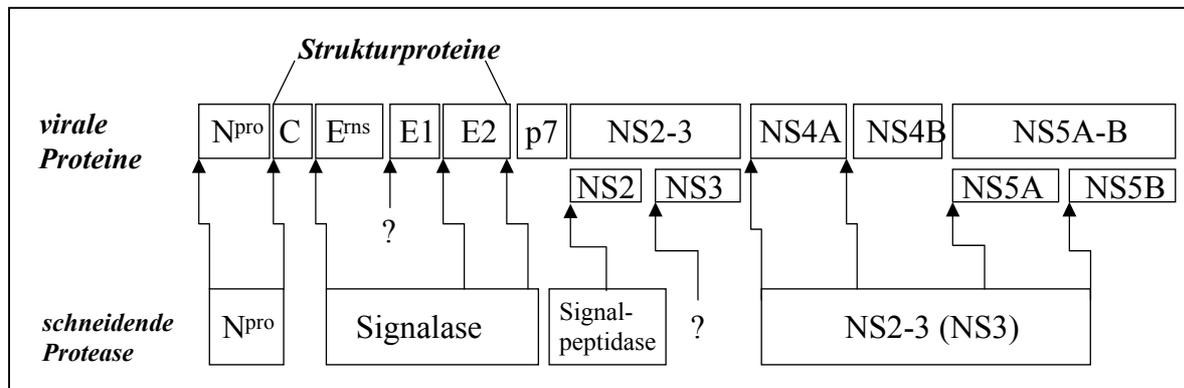


Abb.1: Genomorganisation der Pestiviren

Bei der Prozessierung des Polyproteins sind zelluläre Proteasen (Signalase) und virale Proteasen beteiligt.
 ?= Protease nicht bekannt

Das erste Genprodukt ist die N-terminale Protease N^{pro}, die sich autoproteolytisch vom entstehenden Polyprotein abspaltet (Thiel *et al.*, 1991; Wiskerchen *et al.*, 1991; Stark *et al.*, 1993; Rümenapf *et al.*, 1998). Weitere Funktionen von N^{pro} während der Virusreplikation sind bisher nicht bekannt. Ein N^{pro} entsprechendes Genprodukt ist für die anderen beiden Genera, Hepatitis C-Virus und Flavivirus nicht bekannt.

N^{pro} wird von den viralen Strukturproteinen gefolgt, die im 5'-terminalen Drittel des Genoms kodiert werden. Sie umfassen in dieser Reihenfolge das Nukleokapsidprotein (C) und die Glykoproteine E^{ms}, E1 und E2. Die Glykoproteine werden aufgrund einer sich an das Kapsidprotein anschließenden Signalsequenz in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) transloziert. Im ER erfolgt sofort nach der Translokation eine Spaltung durch eine zelluläre Signalpeptidase zwischen C und dem Vorläuferprotein, das aus E^{ms}, E1 und E2 besteht. Es schließen sich weitere Spaltungen der Signalpeptidase zwischen E1 und E2 und am C-Terminus von E2 an (Rümenapf *et al.*, 1993). Bisher ist nicht geklärt, durch welche Protease die Spaltung zwischen E^{ms} und E1 vermittelt wird. Alle drei Glykoproteine bilden Dimere, die über intermolekulare Disulfidbrücken verbunden sind; dabei kommen E^{ms}-Homodimere, E1-E2-Heterodimere und E2-Homodimere vor (Thiel *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1990). Ein dem E^{ms} entsprechendes Genprodukt existiert bei den anderen beiden Genera der Flaviviren nicht (Übersichtsartikel Rice *et al.*, 1996).

Die sich anschließenden C-terminalen zwei Drittel des offenen Leserahmens kodieren ausschließlich für Nichtstrukturproteine, welche die enzymatischen und strukturellen Komponenten des viralen Replikationskomplexes enthalten. Dem viralen Strukturprotein E2 folgt ein kleines, als p7 bezeichnetes Protein, das in virusinfizierten Zellen, aber nicht in Virionen nachgewiesen werden konnte (*Elbers et al.*, 1996; *Harada et al.*, 2000). Auf p7 folgt NS2-3, das bei den meisten Pestiviren teilweise in NS2 und NS3 gespalten wird, so dass sowohl das Vorläuferprotein NS2-3 als auch die Spaltprodukte vorliegen. Eine Ausnahme bilden nicht-zytopathogene BVDV-Stämme (ncp BVDV), bei denen das Vorläuferprotein NS2-3 nicht prozessiert wird. Bei zytopathogenen Stämmen korreliert die Induktion des zytopathischen Effektes mit der Synthese von NS3, welche auf Rekombination viraler Sequenzen, Deletionen, Punktmutationen im NS2 oder Insertionen zellulärer Sequenzen zurückzuführen ist (*Tautz et al.*, 1996 and 1999; *Meyers et al.*, 1996a; *Mendez et al.*, 1998; *Kümmerer et al.*, 1998 und 2000; *Ridpath et al.*, 2000; *Rinck et al.*, 2001). In Zellen, die mit KSPV infiziert sind, können beide Formen, NS2-3 und NS3 nachgewiesen werden (z. B. *Meyers & Thiel*, 1996). Im Gegensatz zu BVDV repliziert KSPV in der Zellkultur im allgemeinen ohne die Ausbildung eines zytopathischen Effektes.

Für NS3 wurden die enzymatischen Aktivitäten einer Serin-Protease, einer NTPase und einer Helikase nachgewiesen (*Tamura et al.*, 1993; *Warrener & Collett*, 1995; *Wiskerchen & Collett*, 1991). Die Serin-Protease katalysiert die Prozessierung am C-Terminus von NS3 und an den nachfolgenden Spaltstellen des Polyproteins, die zur Freisetzung von NS4A, NS4B, NS5A und NS5B führen (*Tautz et al.*, 1997 und 2000; *Wiskerchen & Collett*, 1991; *Xu et al.*, 1997). NS4A ist ein Kofaktor der NS3-Protease für die Prozessierung an den Spaltstellen NS4B/ NS5A und NS5A/ NS5B (*Xu et al.*, 1997). Während die Funktion von NS5A bisher unbekannt ist, konnte für NS5B die Funktion der pestiviralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase nachgewiesen werden (*Steffens et al.*, 1999; *Zhong et al.*, 1998).

Neutralisierende Antikörper werden im Verlauf einer Infektion mit Pestiviren vorwiegend gegen E2 und in geringerem Umfang gegen E^{rns}, aber nicht gegen E1 gebildet (*Weiland et al.*, 1992). Ebenso konnte im Tierexperiment eine vollständige Immunität nach Gabe aufgereinigter E^{rns}- bzw. E2-Antigene erzeugt werden, während die Gabe von E1-Antigen unter gleichen Bedingungen zu keiner Immunitätsausbildung führte (*König et al.*, 1995). Für E1 wird angenommen, dass es als Transmembranprotein nicht an der Virusoberfläche exponiert ist (*Thiel et al.*, 1991; *Weiland et al.*, 1990).

1.3 E^{rns} (E= envelope; rns= „ribonuclease secreted“)

Das pestivirale E^{rns} tritt in zwei Formen in Erscheinung. Zum einen ist es über nicht kovalente Bindung in die Virushülle eingelagert; zum anderen wird es aktiv von infizierten Zellen sezerniert (Rümenapf *et al.*, 1991 und 1993). Sowohl als Strukturprotein, als auch als sezerniertes Protein ist E^{rns} ribonukleolytisch aktiv (Hulst *et al.*, 1993; Schneider *et al.*, 1993). Das E^{rns} tritt extrazellulär als Homodimer mit ca. 100 kDa in Erscheinung (Thiel *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1991; Weiland *et al.*, 1990). In Abhängigkeit vom zellulären Kompartiment besitzt E^{rns} ein apparentes Molekulargewicht von 44 kDa und 60 kDa (Thiel *et al.*, 1991), während das kalkulierte Molekulargewicht des 227 Aminosäuren langen E^{rns} 25,7 kDa beträgt. Die Differenz ist auf Glykosylierung zurückzuführen. Je nach Pestivirus-Stamm weist E^{rns} 7-9 N-Glykosylierungsstellen (Asn x Thr/ Ser) auf; so hat z. B. das E^{rns} von KSPV-Stamm Alfort neun potentielle N-Glykosylierungsstellen (Meyers *et al.*, 1989; Thiel *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1993). Während die katalytisch aktiven Aminosäuren, die Cysteine sowie die N- und C-terminalen Prozessierungsstellen hoch konserviert sind, ist insbesondere der C-terminale Abschnitt von E^{rns} zwischen den einzelnen Pestiviren variabel (Hulst & Moormann, 2001).

E^{rns} ist ein essentielles Strukturprotein. Die Deletion des E^{rns} Gens erlaubt noch die Replikation, aber nicht die Bildung von Virionen. Wird E^{rns} von der Zelle in trans bereitgestellt, erfolgt jedoch die Bildung von infektiösen Viruspartikeln (Widjojatmodjo *et al.*, 2000). Vermutlich ist E^{rns} an der Assemblierung von Virionen beteiligt (Harada *et al.*, in präp.). Bei den nahe verwandten Hepatitis C Viren konnte eine Interaktion des Hüllproteins E1 mit dem Kapsidprotein nachgewiesen werden (Lo *et al.*, 1996).

Weiterhin wurde gezeigt, dass E^{rns} an Zelloberflächen von permissiven Zellen bindet und eine pestivirale Infektion inhibieren kann (Hulst & Moormann, 1997). Im Gegensatz zu E2, welches höchstwahrscheinlich an einen oder mehrere zelluläre(n) Rezeptor/en bindet (Xue & Minocha, 1993; Schelp *et al.*, 1995), bindet E^{rns} an Glykosaminoglykane, wie sie an Zelloberflächen von eukaryotischen Zellen vorhanden sind (Iqbal *et al.*, 2000; Hulst *et al.*, 2001). Es wird diskutiert, ob die Infektion von Zellen mit Pestiviren ein mehrstufiger Prozess ist, bei dem durch die Bindung von E^{rns} an Glykosaminoglykane die spezifische Interaktion von E2 mit einem oder mehreren Rezeptor/en durch die räumliche Nähe beider Reaktionspartner begünstigt wird (Iqbal *et al.*, 2000; Hulst *et al.*, 2001). Dieser Mechanismus wird von einer Reihe an Viren verwendet. Beispielsweise bindet HIV zuerst an Heparansulfat

(ein Glykosaminoglykan) und CD4, bevor die Bindung an Chemokinrezeptoren erfolgt (Fantini *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Die Funktionen sowohl des sezernierten E^{ms} als auch der Ribonuklease-Aktivität des pestiviralen E^{ms} *in vivo* sind unbekannt. Die Ribonuklease-Aktivität ist vermutlich ein Virulenzfaktor, da gezeigt wurde, dass Inaktivierung der RNase-Funktion zu Virusattenuierung führt (Meyers *et al.*, 1999). In anderen Veröffentlichungen wurde die Interaktion der RNase E^{ms} mit dem Immunsystem des Wirtes postuliert (Schneider *et al.*, 1993; Hulst *et al.*, 1994 und 1998; Brusckke *et al.*, 1997). Da zytotoxische Effekte von RNasen beschrieben sind (Wu *et al.*, 1993), könnte die bereits früh nach einer pestiviralen Infektion auftretende Reduktion bis Depletion von B-Lymphozyten durch die enzymatische Funktion des sezernierten E^{ms} verursacht werden. Die Reduktion von B-Lymphozyten tritt zu einem so frühen Zeitpunkt in Erscheinung, dass sie vermutlich nicht auf einen direkten zytopathischen Effekt zurückzuführen ist (Susa *et al.*, 1992). *In vitro* induziert E^{ms} in aufgereinigten B-Lymphozyten verschiedener Spezies Apoptose (Brusckke *et al.*, 1997). Ergänzend wurde gezeigt, dass hierzu die Enzymaktivität des E^{ms} nicht essentiell ist, da bei Inkubation von B-Lymphozyten mit einer inaktiven E^{ms}-Mutante ebenfalls Apoptose auftrat (zitiert in Hulst & Moormann, 2001, aus der *Ph. D. Thesis* von C. J. Brusckke). Kürzlich wurde gezeigt, dass eine im C-terminalen Bereich von E^{ms} lokalisierte Transportpeptidsequenz die Aufnahme von E^{ms} in das Zellinnere ermöglicht. Sowohl E^{ms} als auch isolierte Peptide, die 27 Aminosäuren bzw. 37 Aminosäuren des E^{ms} umfassen (aa 194-220 bzw. aa 191-227), waren in der Lage, die Plasmamembran der untersuchten Zellen in einem energieunabhängigen Translokationsprozess zu passieren (Langedijk *et al.*, 2001). Hingegen ist nicht bekannt, ob nach einer Internalisierung von E^{ms} auch ein RNA-Abbau erfolgt.

1.4 Ribonuklease-Aktivität des E^{ms}

Ribonukleasen sind ubiquitär verbreitet und bei einer Vielzahl von Prozessen im RNA-Stoffwechsel beteiligt. Hierzu zählen unter anderem die Prozessierung und die Degradation von mRNAs sowie Modifikationen der 3'- und 5'-Enden. Generell kann man RNasen in Exo- und Endoribonukleasen unterteilen: Exoribonukleasen prozessieren das RNA-Substrat ausgehend von den Termini des Moleküls. Je nach Beginn der Prozessierung werden 3'-5' bzw. 5'-3' Exoribonukleasen unterschieden. Exoribonukleasen spalten zumeist Mononukleotide vom RNA-Molekül ab. Endoribonukleasen hingegen greifen das Substrat an

internen Phosphodiesterbindungen an. Je nachdem, ob das Substrat einzelsträngig oder doppelsträngig ist, wird zwischen einzelstrangspezifischen bzw. doppelstrangspezifischen Ribonukleasen unterschieden. Bisher sind eine Vielzahl von Endonukleasen und Exonukleasen bekannt, die zu einem Großteil anhand ihrer gemeinsamen Charakteristika in Familien zusammengefasst sind. Häufig sind die Familien nach ihrem Prototyp benannt (Auflistung in z. B. „Ribonucleases structures and functions“ von D’Alesio, G., Riordan, J. F.(Eds), Academic Press, USA). Aufgrund vergleichender Sequenzanalysen wurde eine Homologie von E^{ms} zur Familie von T2 RNasen festgestellt (Schneider *et al.*, 1993), die zur Aufnahme von E^{ms} in diese Familie geführt hat (Übersichtsartikel Irie, 1997 und 2001).

RNasen erkennen RNA-Moleküle anhand der Primärstruktur, also der Nukleinsäuresequenz, wobei eine mehr oder weniger ausgeprägte Sequenzspezifität bestehen kann. Aber auch die räumliche Struktur beeinflusst in hohem Maße die Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen; so spielt im Vergleich zur DNA die flexiblere Raumstruktur der RNA eine wichtige Rolle.

Die Endo- und Exoribonukleasen werden aufgrund des Spaltungsmechanismus in Phosphodiesterasen und Phosphotransferasen eingeteilt. Beispielsweise sind RNasen der T2 Familie Phosphotransferasen, da die Phosphatgruppe der gespaltenen Phosphodiesterbindung auf das 3’-Ende des 5’-Spaltproduktes übertragen wird (s. u.).

Die Eingliederung von E^{ms} in die Familie der T2 RNasen erfolgte hauptsächlich auf der Grundlage von Sequenzhomologien, die jeweils zwei Bereiche umfassen (Abb. 2). Diese Bereiche beinhalten acht bzw. zwölf Aminosäuren einschließlich der katalytisch aktiven Aminosäuren (z. B. Übersichtsartikel Irie, 1997 und 2001). Diese Aminosäuren sind auch innerhalb der bislang bekannten pestiviralen E^{ms} Sequenzen nahezu vollständig konserviert.

		<u>Box A</u>	<u>Box B</u>
Virus:	KS	RSL HGIWP	LQR HEWNKHGWC
Virus:	BV	RSL HGIWP	LQR HEWNKHGWC
Pilz:	Rh	FTL HGLWP	FWS HEWSKHGTC
Pilz:	T2	WTI HGLWP	FWE HEWNKHGTC
Pflanze:	MC1	FTI HGLWP	FWS HEWTKHGTC
Tier:	CL1	WTI HGLWP	FWK HEWEKHGTC

Abb. 2: Sequenzhomologie zwischen E^{ms} von Pestiviren und T2 RNasen

Sequenzhomologien sind insbesondere in zwei Sequenzbereichen, Box A und Box B, vorhanden. Die fett dargestellten Aminosäuren sind durchgehend konserviert. Die Hydrolyse der RNA wird durch drei Histidine katalysiert. **KS**, E^{ms} von KSPV; **BV**, E^{ms} von BVDV; **Rh**, RNase Rh aus *Rhizopus niveus*; **T2**; RNase T2 aus *Aspergillus oryzae*; **MC1**, RNase MC1 aus *Momordica charantia*; **CL1**; RNase CL1 aus der Hühnerleber isoliert

Die Familie der T2 RNasen umfasst RNasen von Pilzen, wie z. B. die RNase T2 von *Aspergillus oryzae* (Kawata et al., 1990) und die RNase Rh von *Rhizopus niveus* (Kurihara et al., 1996), aber auch verschiedene pflanzliche RNasen, wie z. B. die Selbstinkompatibilitäts-RNasen S2 und S6 von *Nicotiana glauca* (McClure et al., 1989; Matton et al., 1994). In Pflanzen, die zur Familie der *Solanaceae*, *Scrophulariaceae* und *Rosaceae* gehören, verhindern die S-RNasen die Selbstbefruchtung. Bei Befruchtung durch den eigenen Pollen gelangen vom Griffel exprimierte extrazelluläre S-RNasen in diesen hinein und degradieren die rRNA. Der Pollenschlauch kann nicht auswachsen, und die Befruchtung wird verhindert. Auch im Tierreich konnten Mitglieder der T2 RNase Familie z. B. in Austern (Watanabe et al., 1993) und in Organen von Säugetieren wie der Hühnerleber (Hayano et al., 1993) isoliert werden. Das Vorkommen von RNasen der T2 Familie in Protozoen wie in *Physarum polycephalum* (Inokuchi et al., 1993) und T2 ähnliche Ribonukleasen in Bakterien wie z. B. *Escherichia coli* (Meador & Kennell, 1990) unterstreicht die ubiquitäre Verbreitung.

Vertreter der T2-Familie sind relativ unspezifische Endoribonukleasen mit einem Molekulargewicht von mehr als 24 kDa und einem pH Optimum im sauren Bereich (Übersichtsartikel Irie, 1997 und 2001). Während RNasen, die aus Pilzen isoliert worden sind, fünf Disulfidbrücken aufweisen, besitzen alle anderen zur Familie der T2 RNasen gehörenden Ribonukleasen vier Disulfidbrücken (Übersichtsartikel Irie, 2001).

Einige Vertreter der Familie der T2 RNasen wie die RNase Rh sind extensiv charakterisiert worden. Im Gegensatz hierzu liegen für E^{rns} nur wenige biochemische Daten vor (Windisch et al., 1996; Schneider et al., 1993; Hulst et al., 1994). Während DNA und doppelsträngige RNA von E^{rns} nicht abgebaut werden, wurde bisher der Abbau von genomischer RNA, ribosomaler RNA und homopolymerer RNA nachgewiesen. Messungen mit homopolymeren RNA-Substraten ergaben eine Präferenz des E^{rns} für poly U (Windisch et al., 1996).

Die bisher veröffentlichten Ergebnisse geben übereinstimmend ein Temperaturoptimum der RNase-Aktivität von 55 °C an. Dagegen sind die Ergebnisse bezüglich des pH-Optimums widersprüchlich: je nach Publikation liegt das Optimum bei 4,5 (Hulst et al., 1994) oder 6-6,5 (Windisch et al., 1996). Jedoch ist E^{rns} über einen größeren Temperatur- und pH-Bereich aktiv. Viele Ribonukleasen lassen sich durch divalente Kationen hemmen. Auf die Aktivität von E^{rns} üben die meisten Kationen keinen Einfluss aus, einzig durch die Zugabe von Zn²⁺ und Mn²⁺ konnte die Ribonuklease gehemmt werden (Schneider et al., 1993; Windisch et al., 1996). Der stärkste Inhibitor war Zn²⁺, da mit diesem Kation schon in 100 fach geringerer Konzentration (15 bzw. 16,5 µM) als mit Mn²⁺ eine 50 %ige Inhibition der ribonukleolytischen Aktivität des E^{rns} erreicht wurde. EDTA bzw. Ca²⁺ und Mg²⁺ führen zu keiner Hemmung der

Enzymaktivität (Schneider *et al.*, 1993; Windisch *et al.*, 1996). Die biologische Relevanz der Inhibition konnte bisher noch nicht ermittelt werden.

Die Bildung von Dimeren ist für den Erhalt der ribonukleolytischen Aktivität von E^{rns} nicht notwendig (Schneider *et al.*, 1993; Windisch *et al.*, 1996). Obwohl E^{rns} ein hoch glykosyliertes Protein ist (bis zu neun N-Glykosylierungsstellen), ist die Enzymaktivität nach posttranslationaler Deglykosylierung nur um ein Drittel reduziert (Windisch *et al.*, 1996).

Bisher wurde von fünf Vertretern der T2 RNase Familie mittels Kristallographie die dreidimensionale Struktur ermittelt. Hierzu zählt die RNase Rh von *Rhizopus niveus* (Kurihara *et al.*, 1996), RNase MC1 von *Momordica charantia* (Suzuki *et al.*, 2000), RNase LE von *Lycopersicon esculentum* (Tanaka *et al.*, 2000), RNase S3 von *Pyrus pyrifolia* (Matsuura *et al.*, 2001), und die S_{F11}-RNase von *Nicotiana alata* (Ida *et al.*, 2002). Aufgrund der bekannten dreidimensionalen Strukturen von RNase LE und RNase Rh wird eine Einteilung der T2 RNasen in zwei Gruppen vorgeschlagen (Tanaka *et al.*, 2000). Die Kristallstruktur der RNase LE bildet die strukturelle Grundlage für Ribonukleasen, die aus Pflanzen und Tieren isoliert wurden (inklusive der S RNasen), während die Kristallstruktur von RNase Rh die Strukturvorlage für aus Pilzen isolierte Ribonukleasen (inklusive T2 RNase) darstellt. Beide Strukturen gehören zu den „ $\alpha+\beta$ type structures“, da eine verschieden hohe Anzahl von α -Helices und β -Faltblättern vorhanden ist. Innerhalb beider Strukturen ist das zentral gelegene antiparallele β -Faltblatt, die lange α -Helix, welche die N-terminale Hälfte mit der C-terminalen Hälfte verbindet, und die Lage der katalytisch aktiven Aminosäuren konserviert (Abb. 3).

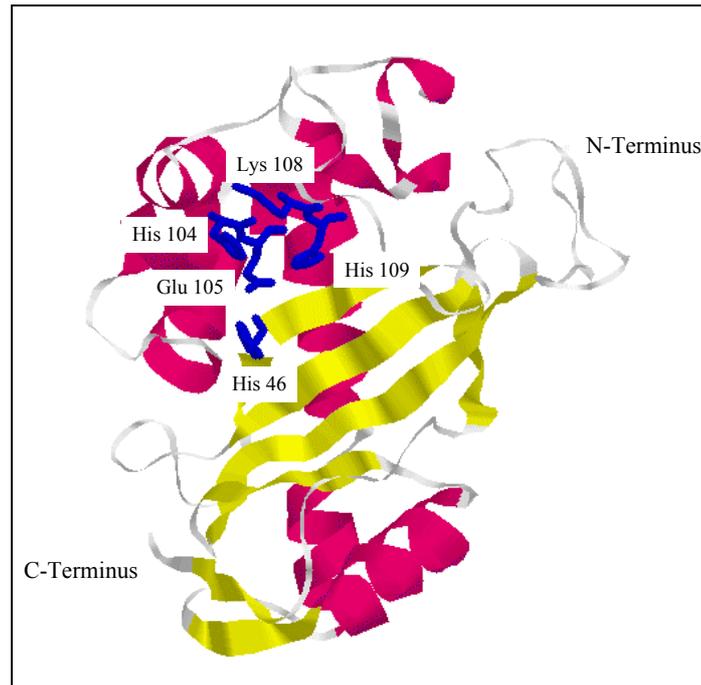


Abb. 3: „Rasmol“-Darstellung der katalytisch aktiven Aminosäuren innerhalb der Proteinstruktur von *RNase Rh*

Innerhalb der bisher ermittelten Kristallstrukturen von RNasen der T2 Familie ist das zentral gelegene antiparallele β -Faltblatt, die lange α -Helix, welche die N-terminale Hälfte mit der C-terminalen Hälfte verbindet, und die Lage der katalytisch aktiven Aminosäuren konserviert. Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind blau dargestellt. In *RNase Rh* erfolgt die eigentliche Spaltung durch zwei Histidine (Histidin 46 und Histidin 109). Das zyklische Zwischenprodukt wird durch Interaktion mit Glutaminsäure 105 und wahrscheinlich ebenfalls durch Interaktion mit Histidin 104 und Lysin 108 stabilisiert. Die Proteinstruktur ist in der „protein data bank“ mit der Bezeichnung „1bol“ enthalten.

Die Klassifizierung der Ribonukleasen erfolgt anhand ihrer Charakteristika wie z. B. dem Aufbau des aktiven Zentrums. *RNase T2* spaltet RNA endonukleolytisch über ein zyklisches Zwischenprodukt zu Oligonukleotiden, die am 3'-Ende phosphoryliert sind. Die Aufklärung des Spaltungsmechanismus erfolgte hauptsächlich anhand der *RNase Rh* von *Rhizopus niveus* (Ohgi et al., 1992, 1993, 1994 und 1996; Irie et al., 1994), *RNase M* von *Aspergillus satoi* (Watanabe et al., 1983) und *RNase T2* von *Aspergillus oryzae* (Kawata et al., 1990).

Bei *RNase Rh* wurde aufgrund der Kristallstruktur, Daten aus Mutationsanalysen und chemischen Modifikationen der in Abbildung 4 dargestellte Spaltungsmechanismus vorgeschlagen (Ohgi et al., 1993; Irie et al., 1994). Es wurde postuliert, dass dieser Mechanismus auch für alle anderen Vertreter der T2 RNasen zutrifft, da der Aufbau des aktiven Zentrums bei den bisher ermittelten Strukturen nahezu identisch ist (Tanaka et al., 2000).

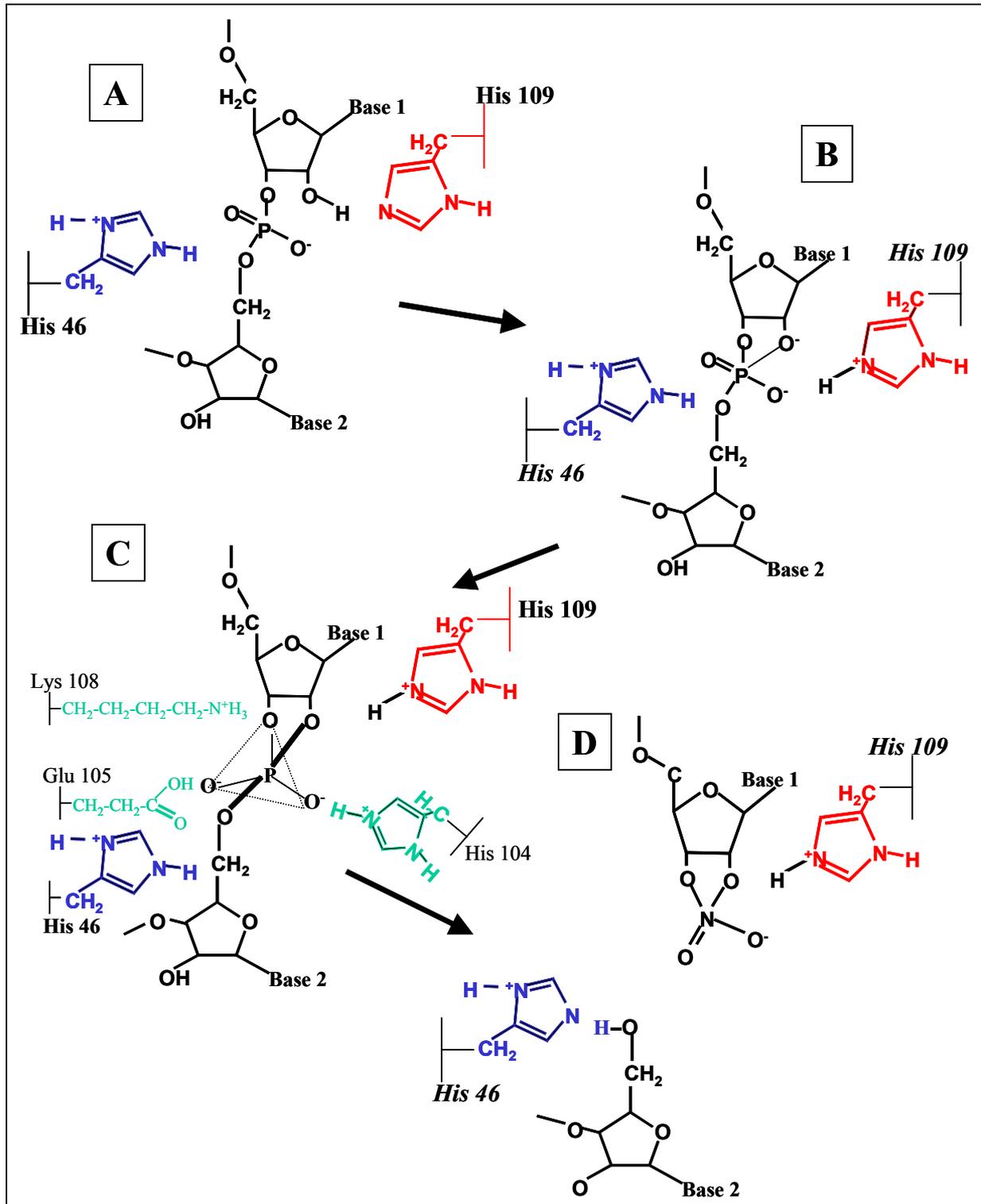


Abb. 4: Mechanismus der RNA-Spaltung bei T2 RNasen am Beispiel von RNase Rh; nähere Angaben im Text.

Die Aminosäuren His₄₆ und His₁₀₉ führen die Grundreaktion der RNA-Spaltung durch (Abb. 4). His₁₀₉ fungiert als Protonenakzeptor, da es ein Wasserstoffion der 2' OH-Ribosegruppe des Nukleotids mit der Base 1 (Abb. 4A) übernimmt. Das entstehende negativ geladene Sauerstoffion greift nukleophil an der Phosphatgruppe an (Abb. 4B), wodurch ein

Zwischenprodukt (*pentakoordiniertes Intermediat*) entsteht, welches durch die Glu₁₀₅ und wahrscheinlich ebenfalls durch die Aminosäure Lys₁₀₈ stabilisiert wird (Abb. 4C). Die Aufgabe von His₁₀₄ ist die Bindung der Phosphatgruppe, so dass die Hydrolyse der RNA erfolgen kann (Ohgi *et al.*, 1992). His₁₀₄ könnte ebenfalls an der Stabilisierung des zyklischen Zwischenproduktes beteiligt sein. Der Zerfall der RNA erfolgt nach Aufnahme eines Wasserstoffions des 5' Sauerstoffatoms der Ribose des Nukleotids mit der Base 2. In diesem Schritt fungiert His₄₆ als Protonendonator (Abb. 4D). Als Zwischenprodukt wird ein 2'3'-zyklisches Oligonukleotid gebildet, bevor als Endprodukt ein Oligonukleotid mit einem 3'-Phosphat entsteht.

Generell sind enzymatische Reaktion und Basenspezifität durch die B1 und B2 Seite festgelegt, wobei die B1 Seite am 5'-Ende der zu spaltenden Phosphodiesterbindung und die B2 Seite am 3'-Ende lokalisiert sind (Irie *et al.*, 1997).

Bei RNase Rh sind die Aminosäuren Asp₅₁, Tyr₅₇ und Trp₄₉ an der B1 Seite lokalisiert und für die Basenspezifität (A> G> C, U) verantwortlich (Ohgi *et al.*, 1993 und 1996; Irie *et al.*, 1997 und 2001). Die Aminosäuren bilden wahrscheinlich eine hydrophobe Tasche mit Asp₅₁ am Boden der Tasche. Asp₅₁ interagiert wahrscheinlich über polare Wechselwirkungen, vermutlich Wasserstoffbrücken, mit der Base des Nukleotids vor der Spaltstelle. Die B2 Seite der RNase Rh besteht aus den Aminosäuren Gln₃₂, Pro₉₂, Ser₉₃, Asn₉₄, Gln₉₅ und Phe₁₀₁ (z. B. Irie *et al.*, 2001). Im Gegensatz hierzu ist die Basenspezifität der RNase MC1 durch Aminosäuren an der B2 Seite festgelegt. Anhand der Co-Kristallstruktur von RNase MC1 und 2'-UMP bzw. 3'-UMP konnten zwei Aminosäuren, Aspartat 71 und Leucin 73, identifiziert werden, die essentiell für die ausgeprägte Spezifität von RNase MC1 für Uridin sind (U>> G> A> C). Mutationsanalysen bestätigten diese Ergebnisse (Irie *et al.*, 1993; Suzuki *et al.*, 2000; Numata *et al.*, 2001).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

E^{ms} ist ein einzigartiges virales Protein, da es sich durch mehrere Eigenschaften auszeichnet. Zunächst ist es eines der drei Strukturproteine der Pestiviren. E^{ms} wird von infizierten Zellen aktiv sezerniert und ist das einzige bekannte virale Protein, welches sowohl als Strukturprotein als auch als sezerniertes Protein ribonukleolytisch aktiv ist. Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine nähere Charakterisierung der Ribonuklease *in vitro* erfolgen.

Aufgrund früherer Untersuchungen war bekannt, dass E^{ms} *in vitro* bevorzugt einzelsträngiges homopolymeres Uridin spaltet, es aber andererseits heteropolymere Substrate, wie z. B. das virale Genom oder ribosomale RNA, vollständig degradiert (Schneider *et al.*, 1993; Windisch *et al.*, 1996). Um Rückschlüsse auf ein potentiell natürliches Substrat von E^{ms} ziehen zu können, sollte zunächst die Substratspezifität auf der Grundlage von radioaktiv markierter einzelsträngiger heteropolymerer RNA detailliert untersucht werden. Zur anschließenden näheren Untersuchung der Spaltstelle sollten RNA-Moleküle verwendet werden, die jeweils eine singuläre Spaltstelle aufweisen und sich nur durch die Base an der B1 oder B2 Seite dieser Spaltstelle unterscheiden. Die Geschwindigkeit, mit der diese Spaltstelle gespalten wird, sollte durch Ermitteln der Enzymkinetik für alle Substrate erfasst und verglichen werden. Hierzu war es notwendig, einen Degradationstest zu etablieren.

Weiterhin war geplant, anhand der ribonukleolytischen Aktivität von E^{ms} -Mutanten, bei denen jeweils einzelne katalytische Aminosäuren verändert wurden, das aktive Zentrum näher zu charakterisieren. Die Bestimmung der Ribonuklease-Aktivität sollte mit Hilfe des zuvor zur Erfassung der Enzymkinetik etablierten Degradationstest erfolgen. Für die Untersuchung lagen bereits 14 E^{ms} -Mutanten als rekombinante Bakuloviren vor (Vidovic *et al.*, 1997). Um eine mögliche dreidimensionale Struktur des E^{ms} zu erhalten, sollte ein Modell anhand der Kristallstruktur von RNase Rh (Auflösung: 2 Å; Kurihara *et al.*, 1996) entworfen werden. RNase Rh ist wie E^{ms} ein Mitglied der T2 RNase Familie. Die modellierte 3-D Struktur des E^{ms} sollte als Grundlage für weitere Mutagenesestudien dienen.

Wiederum mit Hilfe des Degradationstests sollte die Bedeutung der N-Glykosylierung für die enzymatische Aktivität des E^{ms} untersucht werden. E^{ms} ist das am stärksten glykosylierte pestivirale Protein. Es besitzt 7-9 potentielle N-Glykosylierungsstellen, die vermutlich sämtlich verwendet werden, da Zuckerketten für mehr als die Hälfte des apparenten Molekulargewichtes verantwortlich sind (Meyers *et al.*, 1989; Thiel *et al.*, 1991; Rümenapf *et al.*, 1993). Dieser hohe Grad an N-Glykosylierung ist ungewöhnlich für T2 RNasen (Irie *et al.*, 2001). Um essentielle N-Glykosylierungsstellen zu definieren, sollte durch eine

stufenweise Substitution der Asparagin-Reste von N-Glykosylierungsstellen zu Glutamin die Anheftung von Zuckermolekülen vermieden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
Acrylamid (reinst, 2x krist.)	Fa. Serva
Agar-Agar	Fa. DIFCO
Agarose	Fa. GIBCO (Invitrogen Corporation)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fa. Aldrich
Ampicillin	Fa. Fluka
Bacto-Hefe-Extrakt	Fa. Difco
Bacto-Trypton	Fa. Difco
β -Mercaptoethanol	Fa. Fluka
Bromphenolblau	Fa. Sigma
BSA	Fa. Serva
Calciumchlorid	Fa. Merck
Chloroform	Fa. Fluka
Desoxy(ribo)nukleotide	Fa. Boehringer Mannheim
Ethanol	Fa. Fluka
Ethidiumbromid	Fa. Boehringer Mannheim
Formamid	Fa. Sigma
G15 Sepharose	Fa. Pharmacia
Harnstoff	Fa. United States Biochemical
Isopropanol	Fa. Fluka
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Fa. Fluka
Methanol	Fa. Fluka
Milchpulver	Fa. DE-VAU-GE Gesundheitswerk GmbH
Natriumacid	Fa. Merck
Natriumacetat	Fa. Merck
Natriumhydroxid	Fa. Fluka

Natriumnitrat	Fa. Merck
NP-40	Fa. Fluka
Octylglucosid	Fa. Calbiochem
Penicillin	Fa. Sigma
Protein A-Sepharose	Fa. Pharmacia
Repel-Silane	Fa. Pharmacia
Rubidiumchlorid	Fa. Fluka
Schwefelsäure	Fa. Fluka
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Fa. ICN
Streptomycin	Fa. Sigma
TEMED	Fa. Fluka
Triton X-100	Fa. Fluka
Trypton	Fa. Fluka
TWEEN 20	Fa. Fluka

Weitere hier nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen GIBCO, Fluka, Serva, Sigma und Roth mit dem Reinheitsgrad p. A. bezogen.

2.1.2 Auftragspuffer

formamidhaltiger Auftragspuffer (für DNA/ RNA):

96 ml	deionisiertes Formamid (5 g Amberlite)
0,03 g	Xylencyanol FF
0,03 g	Bromphenolblau
4 ml	0,5 M EDTA

Proteingel-Auftragspuffer:

6 M	Harnstoff
62,5 mM	Tris-HCL pH 6,8
2 %	SDS
10 %	Glycerol (v/v)
5 %	β -Mercapto-ethanol (v/v), nur bei reduzierenden Gelen
0,025 %	Bromphenolblau (w/v)
0,025 %	Phenolrot (w/v)

2.1.3 eukaryontische Zelllinien

PK 15-Zellen („porcine kidney“):	American Type Culture Collection (ATCC Nummer: CCL-10)
Sk 6-Zellen („swine kidney“-Zelllinie):	bezogen von Herrn M. Hoffmann (Schweiz)
BHK 21-Zellen („baby hamster kidney“-Zelllinie):	American Type Culture Collection ATCC Nummer: CCL-33
Hybridomzellen 24/16:	bezogen von Herrn M. König
SF 21-Zellen („Spodoptera frugiperda“-Zelllinie):	bezogen von Herrn M. König

2.1.4 prokaryontische Zellen

E.coli K12-Stamm HB 101

2.1.5 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fa. Boehringer Mannheim
Dpn I	Fa. Stratagene
human placenta ribonuclease inhibitor (HPRI)	Fa. Takara
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fa. Stratagene
RNase A/ T1 Mix	Fa. Ambion
RNase A	Fa. Alexis
Restriktionsendonukleasen	Fa. New England BioLabs; Fa. Takara
Sp6 RNA-Polymerase	Fa. Takara
Superase In TM , RNase inhibitor	Fa. Ambion
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Fa. New England BioLabs
T3 RNA-Polymerase	Fa. Stratagene
T7 RNA-Polymerase	Fa. Stratagene
T4 DNA-Ligase	Fa. MBI-Fermentas
T4 DNA-Polymerase	Fa. Takara
T4 Polynukleotid Kinase	Fa. New England BioLabs
Trypsin	Fa. Sigma
Vanadylribonukleosidkomplex, RNase inhibitor	Fa. Fluka

2.1.6 vorgefertigte Systeme (Kits)

DNA Agarose Gel Extraction Kit (Ultrafree [®] -DA)	Fa. Millipore
Thermo-Sequenase fluoreszent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Fa. Amersham
RNeasy [™] Total RNA Kit	Fa. Qiagen
T7 Sequencing [™] Kit	Fa. Pharmacia
RNA Sequencing Enzyme Kit	Fa. Pharmacia
Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus (NEN [™])	Fa. Pierce
Gelsystem für PAA-(Sequenz)-Gele:	
radioaktive Proben:	Sequagel-Konzentrat Sequagel-Puffer Sequagel- Verdüner
	Fa. Biozym
automatische Sequenzierung:	Sequagel XR Sequagel-Puffer
	Fa. Biozym

2.1.7 radioaktiv markierte Nukleotide

³² P- α -[UTP]	Fa. Amersham-Pharmacia (Best.-Nr. PB10203, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)
³² P- γ -[ATP]	Fa. Amersham-Pharmacia (Best.-Nr. AA0068, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

2.1.8 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
pBluescript SK II	Co/E1 ori, Amp ^r , LacZ, fl (-) ori, MCS flankiert von T7/T3 RNA-Polymerase-Promoter; 2961 bp	Fa. Stratagene
p385	Amp ^r , MCS flankiert von SP6 RNA-Polymerase-Promoter; 6194 bp	Rümenapf, nicht publiziert
pHCK 9	pEMBL 18 mit Eco R1 Fragment von KSPV Alfort nt 50- 4002	Meyers 1989
p493	Vektor: p385 mit HindIII und BamHI geschnitten; Insert: IgG κ Signalsequenz vor E ^{rms} des p447 (Hind III/Bcl I kloniert)	Rümenapf, nicht publiziert
p494#11	wie p493 außer, dass N-terminal von E ^{rms} das FLAG Peptid lokalisiert ist	Rümenapf, nicht publiziert
p447	infektiöser cDNA-Klon des KSPV „Alfort/Tübingen“; basiert auf p11, der wiederum auf pA/KSPV (Meyers <i>et al.</i> , 1996a) basiert	Rümenapf, nicht publiziert
pVL 1392	Bakulovirus Rekombinationsvektor	BD PharmMingen [®]

2.1.9 Oligonukleotide

Die jeweiligen Restriktionsenzymchnittstellen bzw. die Promoterregionen sind unterstrichen. Die Oligonukleotide wurden überwiegend von der Firma MWG bezogen.

Oligo	Nukleotidsequenz (5'-3')	Länge, Restriktionschnittstelle
Aura 31	CCCA <u>AAGCTT</u> TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	37 nt; Hind III
Oligo dA	AAAAAAAAAAAAA-AAAAAA	12-18 nt
YTS 1	<u>GGGAACAAAAGCCGG</u> AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	29 nt (QC)
YTS 2	TTTTTTTTTTTTTCCGGCTTTTGT <u>TCCC</u>	29 nt (QC)
YTS 3	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(GC)TAAAAAAAAAAAA AGC	33 nt (QC)
YTS 4	GCTTTTTTTTTTTA(GC)TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	33 nt (QC)
YTS 5	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA(AT)TAAAAAAAAAAAA AGC	33 nt (QC)
YTS 6	GCTTTTTTTTTTTA(AT)TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	33 nt (QC)
E ^{tns} 100	A <u>AGGATCCT</u> AATTTGTTTGGGTCCTG	26 nt; BamH I
E ^{tns} 120	A <u>AGGATCCT</u> ACGGTATTTTTGTCATACCTGC	31 nt; BamH I
E ^{tns} 140	A <u>AGGATCCT</u> ATTTCTTGCAGCCAGTC	26 nt; BamH I
E ^{tns} 160	A <u>AGGATCCT</u> AGGAAACGTTGAAATTGCAC	29 nt; BamH I
E ^{tns} 180	A <u>AGGATCCT</u> ACAGAGCCGTGTCCTGGAGC	29 nt; BamH I
E ^{tns} 200	A <u>AGGATCCT</u> ATGTCACCCGCGCCGCACC	28 nt; BamH I
E ^{tns} 210	A <u>AGGATCCT</u> ACTCTAGCTTCTTCCCTGCG	29 nt; BamH I
E ^{tns} NG 1+	TCCACTGGTGAGCAAATAACTCAATGG	27 nt (QC)
E ^{tns} NG 1-	CCATTGAGTTATTTGCTCACCAGTGGA	27 nt (QC)
E ^{tns} NG 2/3+	GTGACCAAGGCACTAATGGTATTC	24 nt
E ^{tns} NG 2/3-	TCAGTTGCCATTGAGTTATGTTCTC	25 nt
E ^{tns} NG 4+	CTTAGAGGGGTTCAAAGGAGCTTACATG	28 nt (QC)
E ^{tns} NG 4-	CATGTAAGCTCCTTTGAACCCCTCTAAG	28 nt (QC)
E ^{tns} NG 5+	CGAGAGGACACAATATACGTGCTG	24 nt (QC)

Oligo	Nukleotidsequenz (5'-3')	Länge, Restriktions- schnittstelle
E ^{ms} NG 6+	GATTCAGTTAATGCAAAGGACCCAAAC	27 nt (QC)
E ^{ms} NG 6-	GTTTGGGTCCTTTGCATTA ACTGAATC	27 nt (QC)
E ^{ms} NG 7+	GGACCCAAACACAATTGACAGAAGGC	26 nt (QC)
E ^{ms} NG 7-	GCCTTCTGTCAATTGTGTTTGGGTCC	26 nt (QC)
E ^{ms} NG 8+	GAAAGGGAAACAATTTTCATTCGC	24 nt (QC)
E ^{ms} NG 8-	GCGAATGAAAATTGTTTCCCTTTC	24 nt (QC)
E ^{ms} NG 9+	CGTGCAATTTCCAAGTTTCCGTGG	24 nt (QC)
E ^{ms} NG 9-	CCACGGAAACTTGGA AATTGCACG	24 nt (QC)
E ^{ms} NG 2/3+rev	GTGACAACGGCACTAATGGTATTC	24 nt
E ^{ms} NG 2/3-rev	TCAGGTTCCATTGAGTTATGTTCTC	25 nt
E ^{ms} REP 5+	CTGTAGCAGCCGAGAACATAACTCAATG	28 nt (QC)
E ^{ms} REP 5-	CATTGAGTTATGTTCTCGGCTGCTACAG	28 nt (QC)
RepNG 1+	TAGCAGCCGAGCAAATAACTCAATGG	26 nt (QC)
RepNG 1-	CCATTGAGTTATTTGCTCGGCTGCTA	26 nt (QC)
CST 76	TTTAAGCTTAATACGACTCACTATAGG	27 nt; Hind III

2.1.10 Antikörper

Primärantikörper:

mAk A18 – gegen das virale Strukturprotein E2 gerichteter monoklonaler Antikörper
(Weiland *et al.*, 1990)

mAk 24/16 – gegen das virale Strukturprotein E^{ms} gerichteter monoklonaler Antikörper; aus dem Kulturüberstand der Hybridomzellen 24/16 isoliert

mAk M2 – gegen das FLAG-Peptid gerichteter monoklonaler Antikörper; Fa. Sigma

Sekundärantikörper:

Ziege anti-Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase-konjugiert; Fa. Dianova

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschläuche	Fa. Millipore/Spektrum
Einmalspritzen	Fa. Braun
Filterpapier	Fa. Whatman
Gewebekulturgefäße	Fa. Falcon
Mikrotiterplatten	Fa. Falcon
Nitrocellulosemembran	Fa. Pall
Nukleobond AX 100-Säulen	Fa. Macherey & Nagel
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf
Röntgenfilm Biomax	Fa. Kodak
Ultrafiltrationsröhrchen	Fa. Amicon
Zentrifugationshülsen	Fa. Millipore

2.1.12 Geräte

Brutschränke mit CO ₂ -Begasung	Fa. Forma Scientific; Fa. Memmert
DNA-Sequenzierer LI-COR 4000 L	Fa. MWG
Elektroporationsapparatur	Fa. BioRad
Elektroporationsküvetten	Fa. BioRad
ELISA-Reader (SLT SPECTRA)	Fa. SLT Labinstrumente Deutschland GMBH
Flüssigszintillationszähler 1209 RACKBETA	Fa. Amersham-Pharmacia
Gelelektrophoresekammern für Agarosegele	Eigenbau, JLU Gießen
Gelelektrophoresekammern vertikal	Fa. Biorad
Gel-Dokumentationssystem	Fa. MWG
Glaswaren	Fa. Schott
Heizblock	Fa. Eppendorf
Kühlwasserbad RM6	Fa. LAUDA
Kühlschränke	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA-Works, INC
Mikroskop Eclipse TS 100	Fa. Nikon
Nass- <i>blot</i> -Apparatur	Fa. BioRad
PCR-Maschine DNA Thermal Cycler	Fa. Perkin Elmer

<i>Phosphorimager</i> BAS 1000	Fa. Fuji
<i>Phosphorimager imaging plates</i> BAS III	Fa. Fuji
Photometer	Fa. Pharmacia
Pipetten	Fa. Eppendorf; Fa. Gilson
Proteingelelektrophoresekammern	Fa. Biorad; Eigenbau, JLU Gießen
Reaktionsgefäße für DNA-Arbeiten	Fa. Eppendorf
Reaktionsgefäße für RNA-Arbeiten	Fa. Roth
Reinstwasseranlage	Fa. Purolab
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	Fa. AGFA
Schüttler	Fa. Infors
Sequenzgelelektrophoreseapparaturen	Fa. IBI; Fa. LI-COR
Spannungsgeräte	Fa. Biorad; Fa. Stratagene
Sterilbank	Fa. Heraeus
UV-Lampe	Fa. Bachofer
Vortex	Fa. IKA; Fa. Works
Wagen	Fa. Mettler
Wasserbad	Fa. Braun
Zentrifugen:	
Kühlzentrifuge Laborfuge 400R	Fa. Heraeus
Kühlzentrifuge RC-5B	Fa. Sorvall
Tischzentrifuge 5415C	Fa. Eppendorf
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Fa. Heraeus
Kühltischzentrifuge Biofuge fresco	Fa. Heraeus

2.1.13 spezielle Computerprogramme

Auswertungsprogramm für <i>Imaging Screens</i>	„Tina“, Version 2.09 der Firma raytest [©]
Auswertungsprogramm für Enzymkinetiken	Sigmablot der Firma SPSS-Science
Programm zum Erstellen einer Proteinstruktur	WHAT IF von Gerrit Vriend (früher: EMBL Heidelberg); Modeller von Andre Sali
Programm zur Bewertung der Proteinstruktur	Whatcheck , Threader

Programm zur Darstellung von Proteinstrukturen

RasMol v2.5 (University of Edinburgh
and the BioMolecular Structure
Department, Glaxo Research and
Development, U.K.)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturtechniken für Säugerzellen

2.2.1.1 Medien und Puffer

Dulbecco's MEM

mit Zusätzen (10 l):

Dulbecco's MEM Pulvermedium; GIBCO (Invitrogen Corporation)

0,0178 g/l	L-Alanin
0,03 g/l	L-Asparaginsäure
0,07 g/l	Glycin
0,075 g/l	L-Glutaminsäure
0,025 g/l	L-Prolin
0,1 mg/l	Biotin
0,025 g/l	Hypoxantin
3,7 g/l	NaHCO ₃

Vor Gebrauch wurden 10 %iges fötales Kälberserum (FKS), 100 000 IU/l Penicillin und 0,1 g/l Streptomycin zugegeben.

Trypsinlösung:

8,0 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
1,44 g/l	Na ₂ PO ₄
0,2 g/l	KH ₂ PO ₄
2,5 g/l	Trypsin (1:250)
1,23 g/l	Versen (EDTA)
0,016 g/l	Phenolrot
mit 1 N HCL auf pH 7,4 einstellen	

PBS defiz.:

0,25 g/l	KCl
1,8 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
0,25 g/l	KH ₂ PO ₄
10 g/l	NaCl

PBS:

PBS defiz.	
0,1 g/l	CaCl ₂
0,1 g/l	MgCl ₂ x 6 H ₂ O

2.2.1.2 Allgemeine Zellkulturarbeiten

PK 15-, Sk 6- und BHK 21-Zellen wurden in Brutschränken des Typs Steri-Cult 2000 der Firma Forma Scientific bei 5 % CO₂, 37 °C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken des Typs LaminAir der Firma Heraeus durchgeführt.

Bei PK 15- und Sk 6-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Schweinenieren-Zelllinien; BHK 21-Zellen sind ebenfalls adhärent wachsende Zellen einer Baby Hamster Nieren-Zelllinie. Die Zellen wurden in Dulbecco's MEM mit Zusätzen kultiviert. Nach Erreichen des konfluenten Zustandes erfolgte die Passage der Zellen. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit 5 ml Trypsin-Lösung inkubiert. Bevor sich die Zellen von der Platte ablösten, wurde das Trypsin abgesaugt und die Zellen noch zwei bis drei Minuten im Brutschrank belassen. Hiernach erfolgte die Aufnahme der Zellen in Medium und in geeigneten Verdünnungen die Verteilung auf frische Kulturschalen. Um Hybridomzellen (24/16) zu passagieren, konnte auf eine Trypsinbehandlung vor dem Abspülen der Zellen vom Boden der Kulturschale verzichtet werden, da diese Zellen nicht fest am Boden der Kulturschale haften.

2.2.1.3 Transfektion von DNA in PK 15- und BHK 21-Zellen bzw. von RNA in Sk 6-Zellen

Für das Einbringen von DNA in PK 15- und BHK 21-Zellen wurde die kationische Trägersubstanz Superfect (QIAGEN[®]) verwendet. Superfect Reagent ermöglicht die endosomale Aufnahme von DNA. Weiterhin puffert das Reagent den pH-Wert im Lysosom, sobald die Fusion von Endosom und Lysosom stattgefunden hat, wodurch ein Transport der auf diese Weise stabilisierten DNA zum Zellkern ermöglicht wird. Für die Transfektion wurden 2,5 µg DNA mit 10 µl Reagent gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl Dulbecco's MEM ohne FKS und Antibiotikazusatz wurde, nachdem der Zellüberstand abgesaugt worden war, ein Ansatz auf die Zellen einer Aussparung einer 6-Loch-Gewebekulturschale (1×10^2 Zellen) gegeben. Damit die Zellen sich zum Zeitpunkt der Transfektion in einer exponentiellen Wachstumsphase befanden, wurden sie am Vortag entsprechend ausgesät (konfluente PK 15-Zellen wurden in einer Verdünnung von 1:3 ausgesät; BHK 21-Zellen 1:12). Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 h im Brutschrank erfolgte ein Mediumwechsel mit Dulbecco's MEM inklusive FKS und Antibiotikazusatz.

Für das Einbringen von RNA in Sk 6-Zellen wurde die Elektroporation verwendet, da mit Hilfe dieser Methode schon gute Ergebnisse erzielt worden sind. Hierbei wird mittels eines kurzen elektrischen Impulses die Zellmembran kurzzeitig permeabilisiert, und die RNA kann auf die Weise in das Zellinnere gelangen. Für die Transfektion wurden am Vortag konfluente Sk 6-Zellen in einer Verdünnung von 1:5 ausgesät. Pro Elektroporation mussten etwa 1×10^6 Zellen (die Hälfte der Zellen einer Gewebekulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm) verwendet werden. Im Gegensatz zur Transfektion mit Superfect war es für die Transfektion mittels Elektroporation notwendig, die Zellen mit Trypsin-Lösung von der Kulturschale zu lösen. Um Reste von Trypsin zu inaktivieren wurden die gelösten Zellen in FKS-haltigem Zellkulturmedium gewaschen (zentrifugieren bei 194x g für 5 min), bevor nach erneuter Pelletierung der Zellen, die Zellen mit PBS defiz. (frei von Mg^{2+} und Ca^{2+}) gewaschen wurden. Anschließend wurden die Zellen in defizientem PBS aufgenommen (pro Elektroporationsansatz 300 μ l PBS defiz.) und auf die Elektroporationsküvetten (Durchmesser: 2 mm) verteilt. Sofort nach Zugabe der RNA (1 μ g RNA/Elektroporationsansatz) erfolgte die Elektroporation bei 0,18 kV, 950 μ F, ∞ Ohm. Anschließend wurden die Ansätze mit 3 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium aufgefüllt, in 6-Loch-Gewebekulturschalen ausgesät und für 12 h bis 72 h im Brutschrank inkubiert.

2.2.1.4 Wachstumskurven

Der Phänotyp eines Virus lässt sich häufig durch seine Wachstumseigenschaften charakterisieren. Zur Durchführung der Wachstumskurven von rekombinanten Viren wurden die *in vitro* Transkripte eines infektiösen cDNA-Klones in Sk 6-Zellen transfiziert (siehe 2.2.1.7). Nach Transfektion in empfängliche Zellen findet zunächst die Translation der *in vitro* Transkripte statt. Hierbei wird ein Polyprotein synthetisiert, das anschließend in die einzelnen virusspezifischen Proteine prozessiert wird. Während dieser Prozessierung entstehen unter anderem virale Nichtstrukturproteine, die wiederum für die Replikation des Plusstrang-RNA-Genoms essentiell sind. Ausgehend von der transfizierten cRNA wird zunächst Minusstrang-RNA transkribiert, die dann als Matrixe für die Plusstrang-RNA-Synthese dient. Sich anschließende Prozesse der Virusvermehrung sind Morphogenese und Reifung der Viruspartikel. Um spätere Ergebnisse der Virusvermehrung verschiedener rekombinanter Viren direkt vergleichen zu können, wurde zu Beginn der Anfertigung von Wachstumskurven die „spezifische Infektiosität“ der von diesen cDNA-Gesamtklonen transkribierten cRNAs bestimmt. Als „spezifische Infektiosität“ wird der Transfektionserfolg

gemessen, d. h. die Anzahl antigenpositiver Zellen, bezogen auf die Menge transfizierter cRNA. Der Wert ist somit ein Maß für die Fähigkeit eines bestimmten Transkripts eine Infektion zu initiieren. Zur Bestimmung der spezifischen Infektiosität wurden vier Verdünnungsstufen angelegt: 100 ng, 10 ng, 1 ng und 0,1 ng. Anschließend wurden die verschiedenen Verdünnungsstufen des Transkripts in SK 6-Zellen elektroporiert. Nach der Transfektion wurden die in 3 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium enthaltenen Zellen in ein Loch einer 6-Loch-Gewebekulturschale ausgesät und mit jeweils 2 ml Medium überschichtet. Nach 24 h erfolgte der Nachweis antigenpositiver Zellen durch die Durchführung eines immunhistochemischen Nachweises. Durch Auszählen der Anzahl antigenpositiver Zellareale bei einer bestimmten Verdünnung konnte die spezifische Infektiosität des Transkripts berechnet werden.

Falls die Werte der „spezifischen Infektiosität“ der verschiedenen cRNAs vergleichbar hoch sind, kann anschließend die quantitative Analyse der ausgehend von 1 µg cRNA gebildeten infektiösen Viren erfolgen. Da die Werte für die „spezifische Infektiosität“ der in dieser Arbeit untersuchten cRNAs vergleichbar waren ($\sim 1-15 \times 10^5$ Zellen/µg cRNA), wurde nun der Virustiter bestimmt. Hierfür wurden die in 3 ml FKS-haltigem Zellkulturmedium enthaltenen Zellen nach der Elektroporation in eine Vertiefung einer 6-Loch-Gewebekulturschale ausgesät und mit jeweils 2 ml Medium überschichtet. Nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h wurde der Zellkulturüberstand geerntet und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Überstände wurden bis zur Durchführung der Titration zur Bestimmung der Virustiter bei -70°C gelagert.

2.2.1.5 Titration zur Bestimmung des Virustiters

Die Virustitration erfolgte auf 24-Loch-Gewebekulturschalen, in die Sk 6-Zellen in einer Verdünnung von 1:3 ausgesät und über Nacht kultiviert worden waren. Von dem zu testenden Überstand wurden in Zehnerschritten vier Verdünnungsstufen in FKS-haltigem Zellkulturmedium angelegt, beginnend mit der Verdünnung von 1:10. Von den Kulturen wurde das Medium abgenommen; das erste Loch erhielt 100 µl des unverdünnten Virusstocks, die weiteren jeweils 100 µl der jeweiligen Virusverdünnungen. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei 37°C wurde pro Loch 0,5 ml FKS-haltiges Medium zugegeben. Anschließend erfolgte eine Inkubation bei 37°C für etwa 24 h. Danach wurden die Zellen für den indirekten immunhistochemischen Nachweis mit Methanol/Aceton fixiert. Zur Ermittlung des Virustiters/ml wurde der Mittelwert aus der Anzahl antigenpositiver angefärbter Zellareale der beiden letzten Verdünnungsstufen gebildet.

2.2.1.6 Indirekter immunhistochemischer Nachweis

Aminoethylcarbazol (AEC)

-enthaltendes Substrat:	9,25 ml	AEC in Dimethylformamid (4 mg/ml)
	0,75 ml	50 mM Na-Acetat pH 5,2
	5 µl	H ₂ O ₂ (30 %)

Die Infektion von Sk 6-Zellen durch KSPV ist nicht durch die Ausbildung eines zytopathischen Effektes begleitet. Um die spezifische Infektion von Sk 6-Zellen mit KSPV nachzuweisen, wurde ein indirekter immunhistochemischer Nachweis mit einem KSPV-spezifischen Antikörper durchgeführt. Hierbei handelt es sich um den gegen das virale Strukturprotein E2 gerichteten monoklonalen Antikörper A18.

Die Zellen wurden nach zweimaligen Waschen mit PBS für 15 min bei -20 °C mit Methanol/Aceton (1:1) fixiert, anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und mit PBS rehydriert. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 2 h bei RT mit dem mAk A18 als Primärantikörper in einer Konzentration von 1:10 in PBS. Die Zellen wurden vor Zugabe des Sekundärantikörpers zweimal für 5 min mit PBS gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde ein Peroxidase-konjugierter anti-Maus IgG-Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 in PBS verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT und zweifachem Waschen für jeweils 5 min mit PBS erfolgte die Detektion der Antikörperbindung durch Inkubation mit AEC-enthaltenem Substrat, das durch die Peroxidase in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt wurde. Während der Inkubation mit dem Substrat wurde die Reaktion vor Licht geschützt.

Zur Kontrolle der Proteinexpression von E^{rms} in BHK 21-Zellen wurde ebenfalls ein immunhistochemischer Nachweis durchgeführt. Als Primärantikörper wurde der monoklonale Antikörper 24/16 in einer Konzentration von 1:5 verwendet; bei zusätzlicher Expression einer Oktapeptidsequenz (DYKDDDDK, sog. FLAG-Tag) im N-Terminus des E^{rms}, wurde der monoklonale Antikörper M2 (SIGMA[®]) als Primärantikörper 1:100 verdünnt eingesetzt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (*goat-anti-mouse-IgG*, Konjugat mit Peroxidase, Sigma[®]) in einer Verdünnung von 1:1000.

2.2.1.7 Sandwich-ELISA

Lösungen :

TMB-Puffer:	100 mM	Na-Acetat
	0,05 %	Tween

TMB-Substrat-Stock:	10 mg 4 ml	TMB DMSO
TMB-Substrat:	9 ml 1 ml 1,5 µl	Puffer Substrat-Stock H ₂ O ₂

Für den E^{ms}-Nachweis wird der mAk 24/16 sowohl als Fänger- als auch als Detektionsantikörper verwendet. Die Beschichtung der ELISA-Platten (Nunc-Immuno Plate MaxiSorpTM) mit dem Fängerantikörper erfolgte mit je 5 µl 50-F-4-11 PFM (Hybridomzellüberstand des mAk 24/16) in 45 µl PBS/Loch für 1 h schüttelnd bei 37 °C. Nachdem ein Waschschrift mit PBS/TWEEN 0,05 % durchgeführt worden war, wurden freie Bindestellen der ELISA-Platte durch die unspezifische Bindung von bovinem Serumalbumin blockiert. Hierzu erfolgte erneut unter leichtem Schütteln die einstündige Inkubation mit 1 % BSA in PBS/TWEEN 0,05 % bei RT. Nach diesem Schritt war es möglich, die so präparierte ELISA-Platte bis zum Gebrauch bei -20 °C aufzuheben oder direkt zu verwenden.

Zur Bestimmung der Proteinmenge von E^{ms} in Zelllysaten wurde nun eine 1:3 Verdünnungsreihe der Zelllysate in PBS durchgeführt. Hierzu wurden 75 µl Zelllysate der einzelnen E^{ms}-Mutanten in die Löcher der ersten Reihe der ELISA-Platte (Loch 1-11, Reihe A) gefüllt. Das Loch 12 der ersten Reihe enthielt als Referenzwert 100 ng in Insektenzellen erzeugtes und aufgereinigtes E^{ms}, das ebenfalls in 75 µl PBS verdünnt vorlag. Auch von dieser Probe wurde eine 1:3 Verdünnungsreihe in PBS angelegt. Nachdem von allen Proben acht Verdünnungsstufen vorlagen, erfolgte eine eineinhalbstündige Inkubation bei RT. Bevor der Detektionsantikörper zugegeben wurde, wurden die Proben dreimal mit PBS gewaschen. Als Detektionsantikörper wurde ein biotinylierter anti-E^{ms} monoklonaler Antikörper (mAk 24/16 biotinyliert) in einer Verdünnung von 1:2000 in 1 % BSA/PBS/TWEEN 0,05 % zugegeben und für 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Nach 5 Waschschriften mit PBS wurde ein mit dem Enzym Streptavidinperoxidase gekoppelter monoklonaler anti-Maus Antikörper (SAPO) in einer Konzentration von 1:2000 in 1 % BSA/PBS/TWEEN 0,05 % zugegeben und erneut 1 h schüttelnd bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit erfolgten 5-8 Waschschriften bevor die Detektion der Antikörperbindung durch Inkubation mit TMB-Substrat, das durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers in einen Farbstoff umgesetzt wird, sichtbar gemacht wurde. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe gleicher Menge 1:4 verdünnter H₂SO₄. Die Extinktionen wurden im ELISA-Reader bei 450 nm gemessen. Über den Vergleich der Extinktionen der E^{ms}-haltigen Zelllysate mit der Extinktion

des aufgereinigten E^{ms} definierter Konzentration konnten die Proteinmengen in den Zelllysaten bestimmt werden.

2.2.1.8 Zellyse

Lysepuffer: 1 % Triton X-100 (w/v) in 50 mM Tris/HCL pH 8,0

Alle Schritte der Zellyse fanden bei 0 °C statt. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend mit Lysepuffer für 10 min inkubiert. Während die Zellwände aufgebrochen werden, bleiben die Zellkerne intakt und haften am Boden der Kulturschale, so dass das Lysat nicht durch Nukleinsäuren kontaminiert wird. Vor der weiteren Verwendung der Lysate wurden diese durch Zentrifugation (1000x g) geklärt und anschließend filtriert (Porengröße 0,45 µm).

2.2.1.9 SDS-PAGE nach Laemmli

Lösungen für das Laemmli-Gelsystem:

Probenpuffer:	6 M	Harnstoff
	62,5 mM	Tris-HCL pH 6,8
	2 %	SDS
	10 %	Glycerol (v/v)
	5 %	β-Mercapto-ethanol (v/v), nur bei reduzierenden Gelen
	0,025 %	Bromphenolblau (w/v)
	0,025 %	Phenolrot (w/v)

Molekulargewichtsstandard: prestained marker protein; GIBCO

Coomassie Färbelösung:	45 %	Methanol (v/v)
	10 %	Essigsäure (v/v)
	45 %	H ₂ O bidest. (v/v)
	2,5 %	Coomassie R250 (w/v)

Fixierlösung:	45 %	Methanol (v/v)
	10 %	Essigsäure (v/v)
	45 %	H ₂ O bidest. (v/v)

Acrylamidlösung (40:1):	40 %	Acrylamid (w/v)
	1 %	N,N'-Methylen Bisacrylamid (w/v) in H ₂ O bidest.

2x Sammelgelpuffer: 0,25 M Tris-HCl pH 6,8

2x Trenngelpuffer: 0,75 M Tris-HCl pH 8,8

10x Elektrodenpuffer:	0,25 M 1 % 1,925 M	Tris-HCl pH 8,3 SDS Glycin
Ammoniumpersulfat:	10 mg/ml in H ₂ O bidest. (Stammlösung), jeweils frisch angesetzt	
Glycerin:	87 % (v/v) (Stammlösung)	
SDS-Lösung:	10 % (w/v) in H ₂ O bidest. (Stammlösung)	

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wurde das SDS-PAGE System von *Laemmli* (1970) verwendet (Trenngel 10-11 % Acrylamid-Endkonzentration, Sammelgel 4 % Acrylamid-Endkonzentration). Die Elektrophoresen wurden mit einer vertikalen Elektrophoreseapparatur durchgeführt. Proteinproben wurden vor dem Auftragen in jeweils gleichem Volumen an Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95 °C erhitzt. Falls die Proteine reduziert werden sollten, wurde dem Probenpuffer 5 % β -Mercapto-ethanol zugemischt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 V im Sammelgel und bei 120 V im Trenngel. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Trenngel mit Coomassie Färbelösung für 1 h inkubiert oder für die Immunoblot-Analyse weiterverwendet. Mit Coomassie Blau gefärbte Gele wurden mit Fixierlösung entfärbt. Im Anschluss an die Färbereaktion konnten die Gele durch das Einspannen in einen 14x 14 cm Rahmen zwischen zwei Cellophan-Membranen (Roth[©]) getrocknet werden.

2.2.1.10 Immunoblot-Analyse von Proteinen (western blot)

Material und Lösungen:

Transferpuffer:	48 mM 39 mM 20 % (pH 8,3)	Tris-HCl Glycin Methanol
Nitrozellulosemembran:	Pure nitrocellulose (Pall [©])	
Blockierlösung:	2,5 % Milchpulver (w/v) in PBS/Tween 0,05 %	
Waschpuffer:	PBS/TWEEN 0,05 %	
Peroxidase Reaktion:		
Western blot chemiluminescence reagent plus (Renaissance [®] ; NEN TM)		
-Oxidizing Reagent		
-Enhanced luminol Reagent		

Prinzip:

Mit dieser Methode können Proteine über ihre Reaktion mit einem Antikörper detektiert werden. Die Proteine werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und aus diesem auf eine Nylon- oder Nitrozellulosemembran transferiert. Auf dieser kann dann eine Reaktion mit einem ersten Antikörper (Ak) stattfinden, der spezifisch nur das gesuchte Protein erkennt und bindet. Anschließend wird ein zweiter Ak gegen den ersten Ak zugesetzt. Dieser sekundäre anti-Ak ist mit einem Enzym (meist Meerrettich-Peroxidase oder alkalische Phosphatase) gekoppelt, das nach Zugabe eines entsprechenden Substrates eine Farbreaktion katalysiert.

E^{ms} spezifisch:

Nach Beendigung der SDS-PAGE wurde das Sammelgel vom Trenngel entfernt und das Trenngel weiterverwendet. Es erfolgte der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran in einer „Nassblot“ Apparatur (BioRad[®]) nach Vorschrift des Herstellers bei 78 V für 1 h oder bei 12 V für ca. 14 h (4 °C). Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran für mindestens eine Stunde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierlösung inkubiert. Nun wurde dreimal für je 15 min mit Waschpuffer gewaschen, danach erfolgte die Zugabe des ersten Antikörpers (mAk 24/16, 1:5 verdünnt) in Waschpuffer. Die Membran wurde für mindestens 1,5 Stunden inkubiert und anschließend dreimal für je 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für 1 h mit dem zweiten Antikörper (*goat-anti-mouse-IgG*, Konjugat mit Peroxidase, Sigma[®]) in einer Verdünnung von 1:10000. Danach wurde wiederum dreimal für je 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Die 6x 8 cm große Membran wurde anschließend mit 0,7 ml Oxidizing Reagent und 0,7 ml Enhanced luminol Reagent für 3 min inkubiert. Dann erfolgte eine Autoluminographie für 1 min.

2.2.2 Proteinexpression in Bakulovirussystem und Proteinaufreinigung**2.2.2.1 Medien und Puffer**

SF-900-Medium:	von GIBCO	
TC-100-Medium:	von GIBCO	
Extraktionspuffer:	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 %	NP40
	10 %	Glycerin

Waschpuffer 0:	50 mM Tris-HCl pH 8,0
Waschpuffer 1:	1 M NaCl 1 % NP40 10 % Glycerin in PBS
Waschpuffer 2:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 10 % Glycerin 1 % Octylglucosid
Elutionspuffer:	4 M MgCl ₂ 150 mM NaCl 10 % Glycerin 0,5 % Octylglucosid pH mit 1 M Tris-HCl pH 8,0 auf etwa pH 7,2 einstellen
Dialysepuffer:	50 mM Tris-HCl pH 8,0 150 mM NaCl 5 % Glycerin

2.2.2.2 Anzucht von SF 21-Zellen

Zellkulturarbeiten wurden unter Sterilbänken des Typs LaminAir der Firma Heraeus durchgeführt. Die Aufzucht der SF 21-Zellen erfolgte in Gewebekulturflaschen (175 mm²) bei 26 °C im Brutschrank. Zwei Mal in der Woche mussten die Insektenzellen unter sterilen Bedingungen passagiert werden. Dazu wurde der Zellüberstand, der aus dem Sf-900-Nährmedium bestand, bis auf ca. 5 ml abgenommen. Durch Klopfen wurden die Zellen anschließend vom Untergrund gelöst und mit dem Nährmedium in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Noch in der Gewebekulturflasche haftende Zellen wurden mit 5 ml Sf-900-Nährmedium abgespült und ebenfalls in das 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nun wurden die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 194x g pelletiert. Nachdem der Überstand abgenommen worden war, erfolgte die Suspension des Zellpellets in 5 ml Sf-900-Nährmedium. Zum Passagieren der Zellen wurde 1/8 bis 1/4 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gegeben und mit 10 ml Sf-900 Medium aufgefüllt. Bis zur nächsten Zell-Passage wurden die Gewebekulturflaschen bei 26 °C gelagert.

2.2.2.3 Infektion von Zellen

Zur Infektion von Zellen wurde Bakulovirus-haltiger Zellüberstand verschiedener E^{ms}-Mutanten, der in einer dieser Arbeit vorausgehenden Diplomarbeit erzeugt worden ist, verwendet. Die Lagerung des Überstandes bis zur Infektion erfolgte bei -70 °C. Die zu infizierenden SF 21-Zellen wurden am Vortag 1:5 in TC-100 + FKS aufgenommen und so ausplattiert, dass die Zellen mit Medium bedeckt waren. Nach Abnahme des Überstandes wurden 7 ml virushaltiger Überstand auf die Zellen gegeben und erneut soviel TC-100 + FKS-Medium zugefügt, dass die Zellen bedeckt waren. Nun erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit gelegentlichem Schwenken. Dann wurde der Überstand abgenommen und durch eine 10fache Menge TC-100 + FKS/Sf-900-Medium (Verhältnis 9:1) ersetzt. Nach 3 bis 5 Inkubationstagen bei 26 °C konnte der virushaltige Überstand geerntet und die Zellen mit Extraktionspuffer versetzt werden.

2.2.2.4 Extraktion von E^{ms} aus SF 21-Zellen

Die SF 21-Zellen von 3x 175 mm² Gewebekulturflaschen wurden 5 min bei 200x g pelletiert, der Überstand verworfen oder eingefroren (-70 °C) und die SF 21-Zellen mit 10 ml Extraktionspuffer versetzt. Damit eine vollständige Proteinextraktion stattfinden konnte, wurde der Ansatz über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Anschließend wurde der Zellextrakt eine Stunde bei 3000x g zentrifugiert und der Überstand steril filtriert. Das Filtrat wurde entweder eingefroren (-70 °C) oder direkt für die E^{ms}-Aufreinigung verwendet.

2.2.2.5 Affinitätsreinigung monoklonaler Antikörper (mAk)

Puffer A:	50 mM	Tris-HCl pH 8,0
Puffer B:	50 mM 1 M	Tris-HCl pH 8,0 NaCl
Elutionspuffer:	50 mM 3,5 M	Tris-HCl pH 7,2 MgCl ₂
Dialysepuffer:	20 mM 5 %	Tris-HCl pH 8,0 Glycerin
Dialyseschlauch:	10 kDa „cut off“, vor Gebrauch in H ₂ O bidest und 2 mM EDTA ausgekocht	

Die Reinigung von mAk erfolgte im Wesentlichen nach den Vorschriften von Harlow & Lane (1988). An Sepharose immobilisiertes Protein A aus *Staphylococcus aureus* bindet selektiv Antikörper (in erster Linie IgG) vieler Spezies, indem es mit dem Fc-Anteil des IgG-Moleküls interagiert. Aus diesem Grund lässt sich der monoklonale Antikörper 24/16, der von Hybridomzellen ins Medium sezerniert wird, über eine Affinitätsreinigung aufreinigen.

Zur Aufreinigung wurden 400 ml Hybridomzellüberstand verwendet. Nachdem der Überstand bei 3000x g zentrifugiert worden war, wurde 1/20 Volumen an 1 M Tris-HCl pH 8,0 zum Überstand gegeben. Hierdurch erfolgte eine pH-Wert Angleichung im neutralen Bereich. Nach Filtration des Hybridomzellüberstandes erfolgte die Absorption des mAk's durch 1 ml Protein A gekoppelte Sepharose-Säule (Fa. Pharmacia[®]) bei einer Durchflussrate von 30 ml/h, nachdem die Säule zuvor durch Zugabe von Puffer A äquilibriert worden war. Anschließend wurde die Säule mit jeweils 20 ml Puffer A und B gewaschen und die absorbierten Antikörper mit 10 ml Elutionspuffer aufgeteilt in 10 Elutionsfraktionen eluiert. Um die Fraktionen aufzuspüren, die Antikörper enthalten, wurden von jeder Elutionsfraktion jeweils 5 µl in einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. Anschließend wurden die entsprechenden Eluate dialysiert, um die Antikörper von dem MgCl₂-haltigen Elutionspuffer zu befreien. Die Dialyse erfolgte bei 4 °C 12-16 h lang gegen 5 l Dialysepuffer, der einmal ausgetauscht wurde. Anschließend wurde der Antikörper auf ca. 10 ml eingeeengt, und die Menge mit dem BCA-Test ermittelt. Die Konzentration des Antikörpers betrug etwa 0,8 mg/ml.

2.2.2.6 Kopplung von monoklonalen Antikörpern an Protein A-Sepharose

Puffer A:	50 mM Tris-HCl pH 8,0
Puffer B:	0,2 M Na-Borat pH 9,0
Puffer C:	0,2 M Ethanolamin in H ₂ O bidest. pH 8,0
Puffer D:	PBS mit 0,02 % NaNO ₃

Die vorgequollene Protein A-Sepharose (Beads) wurde zweimal mit je ca. 10 ml Puffer A gewaschen (10 min bei 1773x g zentrifugieren). Nach Zugabe des mAk (ca. 5 mg/ml Agarose) zu 10 ml Puffer A wurde das Gemisch in einem verschließbaren Gefäß („batch“-Verfahren) für 2 h bei RT geschwenkt. Nach zweimaligem Waschen mit je ca. 10 ml Puffer B wurde das mAk-Sepharosegemisch in 10 ml Puffer B suspendiert und eine Probe von ca. 1 µl Beads genommen. Die Kopplungsreaktion wurde durch Zugabe von DMP

(Dimethylpimelimidat fest, auf eine Endkonzentration von 20 mM eingestellt) eingeleitet, der pH-Wert überprüft (muss über 8,3 liegen) und der Ansatz 1 h bei RT inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Waschen der abzentrifugierten Protein A Sepharose mit 10 ml Puffer C. Erneut wurde eine Probe von ca. 1 µl Beads genommen. Die konjugierte Agarose wurde mit Puffer C 12 h bei 4 °C (im „batch“-Verfahren, rotierend) geblockt, mit Puffer D gewaschen und bei 4 °C aufbewahrt. Da nur die schwere IgG Kette kovalent an die Protein A-Sepharose gekoppelt wird, kann die erfolgreiche Kopplung im SDS-PAGE durch den Nachweis der leichten Kette überprüft werden.

2.2.2.7 Reinigung des rekombinanten E^{rns}

Nach zweimaligem Waschen der immobilisierten mAk 24/16 Affinitätsmatrix (Volumen ca. 100-150 µl) mit jeweils 10 ml Waschpuffer 0, wurden 3 ml Zellextrakt (siehe 2.2.2.4) zugegeben und für 12 h bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Abnahme des Zellextrakts wurde die Matrix zweimal mit 10 ml Waschpuffer 1 und zweimal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution mit 2x 4 ml Elutionspuffer bei RT für jeweils 10 min.

2.2.2.8 Konzentrierung des E^{rns}

Nach Dialyse wurde das stark verdünnte E^{rns} durch Zentrifugation in Ultrazentrifugationskammern (Ultrafree[®] von Millipore[©], 10 kDa „cut off“) um den Faktor 1:100 auf etwa 200 µl eingengt.

2.2.2.9 BCA Proteinbestimmung

Reagenz A:	8 %	NaCO ₃
	1,6 %	NaOH
	1,5 %	Na-Tartrat
	auf pH 11,25 mit festem NaHCO ₃ einstellen	
Reagenz B:	4 % BCA-Na ₂ (BCA = Bi-chinolin-dicarbonensäure)	
Reagenz C:	4 % CuSO ₄ x 5 H ₂ O (frisch ansetzen)	
Reagenz D:	50 Teile Reagenz A + 48 Teile B + 2 Teile C, vor Gebrauch ansetzen und gut mischen	
Eichprotein:	BSA 1 mg/ml in PBS	

Ein Aliquot des aufgereinigten E^{tns} (5-10 µl) wurde mit H₂O bidest. auf 0,5 ml aufgefüllt. Mit Hilfe des Eichproteins (BSA) wurde eine Verdünnungsreihe erstellt (0; 1; 2; 5; 10; 15; 20 µg), dazu wurde das BSA mit H₂O bidest. auf 0,5 ml aufgefüllt. Da das im Dialysepuffer enthaltene Glycerin Einfluss auf das Ergebnis hatte, wurde der Verdünnungsreihe ebenfalls Dialysepuffer beigemischt. Die Menge des eingesetzten Dialysepuffers entsprach der eingesetzten Menge des E^{tns}. Die in 0,5 ml verdünnten Proteine wurden mit 0,5 ml Reagenz D versetzt und gut gemischt. Die Inkubation erfolgte bei ca. 60 °C im Wasserbad für 1 h. Nachdem die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt waren, wurde die Extinktion im ELISA-Reader bei 550 nm gemessen.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Anzucht von Bakterien

LB-Medium:	10 g/l	Trypton
	5 g/l	Hefeextrakt
	10 g/l	NaCl
	mit 1 N NaOH auf pH 7,5 einstellen	

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5 %iger Agar zugesetzt. Alle Medien wurden autoklaviert. Durch den Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) zum Medium konnte eine Selektion von plasmidhaltigen Bakterien mit entsprechenden AB-Resistenzgenen erreicht werden. Bakterien wurden über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien erfolgte der Zusatz von Ampicillin (100 µg/ml) zum Kulturmedium.

2.2.3.2 Plasmidisolierung

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurden je nach Verwendungszweck Mini- (bis 10 µg DNA) oder Midipräparationen (bis 100 µg DNA) durchgeführt.

Minipräparation (Macherey & Nagel)

Lösung P1:	50 mM	Tris-HCL, pH 8,0
	10 mM	EDTA

Lösung P1/RNase:	Lösung P1	
	0,1 mg/ml	RNase A

Lösung P2: 0,2 M NaOH
 1 % SDS

Lösung P3: 2,55 M Kalium-Acetat, pH 5,5

Die Präparation kleinerer DNA-Mengen (bis 10 µg) wurde durch Alkalische Lyse (*Sambrook et al.*, 1989) durchgeführt. Eine 5 ml Bakterienkultur wurde über Nacht inkubiert. 1,5 ml der Kultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in einer Tischzentrifuge mit ca. 10000x g 5 min lang abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene Sediment in 250 µl der Lösung P1/RNase resuspendiert. Dann wurden 250 µl der Lösung P2 hinzugegeben. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurden 250 µl der Lösung P3 zugegeben, die Suspension wurde gemischt und nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 10000x g wurde der Überstand vorsichtig in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde mit 400 µl Isopropanol-präzipitiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 40µl H₂O bidest. resuspendiert.

Midipräparation (Macherey & Nagel)

Lösungen P1-P3 wie für Minipräparation beschrieben

Puffer N2: 100 mM Tris
 900 mM KCl
 15 % Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 6,3 einstellen

Puffer N3: 100 mM Tris
 1150 mM KCl
 15 % Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 6,3 einstellen

Puffer N5: 100 mM Tris
 1000 mM KCl
 15 % Ethanol
 mit H₃PO₄ auf pH 8,5 einstellen

Zur Präparation größerer DNA-Mengen (bis 100 µg) aus 50 ml Übernachtskulturen wurden Nukleobond AX 100-Säulen der Firma Macherey & Nagel verwendet. Die Bakterien wurden in „Bluecaps“ für 10 min bei 3939x g pelletiert. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 4 ml der Lösung P1/RNase resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml der Lösung P2 wurde der Ansatz vorsichtig gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 4 ml der Lösung P3 hinzugegeben und der Ansatz erneut vorsichtig durch Invertieren gemischt.

Während der folgenden 15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur kam es zur Präzipitation der bakteriellen Proteine sowie der chromosomalen DNA. In der Zwischenzeit wurde eine Nukleobond AX 100-Säule mit 3 ml der Lösung N2 äquilibriert. Das präzipitierte Material wurde durch Filtration entfernt und die klare, plasmidhaltige Phase auf die äquilibrierte Säule gegeben. Hiernach wurde die Säule zweimal mit jeweils 10 ml der Lösung N3 gewaschen und die an die Säule gebundene Plasmid-DNA durch Zugabe von 3 ml der Lösung N5 eluiert. Jeweils 1 ml Eluat wurden mit 700 µl Isopropanol-präzipitiert und die pelletierte DNA anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Die luftgetrocknete DNA wurde in 100 µl H₂O bidest. resuspendiert.

2.2.3.3 Herstellung kompetenter Bakterien

TFB I:

30 mM	KOAc
100 mM	RbCl
10 mM	CaCl ₂
50 mM	MnCl ₂
15 %	Glycerol

mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und steril-filtrieren

TFB II:

10 mM	MOPS
75 mM	CaCl ₂
10 mM	RbCl
15 %	Glycerol

mit KOH auf pH 6,5 einstellen und steril filtrieren

Um *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA effektiv zu transformieren, müssen sie zuerst kompetent gemacht werden. Dazu wurden 250 ml LB-Medium mit 1:100 einer Übernacht-Kultur angeimpft. Die Kulturen wurden bei 37 °C geschüttelt, bis eine OD₆₀₀ von 0,5- 0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5 min bei 3939x g, 4 °C). Das Bakterienpellet wurde in 100 ml eisgekühltem TFB I-Medium aufgenommen, resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (5 min bei 3939x g, 4 °C), das Pellet in 10 ml eiskaltem TFB II resuspendiert, für 1 h auf Eis inkubiert, anschließend aliquotiert und bei -70 °C eingefroren und gelagert.

2.2.3.4 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Zur Transformation wurden pro Ansatz 50 µl kompetente Bakterien (*E.coli* K12-Stamm HB 101) mit etwa 50 ng Plasmid-DNA oder 10-15 µl Ligationsansatz für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 1 min bei 37 °C wurden die Transformationsansätze mit LB-

Medium auf 0,5 ml aufgefüllt, 30 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten (LB/Amp) ausplattiert. Die Platten wurden bei 37 °C für 12 h bis 18 h inkubiert; einzelne Kolonien wurden zum Animpfen von Kulturen für Minipräparationen oder Midipräparationen (siehe 2.2.3.2) verwendet.

2.2.3.5 Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

Eine Phenol/Chloroform-Extraktion dient zur weitgehenden Entfernung von kontaminierenden Proteinen aus nukleinsäurehaltigen Lösungen. Proteine reichern sich hierbei in der Interphase an.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1) wurde im Volumenverhältnis von 1:1 zur Nukleinsäurelösung gegeben, der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend zur Verbesserung der Phasentrennung für ca. 5 min in einer Haereus-Tischzentrifuge bei 10000x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase enthielt die Nukleinsäuren und konnte vorsichtig in ein zweites Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt werden. Um Spuren von Phenol zu entfernen, wurde die gleiche Menge an Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugefügt, gemischt und erneut für 5 min zentrifugiert. Die nun gebildete wässrige Phase wurde mit Ethanol/Na-Acetat präzipitiert (Ethanolpräzipitation 2.2.3.6).

2.2.3.6 Ethanolpräzipitation von DNA und RNA

Um Nukleinsäuren aus einer Lösung auszufällen, wurden der nukleinsäurehaltigen Lösung 2,5 Volumen eiskaltes 100 %iges Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Na-Acetatlösung, pH 5,2 zugesetzt (0,3 M Endkonzentration). Das Salz unterstützt die Zerstörung der Hydrathülle der Nukleinsäure und erleichtert die Fällung. Die Präzipitation erfolgte nun entweder über Nacht oder für ca. zwei Stunden bei -20 °C. Das Präzipitat wurde dann durch Zentrifugation (Heraeus Kühlzentrifuge, 10000x g, 20 min, 4 °C) pelletiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen, um überschüssige Salze zu entfernen. Nach Lufttrocknung wurde die DNA oder die RNA in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. resuspendiert.

2.2.3.7 Isopropanolpräzipitation von DNA

Der nukleinsäurehaltigen Lösung wurde das 0,7-fache Volumen Isopropanol zugesetzt, der Ansatz wurde gemischt und zur Präzipitation und Pelletierung der DNA bei 4 °C für 15 min

bei 10000x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen H₂O bidest. resuspendiert.

2.2.3.8 Quantifizierung von DNA/RNA-Proben

Um den DNA- oder RNA-Gehalt einer Lösung zu bestimmen, wurde die Absorption eines Aliquots in Quarzglas-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, im Photometer gemessen. Hierzu wurde die DNA-Lösung bzw. die RNA-Lösung zuvor 1:100 verdünnt und anschließend die Absorption gegen H₂O als Referenzwert ermittelt.

1 OD _{260 nm} entspricht ca.	50 µg/ml dsDNA
	40 µg/ml ssDNA oder RNA
	33 µg/ml ssOligonukleotid
	(nach Sambrook <i>et al.</i> , 1989)

Es ergeben sich folgende Gleichungen:

DNA-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50

RNA-Konzentration (µg/ml) = Messwert OD₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40

2.2.3.9 Restriktionsspaltung von DNA

Die für die spezifische Spaltung von DNA-Molekülen eingesetzten Restriktionsendonukleasen der Klasse II dienen der bakteriellen Zelle *in vivo* zum Schutz vor Fremd-DNA, die z. B. durch Phagenbefall eingebracht werden kann. Diese unerwünschte Fremd-DNA wird fragmentiert; zelleigene DNA ist durch charakteristische DNA-Modifikationen (Methylierungen) geschützt. Die Endonukleasen bilden zusammen mit Methylasen sogenannte Restriktions-Modifikations-Systeme.

Sowohl zur Analyse von DNA als auch für Klonierzwecke wurden in dieser Arbeit Restriktionsverdau durchgeführt. Die hierfür verwendeten Restriktionsendonukleasen schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen. Der Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte bezüglich Zusammensetzung des Puffers, der Inkubationstemperatur und Inkubationsdauer nach den Empfehlungen des jeweiligen Herstellers. Eine Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) für eine bis mehrere Stunden. Der Enzymanteil im Ansatz sollte ca. 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in glycerolhaltigen Puffern aufbewahrt werden, und zu hohe Glycerolkonzentrationen die

Reaktion negativ beeinflussen. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3.10) überprüft. Sollte die DNA für weitere enzymatische Reaktionen von Puffer und Restriktionsenzymen gereinigt werden, wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion und anschließende Ethanolpräzipitation durchgeführt.

2.2.3.10 Dephosphorylierung von DNA/RNA

Die Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten wurde durchgeführt, um eine unerwünschte Selbstligation von DNA-Fragmenten mit glatten oder kompatiblen Enden zu verhindern. Damit *in vitro* transkribierte RNA an ihrem 5'-Ende durch den Transfer einer radioaktiv markierten Phosphatgruppe markiert werden konnte (siehe 2.2.4.2), musste ebenfalls zunächst die 5'-ständige Phosphatgruppe mit Hilfe der alkalische Phosphatase (*calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) entfernt werden. Für die Reaktion wurde etwa eine Einheit des Enzyms pro μg DNA eingesetzt und für 30 min bis 1 h bei 37 °C (DNA) bzw. 55 °C (RNA) inkubiert. Für die Dephosphorylierung von *in vitro* transkribierter RNA mit CIAP wurde dem Ansatz 40 U RNasin (*human placenta ribonuclease inhibitor* –HPRI; Takara®) zugefügt.

Die auf diese Weise behandelte DNA/RNA wurde anschließend einer Phenolisierung (siehe 2.2.3.5) und Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.3.6) unterzogen. Die DNA wurde nach der Fällung in 25 μl H₂O bidest. (RNA in ca. 15 μl H₂O bidest.) aufgenommen. DNA-Fragmente konnten auch über eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.2.3.11) von dem Enzym gereinigt werden.

2.2.3.11 DNA- bzw. RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Puffer:

6x DNA bzw. RNA-Auftragspuffer:	0,25 % (w/v)	Bromphenolblau
	30 % (v/v)	Glycerin
50x TAE-Puffer:	242 g	Tris
	57,1 ml	Eisessig
	100 ml	1,5 M EDTA (pH 8,0)
	mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen	
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml	
DNA-Längenstandard:	1 kb-Leiter,	Fa. GibcoBRL

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten bzw. RNA-Fragmenten für analytische und präparative Zwecke erfolgte durch horizontale Gelelektrophorese in 0,8-2 %igen

Agarosegelen (w/v) bei konstanter Spannung (Feldstärke 4-8 V/cm). Als Gel- und Laufpuffer diente 1x TAE-Puffer, der mit 250 µg/l Ethidiumbromid (EtBr) versetzt war. Das im Puffer enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose mit einem entsprechenden Volumen 1x TAE/EtBr versetzt, durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst und in die „Schlitten“ der Elektrophoresekammern gegossen. Nach dem Erstarren der Agarose wurde die Kammer mit 1x TAE-Puffer/EtBr aufgefüllt.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit etwa 1/10 Volumen DNA bzw. RNA-Auftragspuffer gemischt. Als Längenstandard diente die 1 kb-Leiter der Firma GIBCO. Nach dem Lauf wurden die DNA- bzw. RNA-Fragmente des Gels unter UV-Licht an einem Transilluminator analysiert, photographisch dokumentiert oder die entsprechenden DNA-Banden für eine Aufreinigung aus der Agarose ausgeschnitten.

2.2.3.12 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der DNA aus Agarose erfolgte mit Hilfe eines Kits, Ultrafree[®]-DA der Firma Millipore[®], gemäß den Angaben des Herstellers. Dieses Kit ist geeignet, um DNA, die 100-10000 Basenpaare umfasst, aus Agarosegelen für Klonierungszwecke oder für die Sequenzierung zu extrahieren. Zur Aufreinigung wird das DNA-haltige Agarosegelstück ausgeschnitten und in eine Säule („Gel Nebulizer“) überführt. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 5000x g, bei der feste Gelbestandteile zurückbehalten werden, befindet sich die extrahierte DNA im Agarosegelpuffer-haltigen Filtrat und kann direkt weiter verwendet werden.

2.2.3.13 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten, z. B. Einfügen von DNA-Fragmenten in Vektorplasmide, erfolgte mit T4 DNA-Ligase. T4 DNA-Ligase katalysiert die kovalente Verknüpfung der 3' OH mit der 5' PO₄-Gruppe an den Enden doppelsträngiger DNA durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung unter ATP-Verbrauch. Um ligierbare Enden zu erhalten, mussten zuvor beide Ligationspartner mit einem oder mehreren Restriktionsenzymen gleicher Spaltspezifität behandelt werden. Damit eine intramolekulare Religation eines linearisierten Vektorplasmids verhindert wurde, musste der Vektor zusätzlich durch eine alkalische Phosphatase dephosphoryliert werden (siehe 2.2.3.10). Eine Religation kann stattfinden, wenn das Plasmid nur von einem Restriktionsenzym gespalten wurde, d. h.

selbstkomplementäre 3'- und 5'-Enden entstanden sind. Der andere Ligationspartner muss entsprechend phosphorylierte Enden aufweisen, damit die Ligation erfolgen kann. Eine Phosphorylierung kann durch T4 Polynukleotidkinase mit ATP als Phosphatgruppendonor katalysiert werden. Ligationen wurden in einem Volumen von 20-35 µl in 1x Ligationspuffer und mit 1 U T4 DNA-Ligase angesetzt. Die Menge der Ligationspartner wurde über den Vergleich der Bandenintensitäten auf einem Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel bestimmt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert betrug in etwa 1:3. Die Ligation fand bei 15 °C über Nacht statt.

2.2.3.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur enzymatischen selektiven Amplifikation von DNA, wobei selbst sehr geringe DNA-Mengen stark vervielfältigt werden können. Das Prinzip beruht auf der Bindung zweier Oligonukleotide, die zu bestimmten Sequenzabschnitten der DNA komplementär sind, so dass sie den zu amplifizierenden Bereich einrahmen. Das als Plusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid ist hierbei komplementär zum antiparallelen Strang der DNA, während das als Minusstrang-Primer bezeichnete Oligonukleotid komplementär zum kodierenden Strang ist. Nach Aufschmelzen des DNA-Doppelstranges durch Erhitzen lagern sich beide Oligonukleotide bei Absenken der Reaktionstemperatur an die DNA an („*Annealing*“). Im nächsten Schritt dienen sie der hitzebeständigen z. B. *Taq* DNA-Polymerase als Start für die DNA-Synthese (Elongation).

Durchführung:

Ein PCR-Standardansatz von 100 µl wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 100 ng *template*):

PCR-Puffer (10x)	10 µl
dNTPs [10 mM]	2,5 µl
<i>Plusstrang-primer</i> [100 pmol/µl]	0,5 µl
<i>Minusstrang-primer</i> [100 pmol/µl]	0,5 µl
DNA- <i>template</i> [50 ng/µl]	1-2 µl
DNA-Polymerase [2,5 U/µl]	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 100 µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem DNA-Thermal-Cycler 2400 von Perkin Elmer[®], wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah (Standardbeispiel):

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	5 min	95 °C
Denaturierung	25-30x	30 s	95 °C
„Annealing“		30 s	50-55 °C (variabel)
Elongation		1 min/kb	72 °C
Elongation	1x	7 min	72 °C

Nachdem die Erfolgskontrolle durch das Auftrennen von 1 µl Reaktionsansatz im DNA-Agarosegel (siehe 2.2.3.10) durchgeführt worden war, wurden die PCR-Fragmente der Hälfte des Ansatzes (50 µl) Ethanol-präzipitiert und anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten (siehe 2.2.3.13). Die Erkennungssequenz für die Restriktionsenzyme waren in der Regel in den verwendeten Oligonukleotiden determiniert. Für die Ligation in einen Plasmidvektor wurde der Plasmidvektor ebenfalls mit diesen Restriktionsendonukleasen geschnitten (siehe 2.2.3.12).

2.2.3.15 Ortsgerichtete Mutagenese mittels „*QuikChange*TM Site-Directed Mutagenesis“

Die Erzeugung einzelner Basenaustausche erfolgte weitgehend nach Vorschrift des „*QuikChange*TM Site-Directed Mutagenesis Kit“ der Firma Stratagene[®]. Bei dieser Methode dient ein doppelsträngiges Plasmid, in das die Mutation eingefügt werden soll, als Matrize. Für den gezielten Austausch bestimmter Basen in der Matrize wurden Oligonukleotide benötigt, welche die gewünschte Basenaustausche in ihrer Sequenz tragen und jeweils an den „sense“ und den „antisense“ Strang der DNA-Matrize binden. Mit Hilfe eines „*Thermal Cyclers*“ wird die Plasmid-DNA denaturiert; die Bindung der Oligonukleotide an die DNA und eine anschließende Primerextension wird durch das Enzym „*Pfu* DNA-Polymerase“ (besitzt eine „*proofreading*“ Aktivität) durchgeführt. Nach 12-16 Elongationsschritten, bei denen im Unterschied zur PCR lediglich die Ausgangs-DNA als Matrize diente, wurde die methylierte Ausgangs-DNA durch Dpn I abgebaut, während die mutierte, neu synthetisierte nicht methylierte DNA erhalten blieb. Die neu synthetisierte DNA ist wie die Ausgangs-DNA doppelsträngig und zirkulär, weist allerdings zwei versetzte Strangbrüche („*nicks*“) auf. Erst nach Transformation der neu synthetisierten DNA in Bakterien erfolgte die „Reparatur“ dieser „*nicks*“ durch Ligation.

Ein „*QuikChange*^{TMcc}“-Standardansatz von 50 µl wies folgende Zusammensetzung auf (ca. 50 ng *template*):

<i>Pfu</i> -Puffer (10x)	5 µl
dNTPs [10 mM]	1 µl
<i>Sense-Oligonukleotide</i> [100 pmol/µl]	0,5 µl
<i>Antisense-Oligonukleotid</i> [100 pmol/µl]	0,5 µl
DNS- <i>template</i> [50 ng/µl]	1 µl
<i>Pfu</i> DNA Polymerase [1,25 U/µl]	1 µl
H ₂ O bidest.	ad 50 µl

Die Inkubation der Ansätze erfolgt in einem DNA-Thermal-Cycler 2400 von Perkin Elmer[®], wobei die Programmierung der Zyklen folgendermaßen aussah:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	30 s	95 °C
Denaturierung	12-16x	30 s	95 °C
„Annealing“		1 min	53 °C
Elongation		2 min/kb	68 °C

Im Anschluss an die Mutagenese-Reaktion wurde die Ausgangs-DNA durch Zugabe von 5 U Dpn I und Inkubation für 1 h bei 37 °C abgebaut. Für die anschließende Transformation der mutierten DNA in Bakterien wurde 1 µl des Dpn I-verdauten Reaktionsansatzes und ein 50 µl-Aliquot kompetenter *E. coli* verwendet (siehe 2.2.3.4).

2.2.3.16 Sequenzierung von DNA

Die enzymatische Methode zur Ermittlung von DNA-Sequenzen wurde 1977 von Sanger *et al.* entwickelt. Das zu sequenzierende DNA-Fragment wird von einem Oligonukleotid aus durch eine DNA-Polymerase repliziert. Im Reaktionsansatz befinden sich neben den regulären dNTPs auch deren 2'3'-Dideoxynanaloga (ddNTPs). Diese Analoga werden von der Polymerase genauso in die entstehende DNA eingebaut wie die dNTPs, allerdings bricht die Kettenverlängerung nach einem ddNTP ab, da keine 3' OH-Gruppe mehr zur Knüpfung der nächsten Phosphodiesterbindung vorhanden ist. Da diese Kettenabbrüche statistisch erfolgen, werden DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge synthetisiert, die durch den Einbau zugesetzter Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter bzw. radioaktiver Nukleotide markiert werden. Nach Auftrennung der DNA-Moleküle in einem hoch auflösenden denaturierenden PAA-Sequenzgel ist ein Nachweis der entstandenen Fragmente, die sich nur um ein Nukleotid unterscheiden, über die Detektion mittels Laser (Fluoreszenzfarbstoff) oder Radiographie (Radioaktivität) möglich.

Sequenzierung von DNA mittels „Cycle-Sequencing“ mit Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Primer

Für die Technik des „Cycle Sequencing“ wurde das „Thermo Sequenase fluorescent labelled cycle sequencing kit with 7-Deaza-dGTPTM“ von Amersham[®] verwendet. Die Sequenzierungsreaktion wurde als PCR durchgeführt; da allerdings nur ein Oligonukleotid eingesetzt wurde, erfolgte keine exponentielle, sondern nur eine lineare Amplifikation der DNA-Fragmente. Während der sich anschließenden Elektrophorese von unterschiedlich großen DNA-Molekülen, wurde der Fluoreszenzfarbstoff, mit welchem das Oligonukleotid markiert war, mittels Laser angeregt und detektiert.

Für die Sequenzierung wurde Plasmid-DNA aus Mini- oder Midipräparationen verwendet. Für eine Sequenzierungsreaktion wurde eine DNA-Menge von 200 ng/kb Plasmidgröße und 2 pMol eines Fluoreszenzfarbstoff (IR 800)-markierten Oligonukleotids eingesetzt. Dieser Ansatz wurde mit H₂O bidest. auf 25 µl aufgefüllt und anschließend auf vier PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Je Reaktion wurden jeweils 2 µl der verschiedenen Didesoxynukleotidgemische des Kits dazugegeben. Die PCR erfolgte nach folgendem Protokoll:

	Anzahl	Dauer	Temperatur
Denaturierung	1x	2 min	95 °C
Denaturierung	30x	15 s	95 °C
„Annealing“		30 s	50 °C
Elongation		30 s	70 °C
Elongation	1x	5 min	70 °C

Nachdem die PCR-Reaktion abgeschlossen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 2 µl Stop-Puffer beendet und auf 4 °C gekühlt. Kurz vor dem Auftragen wurden die Reaktionen zur Denaturierung für 2 min auf 72 °C erhitzt. Von den Reaktionsansätzen wurde jeweils 1 µl auf das Sequenzgel aufgetragen.

Radioaktive Sequenzierung

Die radioaktive Sequenzierung erfolgte mit dem „T7 SequencingTM-Kit“ von Pharmacia[®] weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Hierbei wurde durch die T7 DNA-Polymerase ein an die DNA angelagerter Primer verlängert und der dabei entstehende Strang mit ³²P-α-[dCTP] markiert. Die Markierungsreaktion wurde anschließend auf vier getrennte Ansätze aufgeteilt und durch Zugabe von jeweils einem Didesoxynukleotid terminiert. Für die

Sequenzierung des pBluescript SK II wurde Plasmid-DNA aus der Midipräparation eingesetzt.

Damit eine Anlagerung der Primer an eine einzelsträngige DNA erfolgen konnte, mussten zunächst durch eine alkalische Denaturierung der DNA Einzelstränge erzeugt werden. Hierfür wurden 2 µg DNA in einem Volumen von 20 µl mit 3 µl 2 M NaOH und 50 pMol Primer versetzt und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 5 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 70 µl 100 %igem EtOH gefällt und das DNA-haltige Pellet in 6 µl aufgenommen. Nun wurde die Markierungsreaktion durchgeführt. Zu der DNA-Lösung wurden 1,6 µl „*Labelling-Mix*“ des Kits, 0,9 µl „*Enzyme Dilution Buffer*“ (aus dem Kit), 0,2 µl ³²P-α-[dCTP], was 2 µCi entspricht, und 0,2 µl T7 DNA-Polymerase (aus dem Kit) zugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde auf einer Mikrotiterplatte in vier Vertiefungen jeweils 1,25 µl „*Short Mix*“ des Kits (Nukleotide) vorgelegt und die Platte auf Eis gestellt. Anschließend wurden jeweils 2,25 µl der Markierungsreaktion in die vier Vertiefungen gegeben und die Mikrotiterplatte für 10 min bei 37 °C inkubiert (Terminierungsreaktion). Die Terminierungsreaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 3 µl Stop-Lösung (aus dem Kit) beendet. Direkt vor dem Auftragen auf das 8 %ige Sequenzgel wurden die Reaktionen zur Denaturierung der DNA für 3 min auf 95 °C erhitzt. Es wurden jeweils 1,3 µl des Reaktionsansatzes aufgetragen.

2.2.3.17 Elektrophorese in denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamidgelen

Automatische Sequenzierung mit dem LI-COR 4000 L Sequenziergerät:

Elektrophoresepuffer:

10x „Long-Run“-Puffer:	162 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	9,3 g	EDTA-Na ₂
	mit H ₂ O bidest. auf 1 l auffüllen	
„langes Gel“ (4 %):	32 ml	Sequagel XR
	8 ml	Sequagel-Puffer
	2 ml	„Long Run“-Puffer
	15 ml	H ₂ O bidest.
	8 g	Harnstoff
	400 µl	10 %iges APS
	20 µl	TEMED

„kurzes Gel“ (6 %):	30 ml	Sequagel XR
	7,5 ml	Sequagel-Puffer
	300 µl	10 %iges APS
	400 µl	DMSO

Die Auftrennung der Proben erfolgte auf 0,2 mm dicken Polyacrylamidgelen. Lange Gele (66 cm) wurden für das Lesen von 1000 Basen verwendet; kurze Gele (40 cm) für die Auftrennung von etwa 400 Basen. Da die Detektion der Sequenz bei der automatischen Sequenzierung schon während des Laufs erfolgte, wurde das Gel nach dem Lauf verworfen.

Die für die automatische Sequenzierung verwendeten Polyacrylamidlösungen wurden mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Gelsystems angesetzt. Unmittelbar vor dem Gießen wurden TEMED und 10 %iges Ammoniumpersulfat zu den Polyacrylamidlösungen gegeben. Zur Herstellung der Gele wurden „Spacer“ zwischen die Glasplatten gelegt, die Platten in dafür vorgesehene Schienen eingespannt und auf eine entsprechende Apparatur gelegt, die ein horizontales Gießen des Gels ermöglichte. Die Polymerisation erfolgte für mindestens 1 h, anschließend wurde das Gel in das Sequenziergerät eingespannt und ein Vorlauf unter folgenden Bedingungen gestartet:

lange Gele (4 %)	kurze Gele (6 %)
2000 V	1500 V
37 mA	37 mA
45 °C	50 °C
50 W	50 W

Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben wurden diese für 2 min bei 72 °C denaturiert. Der Gellauf wurde bei langen Gelen über Nacht, bei kurzen Gelen über 5-6 h unter den gleichen Bedingungen wie für den Vorlauf durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffmarkierten DNA-Banden erfolgte mittels eines computergesteuerten Lasers während des Laufs. Die als Bild oder Buchstabensequenz verfügbaren Daten wurden anschließend mit Hilfe von Computerprogrammen (DNasis; DNA Strider) ausgewertet.

PAA-Sequenzgele und PAA-Gele

Lösungen und Puffer:

10x TBE-Puffer:	500 mM	Tris
	500 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA

„Repel-Silane“	5 %	„Repel-Silane“ in Chloroform
PAA-Sequenzgel (8 %):	19,2 ml 34,8 ml 6 ml 480 µl 24 µl	Sequagel-Konzentrat Sequagel-Diluent Sequagel-Puffer 10 %iges APS TEMED
PAA-Gel (5 %):	8 ml 28 ml 4 ml 320 µl 16 µl	Sequagel-Konzentrat Sequagel-Diluent Sequagel-Puffer 10 %iges APS TEMED
PAA-Gel (8 %):	12,8 ml 23,2 ml 4 ml 320 µl 16 µl	Sequagel-Konzentrat Sequagel-Diluent Sequagel-Puffer 10 %iges APS TEMED

Zum Auftrennen der radioaktiven Sequenzierungsreaktion wurden 8 %ige PAA-Sequenzgele verwendet. Weiterhin dienten die hier beschriebenen denaturierenden Polyacrylamidgele (PAA-Gele) zur Auftrennung von RNA-Fragmenten, wie sie z. B. im Degradationstest (siehe 2.2.6.2) entstanden. Auch zur Aufreinigung von radioaktiv markierten *in vitro* Transkripten wurden diese Gele verwendet.

Während die Polyacrylamidsequenzgele (PAA-Sequenzgele) eine Länge von 90 cm aufweisen, sind die Polyacrylamidgele (PAA-Gele) 20 cm lang. PAA-Sequenzgele sind durch die Verwendung von „Spacern“ 0,4 mm dick; PAA-Gele sind 1 mm dick. Die beiden Glasplatten eines Sequenzgels wurden auf unterschiedliche Art vorbehandelt, da sich das PAA-Sequenzgel nach dem Gellauf leicht von einer Platte lösen sollte. Hierzu wurde diese Platte nach einer Reinigung mit 70 %igem Ethanol mit „Repel-Silane“ beschichtet. Die andere Platte wurde intensiv mit 70 %igem Ethanol gesäubert, damit keine Staubkörner den Gellauf behindern bzw. keine Ribonukleasen anhaften bleiben. Für das Gießen des dickeren PAA-Gels wurden die Platten nur gründlich mit Ethanol gereinigt. Nach Auflegen zweier „Spacer“, welche die Dicke des Gels bestimmen, an den beiden Längsseiten, wurden die Sequenzgelplatten mit den gesäuberten bzw. behandelten Flächen aufeinandergelegt und mit Tesafilm-Streifen bis auf die obere schmale Seite abgeklebt. Das Gießen der PAA-Gele

erfolgte in einer vertikalen Gelgieß-Apparatur, weshalb kein Abkleben der Plattenränder erforderlich war.

Zum Ansetzen der 5 %igen bzw. 8 %igen Polyacrylamidlösung wurde ein kommerziell erworbenes Kit (Sequagel) verwendet und erst direkt vor dem Gießen des Gels das entsprechende Volumen an TEMED und 10 %igem APS zugegeben. In das gegossene Gel wurde im Falle des Sequenzgels ein „Haifischzahn-Kamm“ und im Falle des PAA-Gels ein „Taschenkamm“ eingeschoben. Während der Polymerisation der Gele, die für PAA-Sequenzgele mindestens 1 h und für PAA-Gele 20 min dauerte, wurden die Glasplatten durch Beschweren einer Glasplatte (PAA-Sequenzgel) bzw. Einsetzen einer Klammer (PAA-Gel) in Höhe der Kämmen fest aneinander gepresst, wodurch eine bessere Ausbildung der Taschen erreicht wurde. Das PAA-Gel wurde für den Gellauf aus der Gelgieß-Apparatur genommen und wie das Sequenzgel in eine Elektrophoreseapparatur eingespannt. In beiden Fällen wurden die Tanks mit 1x TBE-Puffer aufgefüllt, und anschließend ein Vorlauf des PAA-Sequenzgels für 30 min bei 30 Watt durchgeführt. Der Gellauf erfolgte mit 50 Watt für 3-5 h. Der Gellauf des PAA-Gels erfolgte ohne Vorlauf bei ca. 13 Watt für 1-2 h. Zur Denaturierung der RNA-haltigen Reaktionsansätze wurde unmittelbar vor dem Auftragen das gleiche Volumen an formamidhaltigen Puffer zugegeben, und die Proben für 5 min auf 95 °C erhitzt. Der Lauf wurde gestoppt, wenn die untere Markerfront (Bromphenolblau) ca. 5 cm vom unteren Gelrand entfernt war. Das Gel wurde auf Filterpapier übertragen, mit Plastikfolie abgedeckt und getrocknet oder direkt auf den Röntgenfilm aufgelegt. Exposition erfolgte in einer Filmkassette meist über Nacht bei -20 °C. Alternativ konnte das Gel auch auf einen „Imaging Screen“ aufgelegt werden. Hier erfolgte die Exposition für 1 h.

2.2.4 RNA-Methoden

2.2.4.1 *in vitro* Transkription

Die hier beschriebene Methode macht sich die hohe *in vitro* Prozessivität der T7/T3 und Sp6 RNA-Polymerasen zunutze und dient zur Herstellung von RNA-Molekülen an einem DNA-*template* (Milligan *et al.*, 1987). In dieser Arbeit wurden *in vitro* Transkripte für die Herstellung der RNA-Substrate, die in den verschiedenen RNase Tests eingesetzt wurden, mit T7 oder T3 RNA-Polymerase synthetisiert. Weiterhin wurden Sp6 *in vitro* Transkripte für das Erstellen von Wachstumskurven (siehe 2.2.1.8) benötigt. Hierzu mussten die Transkripte anschließend über „RNeasyTM“-Säulen; Qiagen[®] (siehe 2.2.4.4) gereinigt und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt werden. Falls keine radioaktive Markierung

während der Transkription erfolgen sollte, wurden für die *in vitro* Transkription 2 µg Plasmid-DNA durch einen Restriktionsverdau linearisiert, anschließend über eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.3.5) gereinigt und mit Ethanol gefällt (siehe 2.2.3.6). Nachdem das getrocknete DNA-Pellet in 10-15 µl H₂O bidest. aufgenommen worden war, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

T7/T3 oder Sp6 Pol.-Puffer (10x)	1 µl
DTT [0,1 M]	1 µl
DNA- <i>template</i> [1 µg/µl]	1 µl
<i>human ribonuclease inhibitor</i> [40 U/µl]	1 µl
rNTPs [10 mM]	1 µl
H ₂ O bidest.	4 µl
<u>T7/T3 oder Sp6 RNA-Pol. [50 U/µl]</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl

Die Transkription erfolgte für 1-2 h bei 37 °C. Anschließend wurde die Qualität der *in vitro* Transkripte über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert, bevor die transkribierte RNA mittels Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.3.5) gereinigt und mit Ethanol gefällt wurde (siehe 2.2.3.6). Zur Beseitigung des verbleibenden DNA-*templates* kann eine Behandlung mit DNase I durchgeführt werden (Zugabe von 1 µl DNase I vor der Phenolisierung und Inkubation für weitere 1-2 h bei 37 °C). Eine Behandlung mit DNase I wurde z. B. nach der *in vitro* Transkription zur Erzeugung der RNA-Substrate für die Enzymkinetik durchgeführt. Da für die Bestimmung der Enzymkinetik (K_m und v_{max}) ebenfalls freie Nukleotide von der *in vitro* transkribierten RNA abgetrennt werden sollten, wurden die Nukleotide im Anschluss an die *in vitro* Transkription und die DNase-Behandlung mit Hilfe von G-15 Sephadex Säule abgetrennt (siehe 2.2.4.3), bevor eine Phenol/Chloroform-Extraktion (siehe 2.2.3.5) und eine Ethanol-fällung (siehe 2.2.3.6) der RNA-Moleküle durchgeführt wurde. Anschließend wurde die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt.

Sollte eine interne radioaktive Markierung durch Zugabe von ³²P-α-[UTP] durchgeführt werden, setzte sich ein Standard-Reaktionsansatz wie folgt zusammen:

T3 Pol.-Puffer (10x)	1 µl
H ₂ O bidest.	2 µl
DNA- <i>template</i> [1 µg/µl]	1 µl
<i>human ribonuclease inhibitor</i> [40 U/µl]	1 µl
³² P-α-UTP [10 µCi/µl]	2 µl
rNTPs ohne UTP [10 mM]	1 µl
(UTP [0,1 µM])	1 µl)
<u>T3 RNA-Pol. [50 U/µl]</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl

Als *template* wurde erneut ein linearisiertes Plasmid verwendet. Der Ansatz wurde für ca. 30 min bis 1 h bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl formamidhaltigen Auftragspuffer gestoppt. Für die Reinigung der *in vitro* transkribierten RNA wurde der Reaktionsansatz in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und die entsprechende RNA-Bande nach dem Gellauf ausgeschnitten (siehe 2.2.4.5).

2.2.4.2 Radioaktive Markierung von RNA-Molekülen an deren 5'-Ende

Um ein RNA-Molekül am 5'-Ende radioaktiv zu markieren, wird die γ -Phosphatgruppe von ^{32}P - γ -[ATP], katalysiert durch die Polynukleotidkinase (PNK), auf die zuvor mittels CIAP-Behandlung dephosphorylierte (siehe 2.2.3.10) RNA übertragen. Der Markierungsansatz setzte sich wie folgt zusammen (15 µl Gesamtvolumen):

H ₂ O bidest.	1,5-5,5 µl
PNK-Puffer [10x]	1,5 µl
<i>human ribonuclease inhibitor</i> [40 U/µl]	1 µl
RNA-Substrat nach CIP-Behandlung	4-8 µl
^{32}P - γ -[ATP] [10 µCi/µl]	2 µl
PNK (5 U)	1 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Die Inkubation erfolgte für 30 min bis 1 h bei 37 °C; es schloss sich entweder eine Phenolisierung und Ethanol-fällung an oder eine Aufreinigung über ein denaturierendes Harnstoffgel (siehe 2.2.4.5).

2.2.4.3 Abtrennen von nicht eingebauten Nukleotiden mit Hilfe von G 15-Sephadex-Säulen

Puffer: 40 mM Tris-Acetat (pH 6,5)
 0,5 mM EDTA

Sollten nach einer *in vitro* Transkription nicht eingebaute Nukleotide von der transkribierten RNA abgetrennt werden, wurde der Transkriptionsansatz langsam durch eine G15-Sephadexsäule (G15 Sepharose der Fa. Pharmacia) getropft. Eine Abtrennung der nicht eingebauten Nukleotide mittels G15-Sephadexsäule war vor allem für die Herstellung der nicht radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte zur Bestimmung der Enzymkinetik (siehe 3.1.3) notwendig, da hierzu die genaue Konzentration der Transkripte bekannt sein musste, und freie Nukleotide bei der spektrophotometrischen Konzentrationsbestimmung ebenfalls erfasst werden. Das Trennprinzip beruht auf dem Molekulargewicht: größere RNA-Moleküle können ungehindert die Säule passieren, während die uneingebauten Nukleotide im engen

Netzwerk der Sepharose vorübergehend gefangen werden und mit einer zeitlichen Verzögerung den Säulenausgang erreichen.

Für die Herstellung von Sephadexsäulen wurde G15-Sepharose (Pharmacia-Amersham) in Puffer vorgequollen und anschließend auf einen Glasfaserfilter (Whatman GFC), der sich am Boden der Säule befand, gefüllt. Nun wurde der überschüssige Puffer durch fünfminütiges Zentrifugieren bei etwa 300x g entfernt. Nach Zugabe von 100 µl Puffer zum Transkriptionsansatz, wurde der Ansatz auf die Säule überführt. Während der Durchfluss durch fortwährende manuelle Zugabe von Puffer auf die Säule sicher gestellt wurde, wurde das Filtrat in acht Fraktionen von je ca. 100 µl aufgefangen. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform-Behandlung (siehe 2.2.3.5) und Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.3.6) aller Fraktionen. Die Konzentration der pelletierten RNA nach dem Lösen in 40 µl H₂O bidest. wurde spektrophotometrisch bestimmt und anschließend durch Elektrophorese im Agarosegel verifiziert.

2.2.4.4 Aufreinigung von *in vitro* Transkripten mit Hilfe des „RNeasyTM Total RNA Kits“

Die Reinigung der Sp6 *in vitro* Transkripte von freien Ribonukleotiden und Pufferbestandteilen des Transkriptionsansatzes für das Erstellen von Wachstumskurven erfolgte mit Hilfe des „RNeasyTM Total RNA Kits“ gemäß den Angaben des Herstellers. Der Transkriptionsansatz wurde hierfür auf eine RNeasy-Säule („RNeasy Spin Column“) geladen und die *in vitro* Transkripte nach zwei Waschschritten mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert.

2.2.4.5 Aufreinigung von *in vitro* Transkripten über PAA-Gele

RNA-Elutionspuffer (TNES):	10 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	300 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1 %	SDS

Um radioaktiv markierte *in vitro* Transkripte von Pufferbestandteilen und uneingebauten Nukleotiden zu trennen, wurde der *in vitro* Transkriptionsansatz mit dem gleichen Volumen formamidhaltigen Puffer versetzt, für ca. 3 min bei 95 °C denaturiert und in einem 5 bzw. 8 %igen PAA-Gel oder einem 8 %igen PAA-Sequenzgel aufgetrennt. Der Gellauf erfolgte bei etwa 13 Watt (bzw. ca. 50 Watt für PAA-Sequenzgele) und 1x TBE als Laufpuffer. Anschließend wurde das Gel auf einer der Glasplatten belassen, mit Klarsichtfolie abgedeckt

und in einer Dunkelkammer ein Röntgenfilm aufgelegt. In der Regel genügte eine Expositionszeit von ca. 5 min, um sowohl die Umrisse eines zuvor auf die Folie aufgeklebten fluoreszierenden Aufklebers als auch die RNA-Banden zu erkennen (siehe 2.2.5.2). Der Aufkleber diente nach der Entwicklung des Films zur Lokalisation der entsprechenden RNA-Bande, die dann ausgeschnitten, in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zerkleinert und in 400-650 µl TNES-Elutionspuffer über Nacht bei RT eluiert wurde.

2.2.5 Nachweis radioaktiver Reaktionsprodukte

2.2.5.1 Messung der Radioaktivität von *in vitro* Transkripten

Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die „counts per minute“ (cpm) in einem Flüssigszintillationszähler der Firma Amersham-Pharmacia ermittelt. Hierzu wurden die Gefäße, welche die radioaktive Probe enthielten, in ein geeignetes Messgefäß überführt und die Strahlungsintensität des ^{32}P sechzig Sekunden lang gemessen.

Bestimmung der RNA-Konzentration anhand der eingebauten Radioaktivität

Über den Anteil von z.B. ^{32}P - α -[UTP] im RNA-Molekül lässt sich die Gesamtmenge der *in vitro* transkribierten RNA ermitteln. Da laut Herstellerangaben 10 µCi ^{32}P - α -[UTP] 3 pmol entsprechen, kann nach Messung sowohl der cpm von ^{32}P - α -[UTP] als auch der cpm von ^{32}P - α -[UTP]-markierter RNA die RNA-Konzentration in pmol berechnet werden.

2.2.5.2 Autoradiographie

Die Position und Intensität radioaktiv markierter Substanzen kann nach Auftrennung in einem Elektrophoresegel durch Auflegen eines Röntgenfilms auf das Gel ermittelt werden. Der Röntgenfilm wird an den entsprechenden Stellen durch die radioaktive Strahlung geschwärzt. Die Exposition erfolgte in lichtdichten Filmkassetten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.5.3 Phosphorimaging

Bei diesem Verfahren werden zum Nachweis radioaktiver Strahlung Spezialplatten („*Imaging Screens*“) anstelle von Röntgenfilmen verwendet. Diese *Screens* sind mit einer ca. 700 µm dicken BaFBrEu-Schicht versehen und können radioaktive Strahlungsenergie in Form von (an Kristallgitterfehlstellen haftenden) Elektronen speichern. Das Material ist z.B. für ^{32}P ca.

250 mal empfindlicher als ein Röntgenfilm. Eine Auswertung der Platten erfolgte in einem *Phosphorimager*-Auslesegerät BAS 1000 der Firma Fuji durch einen HeNe-Laser (Rotlicht mit 600 nm). Benutzte Platten können mit gelbem Licht gelöscht und beliebig oft wiederverwendet werden. Über entsprechende Software (verwendetes Programm: „Tina“, Version 2.09 der Firma Raytest) kann die Bandenschwärzung quantifiziert werden.

2.2.6 Bestimmung der RNase-Aktivität

2.2.6.1 limitierender Verdau

Puffer:

Puffer für RNase T1/Phy M und E ^{ms} :	20 mM	Na-Citrat (pH 5,0)
	7 M	Harnstoff
	1 mM	EDTA
Puffer für RNase U2:	20 mM	Na-Citrat (pH 3,5)
	7 M	Harnstoff
	1 mM	EDTA
Puffer für RNase B. cereus:	20 mM	Na-Citrat (pH 5,0)
	1 mM	EDTA

Die Methode, die auf unvollständiger Spaltung beruht, wurde ursprünglich für die enzymatische Sequenzierung von RNA-Molekülen entwickelt: Hierzu werden markierte RNA-Moleküle mit einzelstrangspezifischen Ribonukleasen inkubiert, die jeweils eine oder zwei spezifische Spaltstellen aufweisen. Da die Spaltstellen verschieden sind, kann nach elektrophoretischer Auftrennung der Spaltprodukte in einem PAA-Sequenzgel die Sequenz anhand der Spaltpattern ermittelt werden. Mit Hilfe dieser Methode ist es jedoch auch möglich, die Spaltspezifität einer Ribonuklease über den Vergleich ihres Spaltpatterns mit den Spaltpatterns von spezifischen Referenzribonukleasen nach Inkubation mit dem gleichen RNA-Substrat zu ermitteln (z. B. *Rybak & Vallee*, 1988).

Durchführung:

Als RNA-Substrat zur Bestimmung der Spaltstellen von E^{ms} in einer heteropolymeren RNA wurde das T7 *in vitro* Transkript des mittels Sac I linearisierten pBluescript Sk II (Polylinkerregion) verwendet. Nachdem das 5'-Ende des *in vitro* Transkripts radioaktiv markiert (siehe 2.2.4.2) und Ethanol-präzipitiert worden war, folgte die Inkubation von jeweils ca. 9×10^4 cpm RNA-Substrat mit einzelstrangspezifischen Referenzribonukleasen (RNase T1/Phy M/U₂ und B. cereus) und E^{ms} unter den

für die Referenzribonukleasen beschriebenen bzw. für E^{ms} ermittelten Pufferbedingungen (s. o.). Die Referenzribonukleasen wurden im Set erworben („RNA Sequencing Enzyme Kit“, Pharmacia®) und E^{ms} in Insektenzellen erzeugt und mittels Immunaffinitätschromatographie aufgereinigt (siehe 2.2.2).

Die Inkubation erfolgte bei 55 °C und Zugabe von 20 µg tRNA zu den Ansätzen. In Vorversuchen wurde über das Anfertigen von Enzym- und Substratverdünnungsreihen das Enzym/Substrat Verhältnis ermittelt, bei dem ein vollständiger Abbau des RNA-Substrates vermieden wird. Für den limitierenden Verdau wurden 2 U RNase T1, RNase U₂ und RNase B. cereus sowie etwa 10 U RNase Phy M und 20 ng E^{ms} eingesetzt. Ein Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung:

9x 10 ⁴ cpm 5'-markiertes <i>in vitro</i> Transkript:	2 µl
RNase in Puffer verdünnt:	4 µl
t-RNA (20 µg):	1 µl
<u>Reaktionspuffer:</u>	<u>5 µl</u>
Gesamtvolumen	13 µl

Die Inkubationszeiten der jeweiligen Ribonukleasen wurden ebenfalls in Vorversuchen ermittelt. Sie betragen für die RNase T1, die RNase U₂ und für E^{ms} 18 Minuten; für die RNase Phy M 28 Minuten und für die RNase B. cereus 35 Minuten. Um eine Kontamination mit RNasen im Reaktionspuffer nachzuweisen, wurden ca. 2x 10⁴ cpm RNA für 35 min ebenfalls bei 55 °C mit Puffer inkubiert. Im Anschluss an den Verdau wurden die Reaktionsansätze phenolisiert und die RNA-Moleküle präzipitiert (siehe 2.2.3.5 und 2.2.3.6) und anschließend in 6 µl formamidhaltigen Auftragspuffer gelöst. Nach einem Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min, wurden die RNA-Moleküle in einem 8 %igen PAA-Sequenzgel aufgetrennt. Die radioaktive Sequenzreaktion der Polylinkerregion des pBluescript Sk II (siehe 2.2.3.16) wurde ebenfalls auf dem gleichen Sequenzgel wie die Reaktionsprodukte von RNase T1, RNase B. cereus und E^{ms} aufgetrennt. Damit die Spaltprodukte der Ribonukleasen nach der Auftrennung in etwa auf der gleichen Höhe zu den korrespondierenden DNA-Sequenzfragmenten nachweisbar waren, musste, da DNA schneller aufgetrennt wird als RNA, ein Vorlauf der Sequenzreaktion bei 45 Watt für 28 Minuten erfolgen. Nach Abschluss des Gellaufs wurde das PAA-Sequenzgel auf Filterpapier übertragen und autoradiographiert. Der Film wurde anschließend bei -20 °C für 12–72 h belichtet. Die 5'-Spaltprodukte enthielten die markierte Phosphatgruppe, weshalb sie auf dem Röntgenfilm als Bande erkennbar waren. Die Referenzribonukleasen weisen folgende spezifische Spaltstellen auf:

RNase T1 von <i>A. oryzae</i> :	GpN
RNase Phy M von <i>P. polycephalum</i> :	UpN und ApN
RNase U2 von <i>Ustilago spherogena</i> :	ApN
RNase B. cereus von <i>Bacillus cereus</i> :	UpN und CpN

Der Nachweis der Spaltstellen von E^{ms} innerhalb des RNA-Moleküls erfolgte über den Vergleich des Spaltmusters von E^{ms} mit den Spaltmustern der Referenzribonukleasen. Die ebenfalls aufgetrennte Sequenzreaktion der entsprechenden Region vereinfachte das Nachvollziehen der Sequenz anhand der spezifischen Spaltfragmente der Referenzribonukleasen.

2.2.6.2 Degradationstest

Reaktionspuffer:	40 mM	Tris-HCl, pH 6,5
	0,5 mM	EDTA
Substrat:	³² P- α -[UTP] markierte <i>in vitro</i> Transkripte von <i>Sub-ApU</i> , <i>Sub-CpU</i> , <i>Sub-GpU</i> oder <i>Sub-UpU</i>	

Mit Hilfe des Degradationstests wurde die Spaltspezifität näher charakterisiert, die Enzymkinetik bestimmt und die Auswertung von Mutagenesestudien in Bezug auf das aktive Zentrum vorgenommen. Ausgehend von einem Standard-Degradationstest wurden auch Varianten für die Erfordernisse der jeweiligen Situation entwickelt.

Für den Standard-Degradationstest wurde ein Großansatz („*Master-Mix*“) erstellt, aus dem zu bestimmten Zeitwerten ein Aliquot entnommen und abgestoppt wurde. Im „*Master-Mix*“ wurde die *in vitro* transkribierte RNA mit E^{ms} im Reaktionspuffer bei 55 °C (oder 37 °C) inkubiert. Während die RNA zuvor mittels Elektrophorese in einem denaturierenden PAA-Gel von Pufferbestandteilen und freien Nukleotiden getrennt wurde, wurde E^{ms} in Insektenzellen exprimiert und anschließend immunaffinitäts-chromatographisch aufgereinigt. Damit kontaminierende Ribonukleasen im Reaktionspuffer nachgewiesen werden konnten, wurden ebenfalls ca. 1×10^4 cpm *in vitro* transkribierte RNA für 20 min nur mit Reaktionspuffer inkubiert.

Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Überführen eines Aliquots in das gleiche Volumen an formamidhaltigen Auftragspuffer und Einfrieren in flüssigen Stickstoff. Bis zur Denaturierung der RNA bei 95 °C für 5 min wurden die Proben bei -20 °C aufbewahrt. Im Anschluss an die Denaturierung erfolgte die Auftrennung der RNA-Moleküle in einem denaturierenden PAA-Gel oder einem PAA-Sequenzgel (5 oder 8 %). Nach dem Gellauf wurde das denaturierende PAA-Sequenzgel bzw. das PAA-Gel auf Filterpapier übertragen und mit

Plastikfolie abgedeckt, in eine Filmkassette überführt und ein „*Imaging Screen*“ für eine Stunde aufgelegt (siehe 2.2.5.3). Nachdem der „*Imaging Screen*“ für die Auswertung vom Gel genommen worden war, wurde ein Röntgenfilm auf das Gel gelegt und anschließend bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ für etwa 24 h belichtet.

Spaltspezifität

Für die Aufreinigung der *in vitro* Transkripte wurden keine denaturierenden PAA-Gele (siehe 2.2.4.5) sondern 8 %ige PAA-Sequenzgele verwendet, da die Reaktionsprodukte des Degradationstests im Anschluss an die Inkubationszeit ebenfalls auf einem 8 %igen denaturierenden PAA-Sequenzgel aufgetrennt wurden. Im Degradationstest wurden ca. 5×10^4 cpm *in vitro* transkribierte RNA mit 25 ng, 50 ng bzw. 100 ng E^{ms} sowie 1 μl 1:1000 verdünntem RNase A/T1 Mix (Ambion[®]) im Heizblock bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 20 min inkubiert. Das Volumen der Ansätze betrug jeweils 10 μl . Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl formamidhaltigen Auftragspuffer gestoppt. Anschließend wurde die Hälfte der Ansätze in einem 8 %igen PAA-Sequenzgel aufgetrennt und die Spaltmuster von E^{ms} und RNase A/T1 verglichen. Es war sowohl das definierte Spaltprodukt der NpU Spaltstelle als auch ein Set an um jeweils ein Nukleotid verschieden großer Spaltfragmente nachweisbar. Diese zusätzlichen Spaltfragmente konnten nochmals unterteilt werden in Spaltprodukte, die in der Nähe der NpU Spaltstelle akkumulierten und Spaltprodukte, die nahezu gleichmäßig über die gesamte Gelfläche hinweg bis zur Lauffront aufgetrennt wurden. Da sich alle zusätzlichen Spaltfragmente jeweils um ein Nukleotid unterschieden, ergaben sie eine RNA-Leiter, so dass die RNA-Bande des NpU Spaltproduktes durch Abzählen dieser Spaltfragmente ermittelt werden konnte.

Bestimmung der Enzymkinetik (K_m und V_{max})

Pro Messreihe mussten ca. 4 μg RNA-Substrat (~ 50 mer) verwendet werden. Es war nicht sinnvoll, diese Menge radioaktiv zu erzeugen. Damit der Anteil an Radioaktivität reduziert werden konnte, wurde markiertes und unmarkiertes *in vitro* T3 Transkript des jeweiligen Substrates parallel eingesetzt. Die Aufreinigung der nicht markierten *in vitro* Transkripte erfolgte nach einem DNase-Verdau über G15-Sephadexsäulen (siehe 2.2.4.3), während die radioaktiv markierten *in vitro* Transkripte durch Auftrennung in einem denaturierenden 5 %igem PAA-Gel aufgereinigt wurden.

Um die optimalen Inkubationsbedingungen zu ermitteln, mussten zahlreiche Vorversuche durchgeführt werden. In Verdünnungsreihen wurden die Substratkonzentrationen ermittelt, innerhalb derer ein in etwa linearer Abbau des Substrates durch 10 ng E^{ms} erfolgte. Während

bei zu niedrigen Substratkonzentrationen ein Abbau durch E^{ms} so schnell stattfand, dass die Kinetik des Abbaus nicht nachvollzogen werden konnte, war auf der anderen Seite bei zu hoher Substratkonzentration kein linearer Abbau nachweisbar. Es waren auch zahlreiche Vorversuche notwendig, damit die Probenentnahme im Sekundenbereich erfolgen konnte.

Im Degradationstest betrug der Anteil von unmarkierter RNA in der „Stock-Lösung“ 160 pmol/100 μ l und der Anteil von radioaktiv markierter RNA 0,3 pmol/100 μ l Stock-Lösung. Zur Bestimmung der Enzymkinetik wurde in unterschiedlichen Ansätzen die Substratmenge variiert (\sim 1-1,5 pmol, \sim 2 pmol, \sim 3 pmol, \sim 4 pmol sowie \sim 5 pmol), während die Enzymmenge gleich gelassen wurde (10 ng E^{ms}). Ein Standardansatz hatte folgende Zusammensetzung:

unterschiedliche RNA-Substratmenge im Reaktionspuffer:	5 μ l
10 ng E^{ms} im Reaktionspuffer:	5 μ l

Für jeden Zeitwert wurde ein spezielles 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Kammerdeckel (Fa. Roth, Best.-Nr. E 518.1) verwendet. Das Enzym wurde getrennt von der RNA in die Deckel der Reaktionsgefäße pipettiert. Die Gefäße wurden anschließend im 37 °C warmen Wasserbad angewärmt, ohne dass die enzymatische Reaktion stattfinden konnte, da das Enzym getrennt von der RNA im Deckel des Gefäßes vorlag. Dann folgte die Mischung der Reaktionspartner durch einen kurzen Zentrifugationsschritt (ca. 1-2 s), was den Beginn der enzymatischen Reaktion ($T=0$ s) darstellte. Die Ansätze wurden in einem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach verschieden langer Inkubationszeit ($T=10$ bzw. 15, $T=20$ bzw. 25, $T=30$ bzw. 35, $T=40$ bzw. 45 und $T=60$ bzw. 90 Sekunden) durch Zugabe von 10 μ l formamidhaltigen Auftragspuffer und sofortiges Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff. Um $T=0$ s zu erhalten, wurden schon vor Durchführung des kurzen Zentrifugationsschrittes 10 μ l formamidhaltiger Auftragspuffer in das Reaktionsgefäß pipettiert, so dass sofort nach dem Mischen der Reaktionspartner ein Abstoppen der Reaktion erfolgte. Nach Auftrennen der pro Zeitwert vorhandenen RNA-Moleküle in einem 5 %igen denaturierenden PAA-Gel wurden, um die RNase-Aktivität der ersten Kinetik (spezifischen Spaltung der NpU Spaltstelle) zu bestimmen, die cpm der RNA-Substratbanden ermittelt. Die cpm der RNA-Substratbande zum Zeitpunkt $T=0$ s entsprach der eingesetzten RNA-Gesamtmenge in mol, weshalb über den Vergleich der cpm die RNA-Substratmenge zu jedem Zeitpunkt in mol ermittelt werden konnte. Die Produktbildung wurde anschließend durch Subtraktion noch unverdaulichem RNA-Substrates von der eingesetzten Gesamtmenge ebenfalls in mol ermittelt. Um die Diagramme der „Michaelis-Menten-Kinetik“ bzw. die „Lineweaver-Burk-Darstellung“ zu erhalten, wurde die Menge an gebildetem Produkt in ein Computerprogramm mit Kinetikmodul (Sigmaplot der Firma SPSS-Science) eingegeben. Anschließend waren die Werte

für K_m und V_{max} im erstellten „Lineweaver-Burk-Diagramm“ über die Schnittpunkte mit den Achsen ersichtlich.

Mutagenesestudien der RNase E^{rns}

Im Degradationstest wurden sowohl etwa 2×10^5 cpm *in vitro* transkribierte RNA als auch 4 µg tRNA mit jeweils 50 ng Enzym (E^{rns}-Wildtyp bzw. generierte Mutante) inkubiert. Ein Standardreaktionsansatz von 25 µl setzte sich wie folgt zusammen:

Reaktionspuffer:	12,5 µl
2×10^5 cpm <i>in vitro</i> Transkript:	5 µl
4 µg t-RNA:	5 µl
<u>50 ng Enzym:</u>	<u>2,5 µl</u>
Gesamtvolumen	25 µl

Sowohl die RNA als auch das Enzym lagen in Reaktionspuffer vor. Da das Pipettieren der Reaktionsansätze auf Eis (4 °C) erfolgte und nur mit einer Restaktivität zu rechnen war, wurden zum Erhalt des Nullwertes direkt nach Zugabe des Enzyms 6 µl des Ansatzes in 6 µl formamidhaltigen Auftragspuffer überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Inkubation des „Master Mixes“ erfolgte, um den Flüssigkeitsverlust durch Verdampfen möglichst gering zu halten, in einem Thermozykler bei 55 °C. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 min, 7,5 min bzw. 15 min wurden jeweils 6 µl des Reaktionsansatzes in das gleiche Volumen an formamidhaltigen Auftragspuffer überführt, und das Gefäß in flüssigen Stickstoff überführt. Nach der Auftrennung der RNA-Moleküle im 5 %igen denaturierenden PAA-Gel korrelierte der Anteil von Spaltprodukten an der gesamten RNA-Menge mit der RNase-Aktivität der E^{rns}-Mutanten. Die Menge an Spaltprodukten nach Inkubation mit E^{rns} ergab 100 % Aktivität.

2.2.6.3 RNase-Assay

Reaktionspuffer:	40 mM	Tris-HCl, pH 6,5
	0,5 mM	EDTA

Substrat:	³² P-α-[UTP] markierte <i>in vitro</i> Transkripte von <i>Sub-ApU</i> , <i>Sub-CpU</i> , <i>Sub-GpU</i> oder <i>Sub-UpU</i>
-----------	--

In diesem Test wurde das markierte *in vitro* Transkript von *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* oder *Sub-UpU* durch E^{rns} in charakteristische kleinere Fragmente gespalten. Es wurden ca. 1×10^5 cpm *in vitro* transkribierte RNA mit 15-20 µl E^{rns}-haltigen BHK-Zelllysate für 7,5 bzw. 15

Minuten (C-Deletionsmutanten von E^{ms}) oder für 30 bzw. 60 min (Mutation der N-Glykosylierungsstellen von E^{ms}) bei 37 °C in einem Thermozykler inkubiert. Zur Bestimmung der Konzentration an E^{ms}-Protein nach Mutation der N-Glykosylierungsstellen in den Zelllysaten wurde der Sandwich-ELISA (siehe 2.2.1.7) verwendet. Da durch unterschiedlich starke Expression der verschiedenen E^{ms}-Konstrukte die Zelllysatzmenge, um jeweils gleiche Mengen an E^{ms} einzusetzen, variiert werden musste, wurde auch jeweils die gleiche Menge an Reaktionspuffer zugegeben. Nachdem der erste Zeitwert erreicht war, wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes in gleiches Volumen an formamidhaltigen Auftragspuffer überführt und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Nach Auftrennen der Reaktionsansätze in einem 5 %igen denaturierenden PAA-Gel wurde ein „*Imaging Screen*“ aufgelegt und anschließend ausgewertet.

BHK-Zelllysate enthielt Ribonukleasen, die ebenfalls das eingesetzte RNA-Substrat zu RNA-Molekülen definierter Größe degradierten. Da diese Spaltprodukte selbst nach sechzigminütiger Inkubation noch größer waren als die E^{ms}-spezifischen Spaltprodukte, wurde das Vorkommen von kleinen E^{ms}-spezifischen Spaltprodukten, wie sie nach Inkubation von BHK-Zelllysate mit dem RNA-Substrat fehlten, als Maß für die RNase-Aktivität gewertet. Um eine quantitative Aussage treffen zu können, wurde der Anteil von kleineren E^{ms}-spezifischen Spaltprodukten an der gesamten Spaltung bestimmt. Da der Sandwich-ELISA im Falle der C-Deletionsmutanten nicht angewendet werden konnte, wurde hier das Vorkommen von E^{ms}-spezifischen kleineren Spaltfragmenten als Aktivitätskriterium gewertet.

2.2.7 Klonierungen

2.2.7.1 Synthese der RNA-Substrate *Sub-AGC*, *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*

Zunächst erfolgte die Hybridisierung der Oligonukleotide *Aura 31* und *Oligo dA*. Hierzu wurden 6 µl *Aura 31* (100 pmol/µl) mit 4 µl *Oligo dA* (100 pmol/µl) gemischt und für 2 min auf 95 °C erhitzt. Die Hybridisierung („*Annealing*“) der Oligonukleotide erfolgte durch langsames Abkühlen des Ansatzes auf 4 °C. Im Anschluss an die Hybridisierungs-Reaktion wurden durch Zugabe folgender Reagenzien die Nukleotidanzahl beider Stränge des DNA-Fragmentes angeglichen sowie die 5'-Enden phosphoryliert:

T4 DNA-Polymerase [5 U/ μ l]	1 μ l
T4 PNK [10 U/ μ l]	0,5 μ l
dNTPs [10 mM]	2 μ l
ATP [10 mM]	5 μ l
H ₂ O bidest.	4 μ l
10x „all for one“-Enzympuffer	2,5 μ l
Gesamtvolumen	25 μ l

Der Reaktionsansatz wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Phenol/Chloroform Behandlung (siehe 2.2.3.5) und eine Ethanolpräzipitation (siehe 2.2.3.6) durchgeführt. Das Pellet wurde in 10 μ l H₂O bidest. gelöst. Zur Klonierung in den Plasmidvektor Bluescript Sk II wurde dieser zunächst mit Sac I linearisiert und die verschieden großen DNA-Einzelstränge der Schnittstelle anschließend durch Zugabe von 0,3 μ l T4 DNA-Polymerase [5 U/ μ l] und 2 μ l dNTPs [10 mM] aufgefüllt. Nachdem sowohl der Plasmidvektor Bluescript Sk II als auch das DNA-Fragment mit der Restriktionsendonuklease Hind III geschnitten worden waren, wurde das DNA-Fragment *Hind III* und „blunt“ in den pBluescript Sk II ligiert. Unter Verwendung des Primerpaares YTS 1/2 wurde ein Uridin, das im pBluescript Sk II zwischen der T3 Promotersequenz und der Sac I-Schnittstelle vorhanden ist, mit Hilfe der „QuikChange“-Methode zu einem Cytosin mutiert, was zum Entstehen des Konstruktes *Sub-ACG* führte. Das Einfügen einer NpU Schnittstelle in die poly A Region von *Sub-ACG*, wodurch die Substrate *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU* entstanden sind, erfolgte mittels „QuikChange“-Methode unter Verwendung der Primerpaare YTS3/YTS4 bzw. YTS 5/YTS 6.

2.2.7.2 Klonierungsstrategie der E^{rms}-Deletionsmutanten

Zu Beginn erfolgte die Deletion von C-terminalen Aminosäuren im E^{rms} des p494#11 (von T. Rügenapf erhalten) mittels PCR mit den Minusstrang-Primern E^{rms} 100-210 jeweils in Verbindung mit dem Plusstrang-Primer CST 76, so dass insgesamt sieben Konstrukte entstanden sind. Die DNA-Sequenz, die von den Oligonukleotiden CST 76 und E^{rms} 100-210 eingerahmt wird, besteht aus der T7 Promotersequenz, gefolgt von der IgG κ -Signalsequenz, der Sequenz für das FLAG Peptid sowie der jeweiligen verkürzten E^{rms}-Sequenz. Es kommt zur C-terminalen Verkürzung des E^{rms}, da die Oligonukleotide E^{rms} 100-210 zu verschiedenen C-terminalen Sequenzbereichen des „antisense“-Stranges komplementär sind. Die flankierte DNA-Sequenz wurde für die transiente Expression *Hind III/BamH I* in den p385 kloniert. Hieraus resultierten die Plasmide E^{rms} 100 bis E^{rms} 210.

2.2.7.3 Mutation von N-Glykosylierungsstellen

Zur Mutation der N-Glykosylierungsstellen wurde jeweils das entsprechende Asparagin-Kodon der N-Glykosylierungsstellen (NxT oder NxS) mit Hilfe der „*QuikChange*“-Methode zu einem Glutamin-Kodon mutiert. Zunächst erfolgte die Mutation jeweils einer N-Glykosylierungsstelle des E^{rms} im Klon p493 (von T. Rümenapf erhalten) unter Verwendung der „*QuikChange*“-Primer E^{rms} NG 1(+/-) bis E^{rms} NG 9 (+/-). Mit dem Primerpaar E^{rms} NG 2/3(+/-) wurde ein linearisiertes PCR Produkt erzeugt, das durch Religation zirkularisiert werden musste. Bevor eine Religation durchgeführt werden konnte, mussten die 5'-Enden beider DNA-Einzelstränge mit Hilfe einer PNK-Behandlung (Zugabe von 5 U PNK und 2 µl ATP [10 mM] zu dem PCR-Ansatz und Inkubation bei 37 °C für 1h) phosphoryliert werden. Damit nur die zweite ohne gleichzeitige Mutation der dritten N-Glykosylierungsstelle mutiert wurde, wurden die Primer E^{rms} NG 2/3+rev und E^{rms} NG 2/3- verwendet; zur Mutation der dritten ohne die zweite N-Glykosylierungsstelle die Primer E^{rms} NG 2/3-rev und E^{rms} NG 2/3+. Um mehrere N-Glykosylierungsstellen zu mutieren, wurden entweder erneut die entsprechenden N-Glykosylierungsstellen mittels „*QuikChange*“-Methode auf schon erzeugten Klonen mutiert, bzw. die Mutation von achter und/oder neunter N-Glykosylierungsstelle durch Chimärenbildung schon bestehender Klone vorgenommen: Hierzu wurde die E^{rms}-Sequenz, welche die erste bis siebte N-Glykosylierungsstellen determiniert, über die Verwendung der Restriktionsschnittstellen Hind III/Sda I in das Konstrukt mit deletierter achter und/oder neunter N-Glykosylierungsstelle eingefügt. Die Hind III Schnittstelle ist 5' von E^{rms} im p493 vorhanden, während die Sda I Schnittstelle bei Aminosäure 114 im E^{rms} determiniert ist. Da die achte und neunte N-Glykosylierungsstellen an Position 143 und 158 lokalisiert sind, und die erste bis siebte N-Glykosylierungsstellen „upstream“ der Sda I Schnittstelle vorhanden sind, konnte eine Chimärenbildung erfolgen. Insgesamt entstanden 38 Konstrukte mit Mutation von N-Glykosylierungsstellen (pyh 1- pyh 38).

2.2.7.4 Synthese von zwölf Gesamtklonen inklusive mutierter N-Glykosylierungsstellen

Zunächst wurden die N-Glykosylierungsstellen im E^{rms} des KSPV p447, das in der Sequenz eines Vorklons, pHCK9, enthalten ist, mittels „*QuikChange*“-Methode mutiert. Hierzu konnten größtenteils die Primer, die schon zum Entstehen der Klone pyh 1- pyh 38 geführt haben, verwendet werden. Nachdem die gewünschten N-Glykosylierungsstellen im pHCK9 mutiert waren (Klone pyh 39- pyh 50), erfolgte die Klonierung der mutierten E^{rms}-Sequenz

über Bgl II/Xho I in den infektiösen Gesamtklon p447. Auf diese Weise sind die Konstrukte pyh 51- pyh 62 entstanden.

2.2.8 Proteinmodellierung

Um eine 3-D Struktur eines Proteins zu erhalten, muss gefordert werden, dass eine Röntgenkristallstruktur eines verwandten Proteins in einer guten Auflösung existiert. Falls eine Röntgenkristallstruktur eines verwandten Proteins bekannt ist, kann anhand dieser 3-D Struktur die Struktur des zu modellierenden Proteins erzeugt werden. Zu Beginn wird ein Sequenzvergleich beider Aminosäuresequenzen angefertigt. In diesem Sequenzvergleich werden die Aminosäuren der bekannten Proteinstruktur mit chemisch ähnlichen Aminosäuren des zu modellierenden Proteins möglichst deckungsgleich verglichen. Auf Basis dieses Vergleichs können nun die strukturellen Einheiten, die von Aminosäuren innerhalb der bekannten 3-D Struktur gebildet werden, für die zu modellierenden analogen Aminosäuren übernommen werden. Diese strukturellen Einheiten werden nun in einem Computerprogramm (Threader) bewertet. Es werden „scores“ ermittelt, die eine Aussage darüber zulassen, ob die Aminosäuren des zu modellierenden Proteins ebenso wie ihre Analoga der Kristallstruktur eine bestimmte strukturelle Einheit wie z. B. β -Faltblatt favorisieren bzw. zulassen. Falls das der Fall ist und nur wenige Änderungen vorzunehmen sind, können diese direkt mit Hilfe eines weiteren Computerprogramms (WHAT IF) ausgehend von der bekannten Kristallstruktur vorgenommen werden. Im Falle das die Resultate einer „Threader“-Analyse zwar eine ähnliche Proteinstruktur vermuten lassen, aber keine identische möglich ist, muss ein freieres Modellieren erfolgen. So musste in dieser Arbeit der C-terminale Bereich des E^{ms} (aa 103- 227) frei mit Hilfe eines weiteren Computerprogramms auf Basis einer zweiten Proteinstruktur (Protease ω) modelliert werden (Modeller von Andre Sali). Mit Hilfe dieses Programmes ist es möglich, strukturelle Einheiten und weitere Faktoren wie das Knüpfung von Disulfidbrücken festzulegen. Das Zusammenfügen des N-terminalen Bereichs (in WHAT IF auf Basis der 3-D Struktur der RNase Rh modelliert) und des C-terminalen Bereichs (im Modeller von Andre Sali auf Basis der 3-D Struktur der Protease ω modelliert) erfolgte erneut mit Hilfe des Computerprogramms WHAT IF.

Um eine Bewertung der modellierten Proteinstruktur zu erhalten, können verschiedene Untersuchungen durchgeführt werden. Eine Möglichkeit stellt der „Ramachandran plot“ dar. Hierbei werden die Rotationswinkel der N-C α Bindung (ψ) und der C α -C Bindung (ϕ) der

Peptidkette gegeneinander graphisch dargestellt. Für diese Winkel gibt es vier mögliche sterische Konformationen, die sie einnehmen können. Die Gradzahl der Winkel entscheidet darüber, welche strukturelle Einheit vorliegt bzw. ob die vorliegenden Winkel im festgelegten Bereich liegen. Ein „Ramachandran plot“ der modellierten Peptidkette erlaubt somit eine Aussage in Bezug auf die Qualität der Peptidkette. Weiterhin können noch Energieminimierungen und Molekulardynamikstimulationen durchgeführt werden. Eine qualitative Bewertung der modellierten Proteinstruktur ist ferner mit einem Teilmodul von WHAT IF (Whatcheck) möglich.

Das in dieser Arbeit erstellte Modell von E^{rms} ist in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Sauerborn erfolgt.

3. Ergebnisse

A) biochemische Charakterisierung der Ribonuklease E^{rns}

3.1 Substratspezifität

Die Konservierung des aktiven Zentrums der RNase E^{rns} aller bisher sequenzierten Pestiviren und die Entstehung von attenuierten Viren nach Inaktivierung der Enzymaktivität deuten auf eine/mehrere wichtige Funktion/en der Ribonuklease innerhalb des viralen Lebenszyklus und der Pathogenese hin. Die Bedeutung der Enzymaktivität von E^{rns} für die Infektion bzw. den infizierten Organismus ist nicht bekannt. Ein Ansatz zur Aufklärung der Funktion von E^{rns} sollte in der Bestimmung des natürlichen Substrates liegen. Da verschiedene RNA-Moleküle wie z. B. genomische RNA und ribosomale RNA effektiv von E^{rns} gespalten werden, war anzunehmen, dass keine besonders ausgeprägte Substratspezifität besteht. Andererseits konnte eine deutliche Präferenz für homopolymeres Uridin gefunden werden, während poly A, C und G kaum oder gar nicht gespalten werden (*Schneider et al.*, 1993; *Windisch et al.*, 1996; *Vidovic*, 1997). Aus diesem Grund lag es nahe, die tatsächlichen Spaltstellen in einem heteropolymeren Substrat (ein RNA-Polymer, das alle Ribonukleotide enthält) zu bestimmen.

3.1.1 Bestimmung der Spaltspezifität von E^{rns} im limitierenden Verdau

Zur Bestimmung der Spaltstellen in einer heteropolymeren RNA bekannter Sequenz wurde die Polylinkersequenz des Plasmidvektors, pBluescript Sk II, als „*Template*“ für die *in vitro* Transkription gewählt. Da E^{rns} eine einzelstrangspezifische Ribonuklease ist, sollte die Bildung von Doppelsträngen durch palindromische Sequenzen möglichst vermieden werden. E^{rns} wurde ebenso wie in allen bisherigen Arbeiten in Insektenzellen erzeugt, weil die Ausbeute von E^{rns} nach Infektion von Säugerzellen mit Pestiviren sehr gering ist (z. B. *Schneider et al.*, 1993; *Windisch et al.*, 1996; *Vidovic*, 1997). Das E^{rns}-Protein wurde aus dem Zelllysate von 3x 175 mm² Zellkulturfläche (~1x 10⁸ Zellen) immunaffinitätschromatographisch aufgereinigt. Zur Aufreinigung wurde ein monoklonaler Antikörper gegen E^{rns} (Bezeichnung mAk 24/16) verwendet. Nach Elution gebundenen Proteins mit 4 M MgCl₂

erfolgte die Dialyse und Einengung des Eluats durch Ultrafiltration. Insgesamt wurden 60 µg E^{ms}-Protein mit einer Konzentration von 200 ng/µl im Eluat gewonnen.

Zur weiteren Kontrolle auf Uniformität und Reinheit erfolgte die Auftrennung des Eluates in einer SDS-PAGE (Laemmli-Gel) unter reduzierenden (5 % β-Mercaptoethanol) bzw. nicht reduzierenden Bedingungen. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Blau gefärbt. Unter reduzierenden Bedingungen werden bestehende Disulfidbrücken gespalten, und das Homodimer zerfällt in seine Monomere. Während das kalkulierte Molekulargewicht von E^{ms}-Monomeren 25 kDa beträgt, ist das apparente Molekulargewicht ~35-48 kDa. Diese Differenz ist auf die Verwendung unterschiedlich vieler Anheftungsstellen für N-glykosydisch gebundene Zuckermoleküle zurückzuführen. Unter nicht reduzierenden Bedingungen sind die unterschiedlichen Glykosylierungsformen zwischen 68 kDa und 80 kDa zu erkennen, wobei einzelne Banden nicht aufgetrennt werden können (Abb. 1).

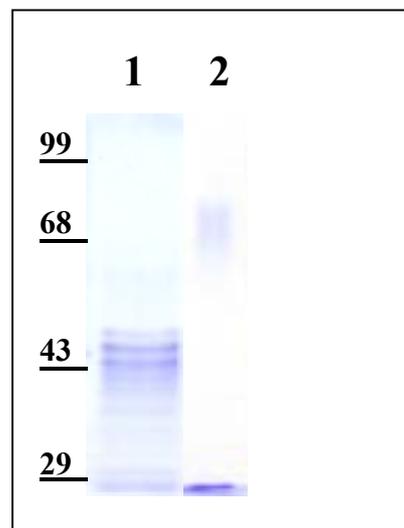


Abb. 1: Darstellung von rekombinatem E^{ms} in der SDS-PAGE

Je 0,5 µg rekombinantes E^{ms} wurde unter reduzierenden (1) und unter nicht reduzierenden Bedingungen (2) in verschiedenen SDS-PAGEs aufgetrennt. Die Darstellung der Proteine erfolgte mit Coomassie Blau. Ein Molekulargewichtsstandard in kDa ist auf der linken Seite angegeben.

Zur Synthese des RNA-Substrates wurde der Plasmidvektor mit der Restriktionsendonuklease Sac I linearisiert, und die *in vitro* Transkription mit T7 RNA-Polymerase durchgeführt. Anschließend wurde die *in vitro* transkribierte RNA durch Zugabe von „calf intestinal alkaline phosphatase“ (CIAP) an ihrem 5'-Ende dephosphoryliert, bevor das phosphatfreie 5'-Ende der RNA durch Übertragung der γ-Phosphatgruppe von ³²P-γ-[ATP] mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK) radioaktiv markiert wurde. Um nicht eingebaute Radioaktivität abzutrennen, erfolgte die Reinigung des markierten *in vitro* Transkripts über ein denaturierendes Polyacrylamid (PAA)-Gel (5 %). Zur Ermittlung der Spaltstellen in einem

heteropolymeren Substrat wurden 9×10^4 cpm markiertes *in vitro* Transkript mit gereinigtem Enzym inkubiert. Das Verhältnis von Enzym zu Substrat wurde so gewählt, dass ein limitierender Verdau erfolgte. Ließe man die Reaktion vollständig ablaufen, blieben nur kleinste Fragmente übrig, die nur schwer oder gar nicht auszuwerten sind. Als Referenz dienten Ribonukleasen bekannter Spaltspezifität: Ribonuklease T1 von *A. oryzae* mit Spezifität für GpN und Ribonuklease Phy M von *P. polycephalum* mit Spezifität für UpN und ApN (Abb. 2). In einem weiteren Versuch wurden zusätzlich Ribonuklease U₂ von *Ustilago sphaerogena* mit Spezifität für ApN und Ribonuklease *B. cereus* mit Spezifität für UpN und CpN verwendet (nicht gezeigt). Die Inkubation von Ribonuklease Phy M und RNase T1 mit RNA wird üblicherweise in einem Reaktionspuffer mit 7 M Harnstoff und 20 mM Natriumcitrat, pH 5,0 durchgeführt. In Anwesenheit von 7 M Harnstoff unterbleibt die Basenpaarung der einzelsträngigen RNA und damit die Bildung von Sekundärstrukturen. Bemerkenswerterweise ist die Proteinstruktur von Ribonukleasen so stabil, dass sie selbst unter diesen stark denaturierenden Bedingungen noch aktiv sind. Um einen vollständigen Abbau des *in vitro* Transkripts zu verhindern, wurden jeweils 20 µg tRNA zu den Ansätzen gegeben. Nach einer Inkubationsdauer von 20 min bei 56 °C wurden die Spaltprodukte durch eine Ethanol-fällung konzentriert, in formamidhaltigen Auftragspuffer auf 95 °C erhitzt und in einem denaturierenden PAA-Sequenzgel (8 %) aufgetrennt. Zur einfachen Identifizierung der Spaltmuster wurde eine Sequenzierreaktion der als „*Template*“ dienenden Polylinkersequenz parallel im gleichen Gel aufgetrennt. Dabei ist zu beachten, dass DNA aufgrund eines niedrigeren Molekulargewichts schneller im elektrischen Feld wandert als RNA (Abb. 2).

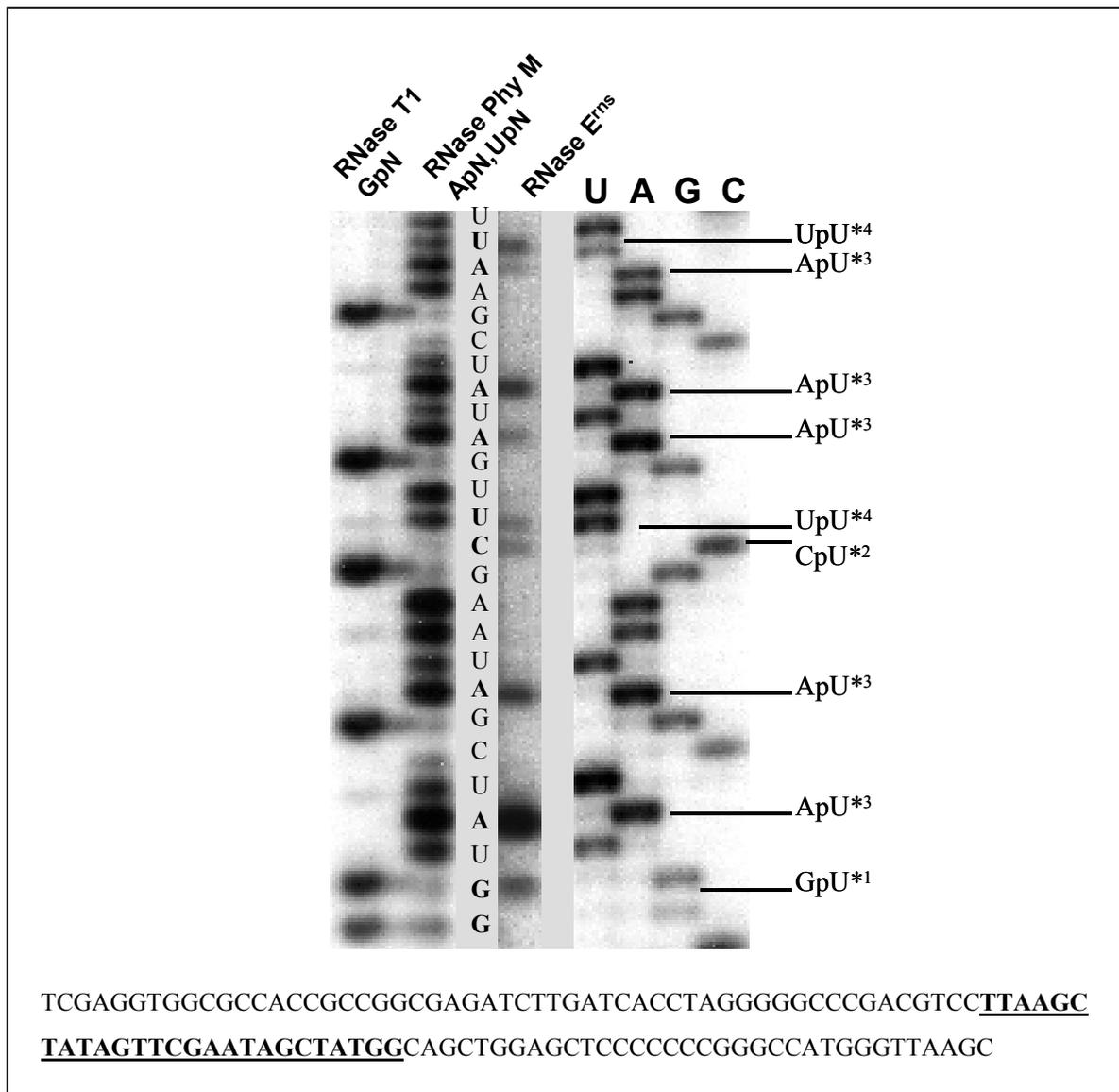


Abb. 2: limitierender Verdau eines heteropolymeren RNA-Substrates durch E^{ms}

9×10^4 cpm 5'-[^{32}P] markiertes RNA-Transkript der Polylinkersequenz des Plasmidvektors pBluescript Sk II und 20 μg tRNA wurden unter denaturierenden Bedingungen (7 M Harnstoff und 20 mM Natriumcitrat, pH 5,0) für 20 min bei 56 °C jeweils mit RNase T1, RNase Phy M bzw. E^{ms} inkubiert. Auf dem Autoradiogramm bilden sich nur die 5'-Spaltprodukte ab. Die Sequenzierreaktion der Polylinkerregion des pBluescript Sk II wurde ebenfalls aufgetrennt und die Sequenz im unteren Bildabschnitt dargestellt. Der im Autoradiogrammausschnitt abgebildete Sequenzbereich ist unterstrichen.

Aufgrund unterschiedlicher Spalteffizienzen der Ribonukleasen wurden für die Abbildung Autoradiogramme mit verschiedenen langen Expositionszeiten gewählt (24 h für RNase T1 und RNase Phy M, 72 h für RNase E^{ms} und 12 h für die Sequenzierreaktion).

Da die Ausgangs-RNA an ihrem 5'-Ende radioaktiv markiert ist, sind nur die 5'-Spaltprodukte erkennbar. Die Sequenz des T7-Transkripts kann anhand der 5'-Spaltprodukte der Referenzribonukleasen bestimmt werden, weil diese Ribonukleasen spezifisch Phosphodiesterbindungen von GpN bzw. ApN und UpN spalten. Aufgrund der Spaltung 3' von Guanin bzw. 3' von Adenin und Uridin ist die Base am 3'-Ende der spezifischen 5'-Spaltprodukte immer ein Guanin bzw. Adenin oder Uridin. Der Vergleich mit der gleichzeitig

elektrophoretisch aufgetrennten Sequenzierreaktion des entsprechenden „*DNA-Templates*“ vereinfacht das Nachvollziehen der Sequenz anhand der spezifischen Spaltprodukte. Während die RNasen T1 und Phy M an den für sie spezifischen Phosphodiesterbindungen spalten, ergibt sich aus der Analyse des Spaltungsmusters von E^{rns} eine Bevorzugung von Uridin. Hierbei erfolgte die Spaltung jedoch 5' von Uridin (NpU Spaltstelle). Aus diesem Grund werden die 3'-Enden der 5'-Spaltprodukte aus Guanin (Abb. 2: *¹), Cytosin (*²), Adenin (*³) bzw. Uridin (*⁴) gebildet.

3.1.2 Charakterisierung der NpU Spaltstelle

Die Spaltung von einem NpU Dinukleotid der heteropolymeren RNA in einem limitierenden Verdau durch E^{rns} steht im Einklang mit der Präferenz von poly-Uridin bei Inkubation mit homopolymeren Substraten. Zur weiteren Charakterisierung der NpU Spaltstelle sollte unter anderem untersucht werden, ob eine Präferenz für eine Base an der N-Position vorhanden ist. Für die Durchführung solcher Experimente wurden einzelsträngige RNA-Moleküle benötigt, die nur ein einzelnes Uridin in der Sequenz enthalten. Da uns kein natürliches Substrat mit nur einem Uridin in einer Sequenz von ca. 30-50 Nukleotiden zur Verfügung stand, musste ein entsprechendes „*Template*“ für die *in vitro* Transkription konstruiert werden. Um auch unerwünschte Sekundärstrukturen durch Basenpaarung auszuschließen, wurde eine Sequenz erzeugt, die weitgehend aus Adeninen besteht. Hierzu wurde ein aus 30 Thymidinresten und einer Hind III Schnittstelle versehenes Oligonukleotid mit einem Oligo dA (12-18 mer) hybridisiert und mit T4 DNA-Polymerase und dNTPs aufgefüllt. Der entstandene A-T Doppelstrang wurde mit Hind III gespalten und in die Hind III/Sac I „*blunt site*“ von pBluescript Sk II kloniert. Da in der Sequenz zwischen T3 Promoter und Sac I Restriktionsenzym-Schnittstelle ein Uridin auftrat, musste dieses durch „*QuikChange*“-Mutagenese eliminiert werden. In einem Vorversuch sollte geklärt werden, ob das vorliegende Uridin-freie *in vitro* Transkript (*Sub-ACG*: 5' AACAAAAGCCGG-(49A)-GC^{3'}) von E^{rns} gespalten wird. Für die *in vitro* Transkription mit T3 RNA-Polymerase wurde das Konstrukt, welches *Sub-ACG* enthält, mit der Restriktionsendonuklease Hind III linearisiert, das 5'-Ende der RNA mittels CIAP-Behandlung dephosphoryliert und mit ³²P-γ-[ATP] und Polynukleotidkinase am 5'-Ende markiert.

Dann wurde die *in vitro* transkribierte RNA durch Auftrennen in einem denaturierenden PAA-Sequenzgel (8 %) von nicht eingebauter Radioaktivität gereinigt. Auf dem Autoradiogramm zeigte sich in der erwarteten Größe keine einzelne Bande, sondern eine

Schar verschieden großer Moleküle, die sich jeweils um ein Nukleotid unterschieden. Für RNA-Polymerasen von Bakteriophagen (z. B. T3, T7 und Sp6) ist bekannt, dass es zu einem „*Template-switch*“ kommen kann. Nachdem die RNA-Polymerase am 3'-Ende angelangt ist, kann eine Bindung der RNA-Polymerase am zweiten DNA-Strang erfolgen, bevor die RNA-Synthese durch Dissoziation des Enzyms beendet wird. Hierdurch wird das definierte 3'-Ende des Transkripts um ein bis mehrere Nukleotide verlängert. Da im Degradationstest ein Transkript definierter Länge mit E^{ms} inkubiert werden sollte, wurde eine einheitliche RNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert.

Im Gegensatz zu einem limitierenden Verdau wurde im Degradationstest der vollständige Abbau des Transkripts angestrebt. Da das verwendete Substrat (*Sub-ACG*) aufgrund der poly-Adenin Sequenz keine stabile Sekundärstruktur ausbildet, wurde auf eine Inkubation mit 7 M Harnstoff verzichtet. Stattdessen erfolgte die Inkubation bei 40 mM Tris-Acetat und 0,5 mM EDTA, pH 6,5, weil diese Bedingungen für die enzymatische Aktivität des E^{ms} als optimal beschrieben sind (*Hulst et al.*, 1994 und *Windisch et al.*, 1996). Im Degradationstest wurden 5×10^4 cpm *Sub-ACG* mit verschiedenen Enzymkonzentrationen (25 ng, 50 ng und 100 ng E^{ms}) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Substrat *Sub-ACG* zeigte sich resistent gegenüber dem Verdau mit E^{ms} (Abb. 3).

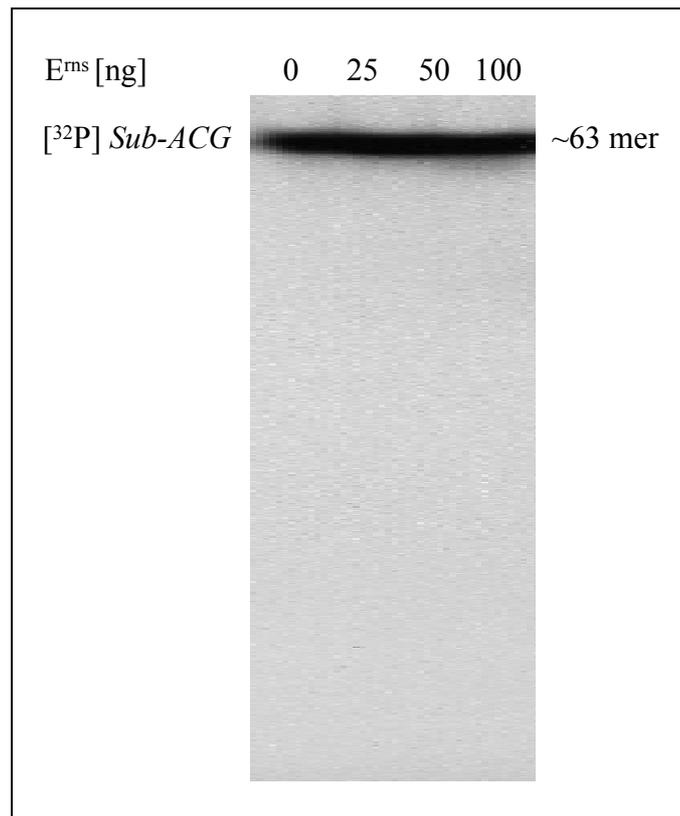


Abb. 3: Inkubation von *Sub-ACG* mit E^{ms}

Verschiedene Konzentrationen an E^{ms} (25 ng, 50 ng, 100 ng) wurden für 20 min bei 37 °C mit einer zuvor mittels Gelreinigung gewonnenen definierten Transkriptionsbande von *Sub-ACG* inkubiert, und die Reaktionsansätze anschließend in einem denaturierenden PAA-Sequenzgel (8 %) aufgetrennt.

Offensichtlich ist das interne Vorkommen von Uridin notwendig, um endoribonukleolytische Aktivität zu erhalten. Der Nachweis, dass das Substrat als Einzelstrang vorliegt, wurde durch Inkubation mit einzelstrangspezifischen Ribonukleasen (RNase A: bevorzugte Spaltung von C/UpN und RNase T1: GpN) erbracht, weil nach elektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsansätze Spaltung nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt).

Nach diesem Vorversuch wurde in das Uridin-freie Substrat durch Mutagenese NpU Dinukleotide in die homopolymere Adenin Region eingefügt. Um den Einfluss der Base an der N-Position der NpU Spaltstelle zu analysieren, wurden vier verschiedene Substrate erzeugt: *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU* (Tab.1). Da die dazu verwendeten „*QuikChange*“-Primer an unterschiedlichen Positionen in der poly Adenin Region banden, resultierte aus der „*primer extension*“-Reaktion, dass die Substrate unterschiedlich groß waren.

Sub-ACG (63 mer)	5' AACAAAAGCCGG- (49 A) -GC ^{3'}
Sub-ApU (56 mer)	5' AACAAAAGCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUAAAAAAAAAAAGC ^{3'} A-----42 mer-----A U---14 mer---C
Sub-CpU (45 mer)	5' AACAAAAGCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUAUAAAAAAAAAAAGC ^{3'} A-----31 mer-----C U---14 mer---C
Sub-GpU (56 mer)	5' AACAAAAGCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGUAAAAAAAAAAAGC ^{3'} A-----42 mer-----G U---14 mer---C
Sub-UpU (52 mer)	5' AACAAAAGCCGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAUUAAAAAAAAAAAGC ^{3'} A-----38 mer-----U U---14 mer---C

Tab. 1: RNA-Sequenz der NpU Substrate

RNA-Sequenzen der Substrate, die für die Charakterisierung der NpU Spaltstelle erzeugt wurden. Als Besonderheit enthalten sie eine singuläre NpU Spaltstelle mit unterschiedlicher Base an der N-Position. Unter den Sequenzen sind die Größen der jeweils zu erwartenden Spaltprodukte angegeben.

Die radioaktive Markierung von *Sub-ApU* erfolgte durch Einbau von $^{32}\text{P}-\alpha$ -[UTP] während der *in vitro* Transkription. 5×10^4 cpm Gel-gereinigtes *Sub-ApU* wurde mit verschiedenen Konzentrationen an E^{tns} (25 ng, 50 ng und 100 ng) bzw. RNase A/T1 Mix inkubiert und in einem denaturierenden 8 %igen PAA-Sequenzgel aufgetrennt (Abb. 4). E^{tns} spaltet *Sub-ApU* spezifisch, wobei das längste Spaltprodukt eine Länge von 42 Nukleotiden (+/- 2) hatte, was der erwarteten Größe entspricht. Jedoch traten noch zusätzliche Spaltprodukte in Erscheinung. Möglicherweise könnten weitere Phosphodiesterbindungen als NpU endonukleolytisch gespalten werden. Hinweise auf eine zusätzliche exonukleolytische Spaltung sind jedoch auch vorhanden, weil die zusätzlichen Spaltprodukte sich jeweils um ein Nukleotid unterscheiden, was charakteristisch für eine exonukleolytische Aktivität ist (z. B. *Zuo & Deutscher, 2002*).

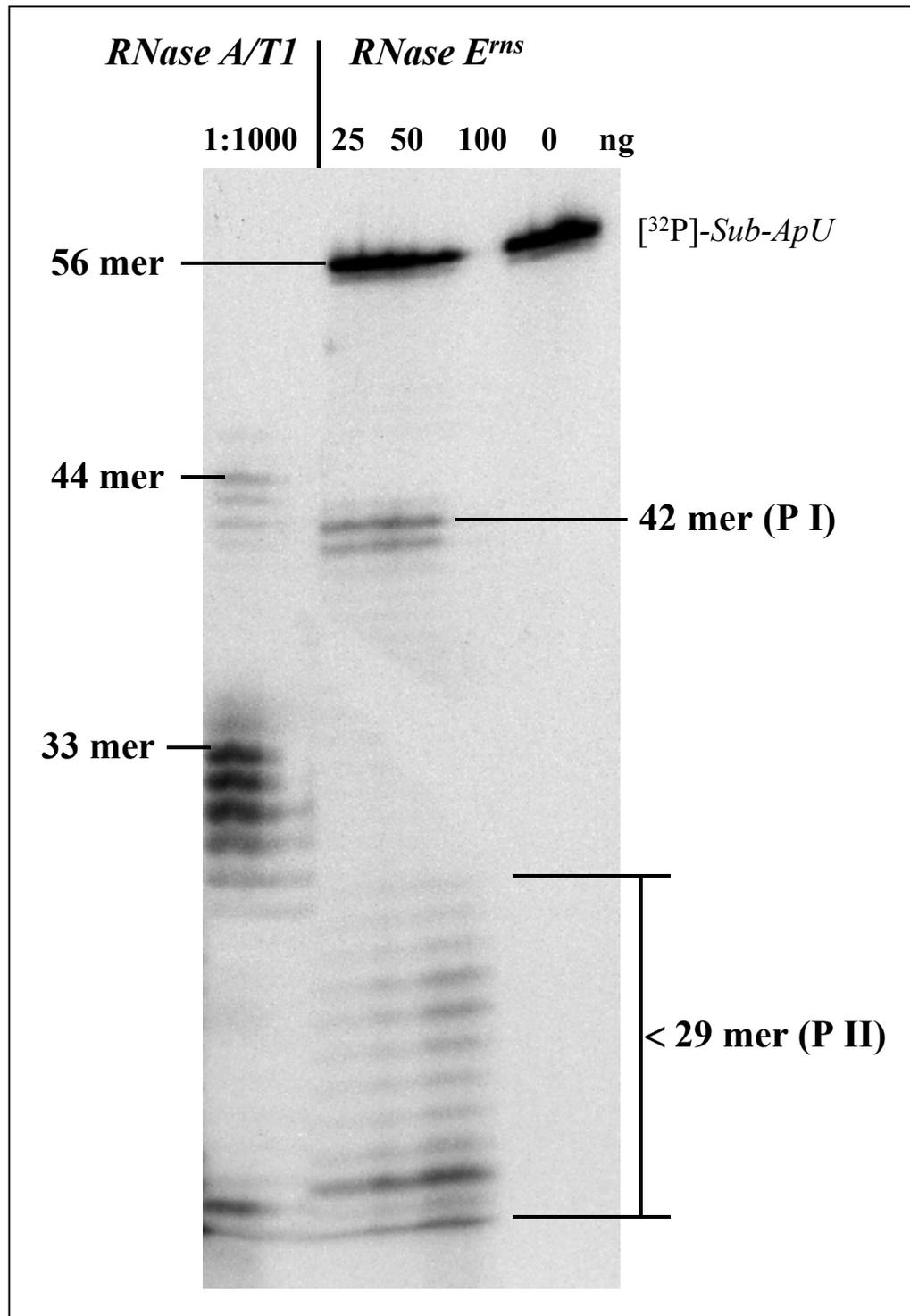


Abb. 4: Degradationstest mit $[^{32}\text{P}]$ markiertem Sub-ApU und verschiedenen Konzentrationen an E^{ms} (25 ng, 50 ng und 100 ng) bzw. RNase A/T1 Mix

$[^{32}\text{P}]$ markiertes Sub-ApU wurde unter Standardbedingungen des Degradationstests mit verschiedenen Konzentrationen an E^{ms} inkubiert. Die Spaltprodukte wurden anschließend elektrophoretisch aufgetrennt und ein Autoradiogramm erstellt. Im Autoradiogramm sind zusätzlich zur spezifischen Spaltung der ApU Spaltstelle weitere Spaltprodukte nachzuweisen. Das spezifische ApU Spaltprodukt von E^{ms} ist 42 Nukleotide groß (P I), während die weiteren Spaltprodukte weniger als 29 Nukleotide umfassen (P II). Hauptspaltprodukte von Sub-ApU nach Inkubation mit RNase A/T1 sind 29-33 mer und 42-44 mer groß.

Hydrolyse von RNA zur vorübergehenden 2'3'-Zyklisierung, bevor als Endprodukt ein Oligonukleotid mit einem 3'-Phosphat gebildet wird (z. B. *Ohgi et al.*, 1992).

Der Vergleich der Spaltungsmuster von 5'-[³²P] und intern durch [³²P]-Uridin markiertem RNA-Substrat führte ebenfalls zu einer weiteren Eingrenzung der 2. Spaltung, die das Auftreten zahlreicher Spaltproduktbanden bewirkt. Da sich diese Spaltprodukte um ein Ribonukleotid unterscheiden, könnte eine exoribonukleolytische Aktivität vorliegen. In diesem Fall müsste es sich jedoch um eine 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität handeln, da bei Vorliegen einer 5'-3' Exoribonuklease-Aktivität die markierte Phosphatgruppe unverzüglich abgespalten würde.

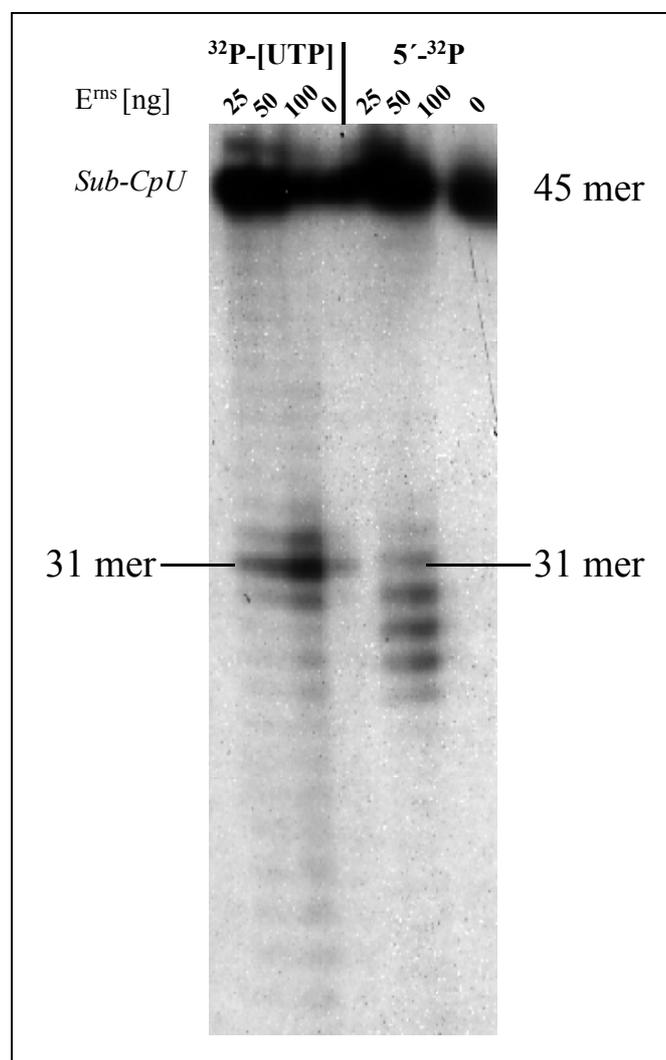


Abb. 6: Spaltung von 5'-[³²P] oder intern markiertem Sub-CpU (45 mer)

5'-[³²P] bzw. [³²P]-Uridin markiertes Sub-CpU wurde mit verschiedenen Konzentrationen an E^{ms} (25 ng, 50 ng und 100 ng) inkubiert. In beiden Fällen enthält das spezifische Spaltprodukt der CpU Spaltstelle, das aus 31 Ribonukleotiden (31 mer) besteht, die radioaktive Phosphatgruppe. Sowohl nach Inkubation von [³²P]-Uridin markiertem als auch –wenn auch geringer ausgeprägt– von 5'-[³²P] markiertem Sub-CpU sind zusätzliche Spaltprodukte vorhanden, die auf eine weitere Ribonuklease-Aktivität schließen lassen.

Als zusätzliche Spaltproduktbanden sind nach Inkubation von ^{32}P - α -[UTP] markiertem *Sub-CpU* mit E^{ms} sowohl größere als auch kleinere Spaltfragmente im Vergleich zum 5'-Spaltprodukt der CpU Spaltstelle nachweisbar. Auch nach Markierung des 5'-Endes ist der Nachweis größerer und kleinerer Spaltfragmente als die spezifischen Spaltproduktbanden der CpU Spaltstelle möglich, jedoch ist die Stärke der Banden geringer als nach Inkubation von intern markiertem RNA-Substrat. Zur Bestimmung einer Präferenz für die Base an der 5'-Position der NpU Spaltstelle wurden im Degradationstest die ^{32}P - α -[UTP] markierten Transkripte aller vier Substrate mit E^{ms} inkubiert. Erneut erfolgte das Auftrennen aller Reaktionsansätze in einem denaturierenden PAA-Sequenzgel (8 %) mit anschließender Autoradiographie. Alle vier Substrate wurden unter diesen Inkubationsbedingungen gespalten. Das Spaltungsmuster der Substrate ist vergleichbar (Abb. 7).

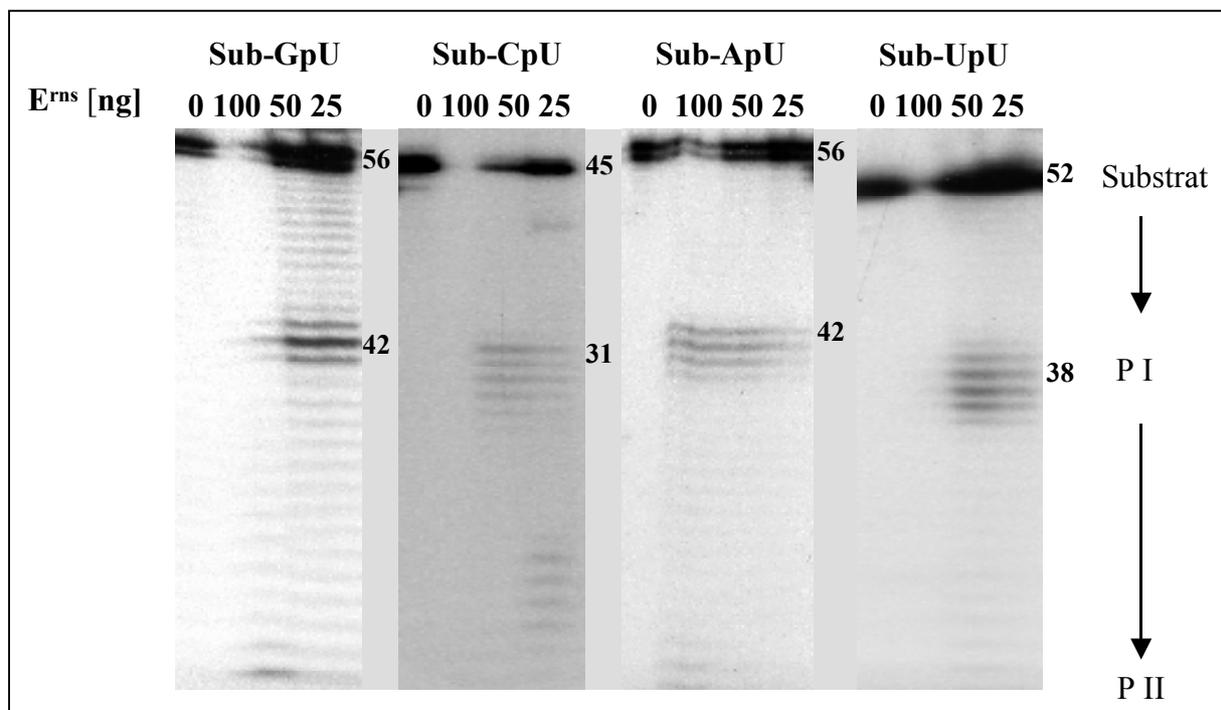


Abb. 7: E^{ms} spaltet alle Formen von NpU

Für die detaillierte Untersuchung der NpU Spaltung wurden Substrate mit definierten Spaltstellen (*Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*) erzeugt und mit E^{ms} inkubiert.

Die Substratbezeichnung ist über den denaturierenden PAA-Sequenzgelen angegeben. Durch den Einbau von ^{32}P - α -[UTP] markiertes *in vitro* Transkript der jeweiligen Substrate wurde mit 100 ng, 50 ng bzw. 25 ng E^{ms} inkubiert. Die Größenangabe der Spaltfragmente ist auf der rechten Seite der Gele angegeben.

P I= Spaltfragmente, die auf einer Spaltung in unmittelbarer Nähe der NpU Spaltstelle basieren

P II= zusätzliche Spaltfragmente

In Höhe der NpU Spaltstelle (P I in Abb. 7) ist regelmäßig eine Schar verschieden großer Spaltprodukte nachweisbar. Dabei entspricht die größte bzw. die stärkste der Spaltproduktbanden aller vier Substrate in der Regel dem Spaltprodukt 5' von Uridin. Es ist

unklar, ob die Entstehung der verschieden großen Spaltprodukte auf unpräzise endoribonukleolytische Spaltung und/oder exoribonukleolytische Aktivität zurückzuführen ist. Auch sind weitere Spaltprodukte in unterschiedlicher Ausprägung bis zur Lauffront des Gels nachweisbar. Sie sind ein Hinweis darauf, dass der Spaltung des Substrates zwei Kinetiken zugrunde liegen. Da Uridin-freie RNA nicht gespalten wird, findet zunächst die Spaltung der NpU Phosphodiesterbindung statt (P I in Abb. 7), bevor das RNA-Molekül weiter abgebaut wird (bis P II in Abb. 7).

3.1.3 Bestimmung der Enzymkinetik mit definierten NpU Substraten

Offensichtlich gibt es keinen qualitativen Unterschied zwischen den vier NpU Spaltstellen, da in allen Fällen Spaltung erkennbar war. Im weiteren sollte geklärt werden, ob ein quantitativer Unterschied besteht. Hierfür war es notwendig, die Enzymkinetiken zu ermitteln. Zur Bestimmung der Enzymkinetik für die vier Substrate (*Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*) musste zunächst der Degradationstest modifiziert werden.

Da vermutlich zwei Enzymkinetiken vorliegen (Substrat \rightarrow P I \rightarrow P II, siehe Abb. 7) sollte nur der Umsatz des Substrates ($S \rightarrow \Sigma$ P I und P II) ermittelt werden. Das war notwendig, damit nur die Kinetik, die der primären endoribonukleolytischen Aktivität von E^{ms} zugrunde liegt, gemessen wird. Aus diesem Grund erfolgte eine indirekte Berechnung der Produktbildung über die Abnahme der markierten RNA-Substratmenge, die für die quantitative Analyse genau bekannt sein musste (Radioaktivität in cpm pro Substratmenge in μg bzw. mol). Für jede Messreihe wurden 4 μg RNA-Substrat (~ 50 mer) verwendet. Um die Menge an Radioaktivität zu begrenzen, wurde ein Gemisch von [^{32}P] markiertem und unmarkiertem *in vitro* T3 Transkript des jeweiligen Substrates eingesetzt. Allgemein basiert die Bestimmung der Enzymkinetik auf Konstanten, die sich für die Bildung und den Zerfall eines Enzym-Substrat Komplexes (ES-Komplex) bzw. die Produktbildung ergeben. Für den Fall, dass bei kleineren Enzym- als Substratmengen die Konzentration des ES-Komplexes gleich bleibt und sich nur die Konzentrationen an Substrat und Produkt ändern („*steady-state*“), erhält man die Michaelis-Menten-Gleichung (Abb. 8). Um Enzymkinetiken bestimmen zu können, muss die Substratmenge so gewählt werden, dass „*steady-state*“ Bedingungen vorliegen.

$$V = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Abb. 8: Michaelis-Menten-Gleichung

v = Geschwindigkeit; V_{\max} = Maximalgeschwindigkeit;
 $[S]$ = Substrat und K_m = Michaelis-Menten-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante K_m ist gleich der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte ihres Maximalwertes (V_{\max}) erreicht. K_m und V_{\max} können mit Hilfe dieser Gleichung (Abb. 8) ermittelt werden, wenn bei gleicher Enzymkonzentration die Substratmenge variiert wird. Wenn die Michaelis-Menten-Gleichung reziprok dargestellt wird, und $1/v$ gegen $1/[S]$ aufgetragen wird, erhält man das Lineweaver-Burk-Diagramm (*Lineweaver & Burk*, 1934). In diesem Diagramm ergibt sich eine Gerade mit $f(x)$ -Achsenabschnitt = $1/V_{\max}$ und x -Achsenabschnitt = $-1/K_m$. Der K_m -Wert eines Enzyms ist unter anderem von den verschiedenen Umgebungsbedingungen und dem Substrat abhängig und ergibt zwei Aussagen: K_m repräsentiert die Substratkonzentration, bei der die Hälfte der aktiven Zentren besetzt ist. Zweitens stellt K_m ein Maß für die Stabilität des ES-Komplexes dar. Ein hoher K_m -Wert zeigt schwache, ein niedriger feste Bindung an.

Um K_m und V_{\max} jedes der vier Substrate (*Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*) ermitteln zu können, wurde E^{ms} mit den vier Substraten im modifizierten Degradationstest inkubiert. Im Degradationstest betrug die Konzentration von RNA im Ansatz 160 pmol/100 μl , mit einem Anteil radioaktiv markierter RNA von nur 0,2 % (0,3 pmol/100 μl). Zur K_m -Bestimmung wurde in unterschiedlichen Ansätzen die Substratmenge variiert und sowohl die verwendete Enzymmenge (10 ng) als auch das Reaktionsvolumen (10 μl) konstant gehalten. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte nach verschieden langer Inkubationsdauer (10 bzw. 15, 20 bzw. 25, 30 bzw. 35, 40 bzw. 45 und 60 bzw. 90 Sekunden) bei 37 °C. Nach Auftrennen der Reaktionsansätze in einem denaturierenden PAA-Gel (8 %) wurde die Radioaktivität mit Hilfe des „*Phosphorimaging*“-Verfahrens ermittelt. Es sollte ausschließlich die NpU-spezifische endoribonukleolytische Aktivität berechnet werden, weshalb es notwendig war, diese Kinetik von anderen zu trennen. Da wenigstens zwei Enzymkinetiken vorliegen, nämlich eine NpU-spezifische endoribonukleolytische und eine weitere, nicht näher charakterisierte, ribonukleolytische Aktivität, wurde die Abnahme der cpm des RNA-Substrates als Messgröße genommen. Dies ist zulässig, da die zweite Kinetik von der

endoribonukleolytischen ersten Kinetik abhängt. Anders ließe sich die Stabilität des NpU-freien Substrates nicht erklären.

Der Degradationstest ist am Beispiel von *Sub-CpU* in Abbildung 9 dargestellt. Während 100 ng RNA-Substrat durch 10 ng E^{ms} nicht vollständig abgebaut wurden, waren 20 ng RNA-Substrat bereits nach 60 Sekunden nahezu vollständig abgebaut. Auch nach längerer Inkubationszeit ließ sich kein vollständiger Abbau von 100 ng RNA-Substrat herbeiführen. Das spezifische Spaltprodukt der Spaltstelle CpU (P I) ist zu jedem Zeitpunkt vorhanden und die Menge mit zunehmender Inkubationsdauer konstant bzw. nur geringgradig reduziert.

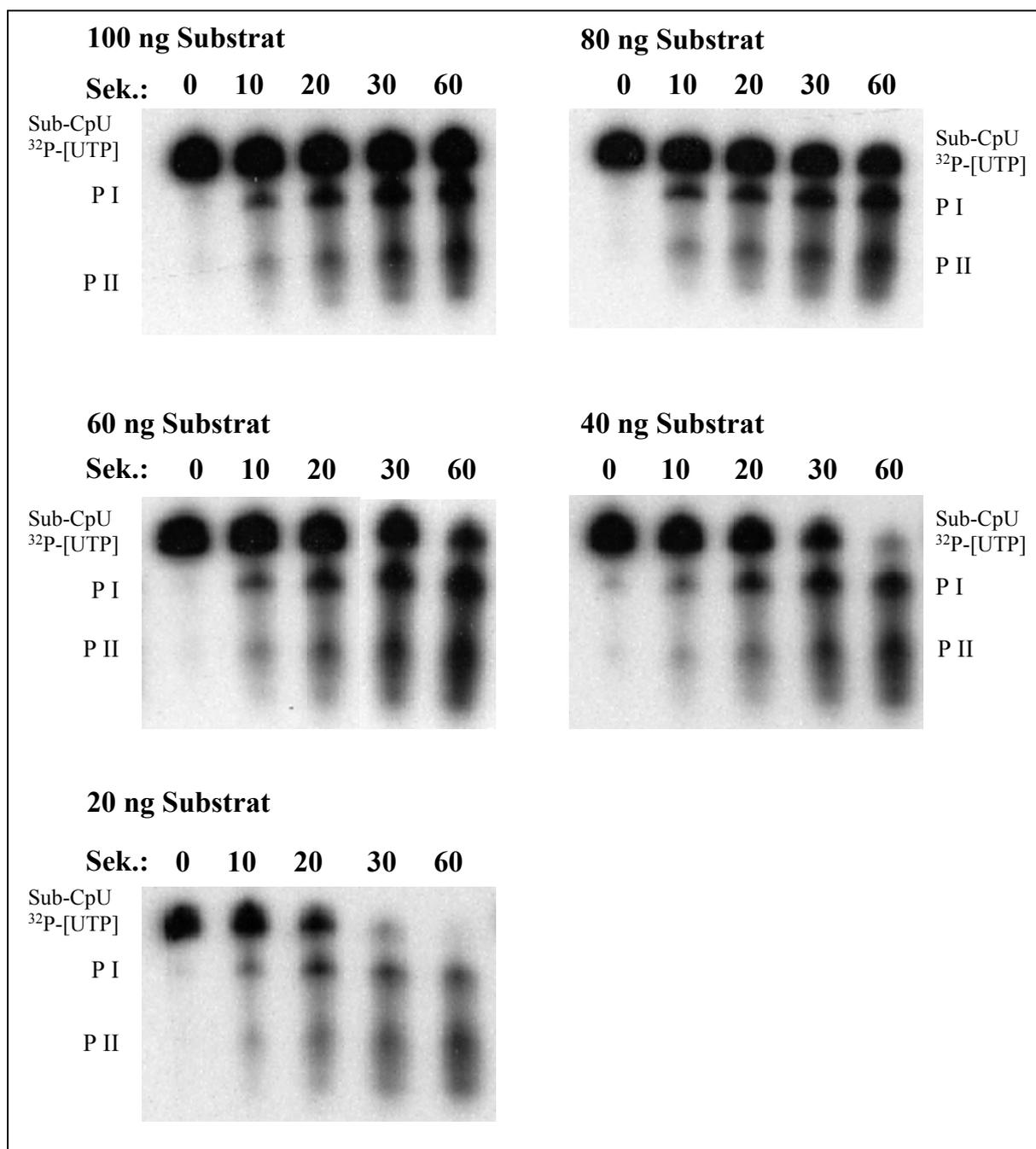


Abb. 9: Bestimmung von K_m und V_{max}

Die Bestimmung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit und der Stabilität des ES-Komplexes erfolgte mit Hilfe des Degradationstests, indem der Substratumsatz pro Zeiteinheit bei gleicher Enzymmenge und variabler Substratkonzentration unter „*steady-state*“ Bedingungen ermittelt wurde. Hierzu wurden jeweils 10 ng E^{ms} mit 20 ng, 40 ng, 60 ng, 80 ng bzw. 100 ng Substrat bei 37 °C für jeweils 10, 20, 30 oder 60 Sekunden inkubiert, und die Reaktionsansätze elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Radioaktivität mittels „*Phosphorimaging*“ ermittelt, und die cpm zum Zeitpunkt $T=0$ der eingesetzten Substratmenge gleich gesetzt, so dass der Substratabbau pro Zeiteinheit für die angegebenen Zeiten ($T= 10, 20, 30$ und 60 s) berechnet werden konnte. Aufgrund des Gelformates ist das spezifische Spaltprodukt (Spaltstelle CpU) als umschriebene Bande sichtbar (**P I**). **P II** bezeichnet die Spaltprodukte, die durch eine weitere enzymatische Aktivität von E^{ms} entstehen.

Da die eingesetzte Radioaktivität (in cpm/ng) bekannt war, konnte der Substratumsatz zu den Zeitpunkten T_0 - T_{60} durch die Bestimmung der Rest-Substratmenge ermittelt werden. Um die

Produktbildung pro Sekunde zu erhalten, wurde der Substratumsatz durch die Inkubationszeit dividiert. In Tabelle 2 sind die Ergebnisse aus drei Versuchsansätzen zusammengefasst. Die Werte nach T= 15 s, 25 s, 35 s und 45 s wurden in Abb. 9 nicht dargestellt.

SubApU

Zeit in Sekunden	20 ng (1,02 pmol)	40 ng (2,04 pmol)	80 ng (4,08 pmol)	120 ng (6,13 pmol)
10	59,5 fmol/s (42-69)	117,5 fmol/s (114-121)	82 fmol/s	
15	50,3 fmol/s (40-58)	69,5 fmol/s (59-80)	95,3 fmol/s (72-109)	117,5 fmol/s (101-144)
20	42,25 fmol/s (39-48)	80,2 fmol/s (79-81)	92 fmol/s (76-108)	148 fmol/s
25	39,5 fmol/s	76 fmol/s	90 fmol/s	124 fmol/s
30	31,9 fmol/s	58,2 fmol/s (51,5-62)	73,8 fmol/s (64-92)	105 fmol/s (103-107)
35		55,5 fmol/s	66,5 fmol/s	96 fmol/s
40		49 fmol/s	59 fmol/s	103 fmol/s
45	22 fmol/s	43,5 fmol/s (43-44)	64 fmol/s (57-71)	102 fmol/s
60	16 fmol/s	32,5 fmol/s (32-33)	51 fmol/s (42-57)	81,5 fmol/s (73-90)

SubCpU

Zeit in Sekunden	20 ng (1,19 pmol)	40 ng (2,38 pmol)	60 ng (3,57 pmol)	80 ng (4,76 pmol)	100 ng (5,95 pmol)
15	21,9 fmol/s (16,5-27,5)	24 fmol/s (20-29)	25 fmol/s (21-29)	56 fmol/s (47-62)	41 fmol/s
30	20 fmol/s (16-23)	31,5 fmol/s (29-35)	26 fmol/s (24-28)	34 fmol/s (27-38)	40 fmol/s
60	18 fmol/s (15-19,5)	26,5 fmol/s (22-30,5)	29 fmol/s (23-41)	35 fmol/s (30-42)	29 fmol/s

SubGpU

Zeit in Sekunden	20 ng (1 pmol)	30 ng (1,5 pmol)	40 ng (2 pmol)	80 ng (4 pmol)	100 ng (5 pmol)
10	60 fmol/s (43-69)	63 fmol/s (48-78)	63 fmol/s		
15	47 fmol/s (41-54)	83 fmol/s	69 fmol/s (65-75)	75 fmol/s	95 fmol/s
20	39 fmol/s (29-45)	48 fmol/s (45-51)	70 fmol/s (69-71,5)	74 fmol/s (63-80)	67,5 fmol/s
25	38 fmol/s	57 fmol/s	68 fmol/s	86,5 fmol/s	96,5 fmol/s
30	31 fmol/s (29-32)	46 fmol/s (46-47)	58 fmol/s (56,5-60)	69 fmol/s	82 fmol/s
35	28 fmol/s	39 fmol/s	53 fmol/s	75 fmol/s (57-82)	81 fmol/s
40	23 fmol/s	42 fmol/s	29 fmol/s	68 fmol/s (66-70)	81 fmol/s
60	16 fmol/s (15-16)	24 fmol/s (24-25)	32 fmol/s (31-33)	54 fmol/s (42-61)	68 fmol/s (67-69)

SubUpU

Zeit in Sekunden	20 ng (1,01 pmol)	30 ng (1,69 pmol)	40 ng (2,2 pmol)	60 ng (3,3 pmol)	80 ng (4,4 pmol)
10	93 fmol/s (88-98)	100 fmol/s (90-110)	103 fmol/s (96-110)	124 fmol/s (110-138)	140 fmol/s (118-163)
15	64 fmol/s	60 fmol/s	94 fmol/s (92-96)		88 fmol/s (79-97)
20	51 fmol/s (50-51)	64 fmol/s (63-65)	67 fmol/s (65-69)	81 fmol/s (75-87)	88 fmol/s (88-89)
25	41 fmol/s	43 fmol/s	61,5 fmol/s		
30	36 fmol/s (35-36)	47 fmol/s (46-47)	60 fmol/s (57-62)	64,5 fmol/s (59-70)	86 fmol/s (79-93)
35	30 fmol/s	35 fmol/s	49 fmol/s		
40	27 fmol/s	37 fmol/s (36-38)	47,5 fmol/s (46-49)	66,5 fmol/s (63-70)	72 fmol/s
45	24 fmol/s	31 fmol/s	41 fmol/s		82 fmol/s

Tab. 2: Enzymkinetische Untersuchung von Sub-ApU, Sub-CpU, Sub-GpU oder Sub-UpU

10 ng E^{ms} wurden mit variablen Substratkonzentrationen über 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 bzw. 60 Sekunden inkubiert und jeweils der Substratumsatz ermittelt. Angegeben ist die gebildete Menge an Spaltprodukten pro Sekunde. Zu beachten ist, dass die Menge der Spaltprodukte sowohl von der Inkubationszeit als auch von der Substratkonzentration abhängig ist. Die Werte der vier Substrate sind Mittelwerte aus mindestens drei Versuchsansätzen.

Anhand der Produktbildung pro Zeiteinheit ist erkennbar, dass die gebildete Menge an Produkt pro Zeiteinheit mit der Länge der Inkubationszeit stetig abnimmt, was auf eine

Produkthemmung oder Substratsättigung hinweist. Da dieser Effekt auch bei hohen Substratkonzentrationen auftritt, liegt wahrscheinlich eine Produkthemmung vor. Aufgrund der Produkthemmung zu späteren Inkubationszeitwerten wurden für die Darstellung der Enzymkinetik (Michaelis-Menten-Kinetik und Lineweaver-Burk-Diagramm) nicht alle Zeitwerte berücksichtigt. Für *Sub-ApU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU* wurden die 10-30 s Zeitwerte und für *Sub-CpU* die 15-60 s Zeitwerte zur Ermittlung der Enzymkinetik verwendet. Die Bestimmung noch früherer Zeitwerte (< 10 s) war aus technischen Gründen nicht möglich.

In Abbildung 10 sind die Michaelis-Menten-Kinetiken aller vier Substrate dargestellt (Produktbildung/Substratkonzentration). In Abbildung 11 sind die Werte zur Darstellung eines Lineweaver-Burk-Diagramms reziprok aufgetragen worden (Schnittpunkte mit den Achsen = $-1/K_m$ und $1/V_{max}$).

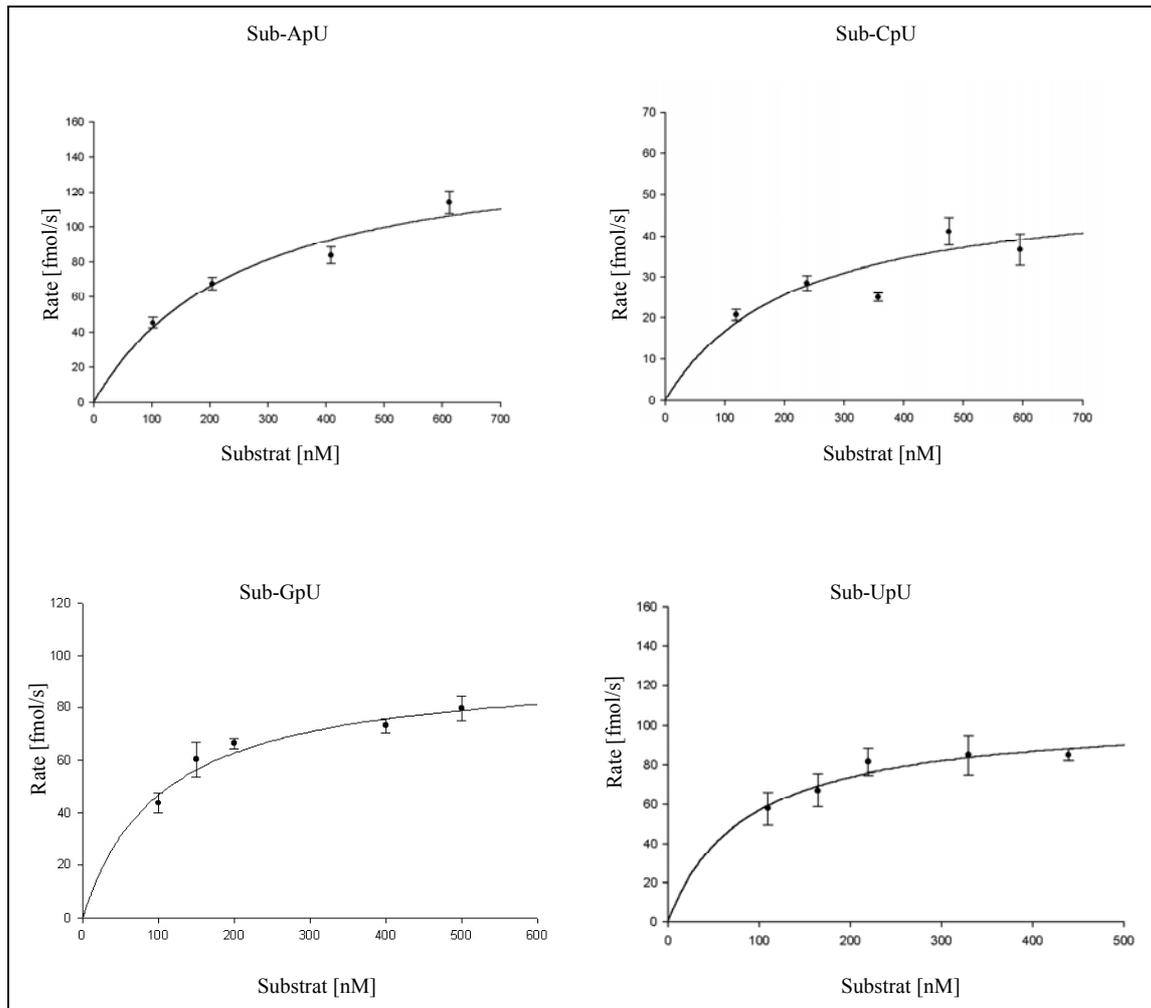


Abb. 10: „Michaelis-Menten-Diagramm“ aller vier Substrate

Variable RNA-Mengen der Substrate *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* bzw. *Sub-UpU* wurden mit 10 ng E^{ms} inkubiert, und die Spaltproduktbildung pro Sekunde nach 10 bzw. 15 s, 20 bzw. 25 s, 30 s und für *Sub-CpU* auch nach 60 s ermittelt. Anschließend wurden die erhaltenen Werte aus jeweils mindestens drei Versuchsansätzen im abgebildeten „Michaelis-Menten-Diagramm“ zusammengefasst dargestellt. Gezeigt ist die Produktbildung (Rate in fmol/s) pro Substratkonzentration (Substrat in nM).

Anhand der Michaelis-Menten-Diagramme ist die Sättigungskinetik erkennbar. Ab einer bestimmten Substratkonzentration kann durch weitere Substraterhöhung keine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit erzielt werden.

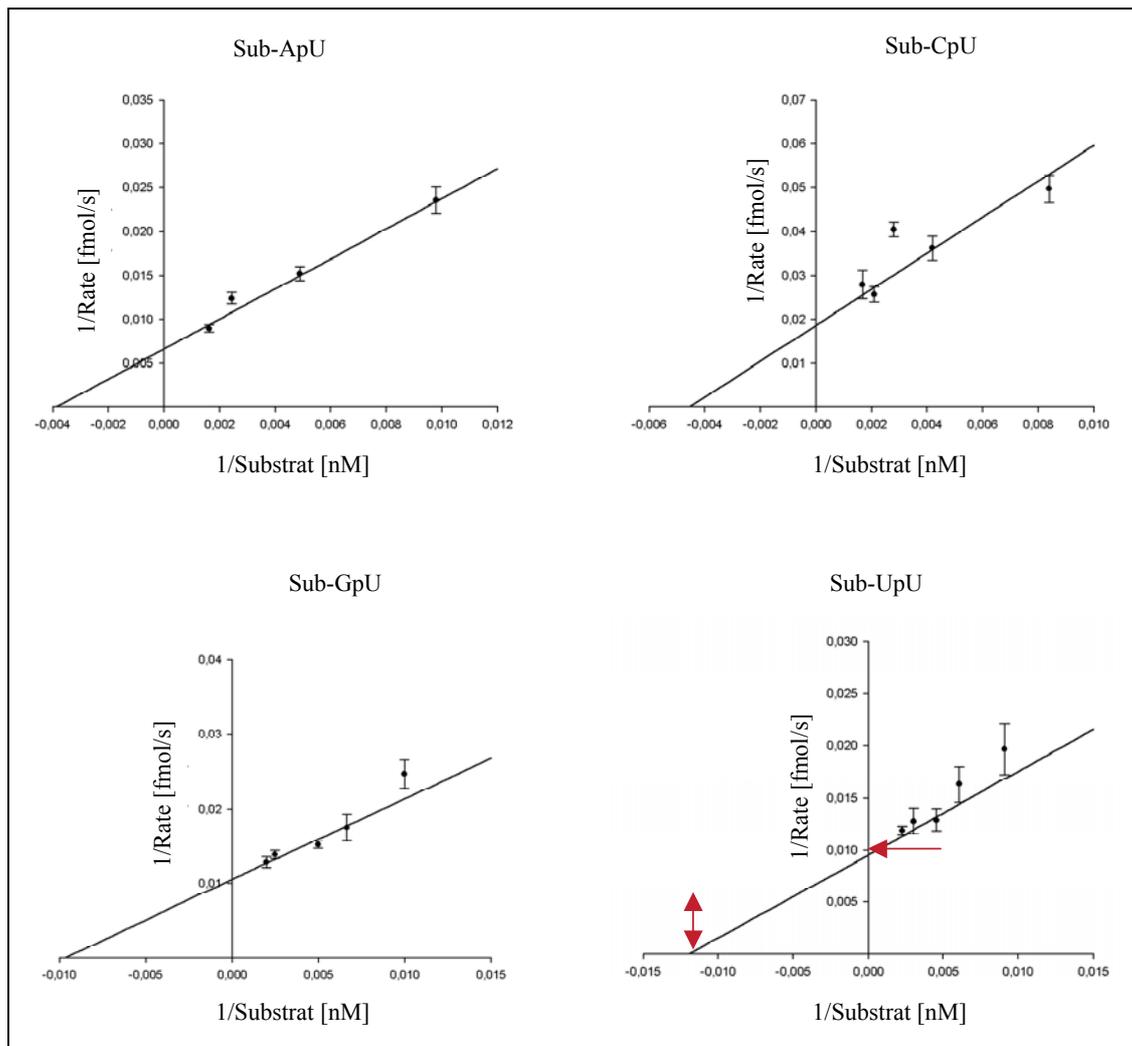


Abb. 11: Lineweaver-Burk-Analyse der vier Substrate (Signablot der Firma SPSS-Science)

In diesem Diagramm wurde die Rate der Spaltprodukte, die nach Inkubation der vier Substrate (*Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*) mit 10 ng E^{ms} entstanden sind, bezogen auf die jeweilige Substratkonzentration reziprok aufgetragen. Für jede Substratkonzentration flossen verschiedene Zeitwerte (10-30 s bzw. 15-60 s für *Sub-CpU*), die in mindestens drei Versuchsreihen ermittelt worden sind, in die Darstellung ein. Sowohl die Michaelis-Menten-Konstante K_m als auch die Maximalgeschwindigkeit v_{max} können –nachdem die Punkte verbunden wurden– über die Schnittpunkte der Geraden mit den Achsen ermittelt werden. Der Schnittpunkt mit der x-Achse ist $-1/K_m$ (β) und der Schnittpunkt mit der f(x)-Achse ist $1/V_{max}$ (\leftarrow).

In der Lineweaver-Burk-Darstellung wird ebenfalls die Produktbildung (= Spaltfragmente), die nach verschieden langer Inkubation vorliegt, zur eingesetzten Substratkonzentration aufgetragen. Im Unterschied zur Michaelis-Menten-Kinetik erfolgt die Auftragung der Werte reziprok. Aufgetragen sind erneut die Produktmengen, die, bei variabler Substratmenge und gleichbleibender Enzymkonzentration, anhand der Substratabnahme ermittelt worden sind. Nach Verbinden der Werte entsteht eine Gerade, die beide Achsen schneidet. Der Abschnitt der Geraden mit der f(x)-Achse ergibt $1/V_{max}$, und der Abschnitt mit der x-Achse ist $-1/K_m$. Auf diese Weise sind die K_m - und die V_{max} -Werte für jedes Substrat bestimmt worden (Tab. 3).

	Sub-ApU	Sub-CpU	Sub-GpU	Sub-UpU
V_{max} (fmol/s)	151,2	53,7	95,2	104,8
K_m (10⁻⁹ M)	258,7	220,1	103,3	83,8

Tab. 3: Werte der Enzymkinetiken für die vier NpU Substrate

Während die Michaelis-Menten-Konstante K_m die Affinität des Enzyms zum Substrat reflektiert, gibt V_{max} die maximale Reaktionsgeschwindigkeit an. Beide Werte sind mit Hilfe der Lineweaver-Burk-Darstellung (Abb. 11) ermittelt worden.

Insgesamt sind die K_m -Werte von E^{ms} für die verschiedenen Substrate im Vergleich zu anderen Ribonukleasen (Aktivität auf Basis von Dinukleotiden ermittelt) sehr niedrig.

Eine weitere Größe, um Enzymaktivitäten zu charakterisieren, ist die Wechselzahl. Sie ermöglicht eine allgemeine Aussage über die Leistungsfähigkeit des Enzyms bei einem definierten Substrat, indem sie die Anzahl von Substratmolekülen angibt, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms pro Zeiteinheit gespalten werden. Sie wird über V_{max} berechnet, indem V_{max} durch die im Test verwendete Enzymmenge dividiert wird (Tab. 4).

	Sub-ApU	Sub-CpU	Sub-GpU	Sub-UpU
Wechselzahl (s⁻¹)	1,33	0,47	0,84	0,9

Tab. 4: Wechselzahl der NpU Substrate

Die Wechselzahl wird ermittelt, indem die Maximalgeschwindigkeit V_{max} , die für jedes RNA-Substrat mittels Lineweaver-Burk-Analyse bestimmt wurde, durch die im Test verwendete Enzymmenge (10 ng E^{ms}) dividiert wird. Angegeben sind die Wechselzahlen für die RNA-Substrate *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*.

Alle Wechselzahlen liegen im gleichen Bereich (ca. 1 s^{-1}). Sie sind im Vergleich mit den Wechselzahlen anderer Enzyme niedrig. Beispielsweise ist für RNase Rh die Wechselzahl für das Dinukleotid ApU mit $135,5 \text{ s}^{-1}$ um den Faktor 100 höher (Ohgi et al., 1992).

B) strukturell/funktionelle Charakterisierung der Ribonuklease E^{rns}

3.2 Mutagenesestudien der RNase E^{rns}

3.2.1 Mutagenesestudien des aktiven Zentrums in Anlehnung an RNase Rh

Umfangreiche biochemische und molekularbiologische Untersuchungen haben bei der als Prototyp der Ribonuklease-Familie T2 geltenden RNase Rh zur Identifizierung der enzymatisch aktiven Aminosäuren Histidin 46, 104 und 109 sowie Lysin 108 und Glutaminsäure 105 geführt (*Katawa et al.*, 1990; *Irie et al.*, 1994; *Kurihara et al.*, 1996; *Oghi et al.*, 1993 und 1995). Innerhalb der 130 N-terminalen Aminosäuren von RNase Rh und der 110 N-terminalen Aminosäuren von RNase E^{rns} sind diese enzymatisch aktiven Aminosäuren nahezu vollständig konserviert (Abb. 12).

<i>RNase Rh</i>	20	30	40	50
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>ANSDTCCSPEYGLVVLNMQWAPGYGPDNAFTLHGLWDPK-</i> <i>ENITQWNLSDNGTNGIQRAM-YLRGVNRS<u>LHGIWPEKI</u></i> .. : : : : : : : </p>			
<i>RNase Rh</i>	60	70	80	90
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>CSGAYAPSGGCDNRASSSIASVIKSKDSSLYNSMLTYWP</i> <i>CKGVP-----THLATDTELKEIR--GMMDASER</i> : : . :. . :. :. : </p>			
<i>RNase Rh</i>	100	110	120	130
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>SNQGNNNV<u>FWSHEWSKHGTCVSTYDPDCYDNYEEGEDIVD</u></i> <i>TN-YTCCRL<u>QRHEW</u>NKHGWC-----NWYNIDP</i> .. : : : : : : : : </p>			
<i>RNase Rh</i>	140	150	160	170
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>YFQKAMDRLRSQYNVYKAFSSNGITPGGTYTATEMQSAIES</i> <i>WIQLMNRTQTNLTEGPPDKE----CAVTCRYDK-NTDVNV</i> : . : . . </p>			
<i>RNase Rh</i>	180	190	200	
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>YFG----AKAKIDCSSGTLSDVALYFYVRG----RDTYVI</i> <i>VTQARNRPTTLTGCKKGKNFSFAGTVIEGPCNFNVSVLLE</i> . : : : </p>			
<i>RNase Rh</i>	210	220		
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p> <i>TDALSTGSCSGDVEYPTK</i> <i>DILYGDHECGSQDTALYLLDGMTNTIENARQGAARVTSWL</i> : . </p>			
<i>RNase E^{rhns}</i>	<p><i>GRQLSTAGKKLERRSKTWFGAYA</i></p>			

Abb. 12: Sequenzvergleich der Aminosäuren von RNase Rh und E^{rhns}

Innerhalb des Sequenzvergleichs besteht nur im Bereich der katalytischen Domäne eine signifikante Homologie (unterstrichene Aminosäuren); über die gesamte Peptidlänge liegt die Homologie bei <20 %. Identische Aminosäuren sind mit einem Doppelpunkt markiert, ähnliche durch einen einfachen Punkt hervorgehoben. Die Nummerierung richtet sich nach den Aminosäurepositionen in RNase Rh.

Die zuvor beschriebene Entwicklung eines quantifizierbaren RNase-Assays (Degradationstest) bildete die Grundlage für Mutationsanalysen des E^{rhns}, die an die Untersuchungen von RNase Rh angelehnt wurden. Zu Beginn der Arbeit lagen bereits eine Reihe von Mutanten des E^{rhns} (14) in rekombinanten Bakuloviren vor, die jedoch aufgrund eines unzulänglichen Testsystems nur vorläufig charakterisiert werden konnten (Vidovic, 1997). Ziel sollte sein, mit Hilfe des sensitiven Degradationstests die Aktivitäten der mutierten E^{rhns}-Proteine zu bestimmen (Tab. 5).

Funktion der Aminosäuren	RNase Rh Mutanten	RNase E ^{rns} Mutanten
Katalyse	His ₄₆ Phe His ₁₀₉ Phe	His ₃₀ Asp His ₇₉ Asp
Stabilisierung oder Aktivierung	Lys ₁₀₈ Phe Glu ₁₀₅ Gly His ₁₀₄ Phe	Lys ₇₈ Thr Glu ₇₅ Gly His ₇₄ Phe
Substratbindung	Asp ₅₁ Glu Asp ₅₁ Asn	Glu ₃₅ Asp Glu ₃₅ Arg
Katalytisches Zentrum	Trp ₄₉ Ile	Trp ₃₃ Val Trp ₈₁ Gly Lys ₃₆ Gly
Struktur		Cys ₈₂ Ser Cys ₃₈ Ser Asp ₄₈ Gly Met ₅₈ Gly

Tab. 5: Übersicht über Aminosäuresubstitutionen des E^{rns}

E^{rns} wurde in den Bakulovirus Rekombinationsvektor pV1 1392 (BD PharmMingen[®]) kloniert und dort die oben aufgeführten Substitutionen durch „*QuikChange*“ Mutagenese eingeführt (Vidovic, 1997). Die aufgelisteten Mutanten sind entsprechend der bei RNase Rh definierten Kategorien geordnet. Für die zuletzt aufgelisteten sechs E^{rns}-Mutanten sind noch keine Analoga bei RNase Rh beschrieben.

Von sieben der insgesamt vierzehn Mutanten war die ribonukleolytische Aktivität vorläufig quantitativ erfasst, die anderen sieben nicht untersucht. Die Herstellung und Reinigung der verschiedenen mutierten E^{rns}-Proteine aus Insektenzellen war unerwartet zeitaufwändig. 1-3x 10⁸ SF 21-Zellen wurden mit rekombinanten Baculoviren bei einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 0.01 infiziert und bis zur Ausbildung des zytopathischen Effekts (3-7 Tage p. i.) kultiviert, anschließend lysiert und E^{rns} mit immobilisiertem monoklonalen anti-E^{rns} Antikörper 24/16 immunaffinitäts-chromatographisch aufgereinigt. Um die Ergebnisse der verschiedenen E^{rns}-Mutanten im Degradationstest vergleichen zu können, war es notwendig, für jede Mutante gleiche Proteinmengen einzusetzen. Hierbei war problematisch, dass erhebliche Unterschiede in der E^{rns}-Expression bei den jeweiligen rekombinanten Baculoviren auftraten. Für einige Baculoviren musste daher die Reinigungsprozedur mehrfach wiederholt werden, um die gewünschten Mengen (50–100 µg) an E^{rns} zu erhalten. Nachdem die Proteinmenge mit Hilfe des BCA-Tests ermittelt worden war, wurde auch die Uniformität und Reinheit aller Eluate elektrophoretisch in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen überprüft. Hierzu erfolgte entweder die Färbung der aufgetrennten Proteine durch Coomassie Blau (Abb. 13) oder der E^{rns}-Nachweis durch Immunoblot (nicht gezeigt). Aus Abb. 13 ist ersichtlich, dass die zu analysierenden E^{rns}-Proteine in Bezug auf Qualität und Quantität einheitlich waren.

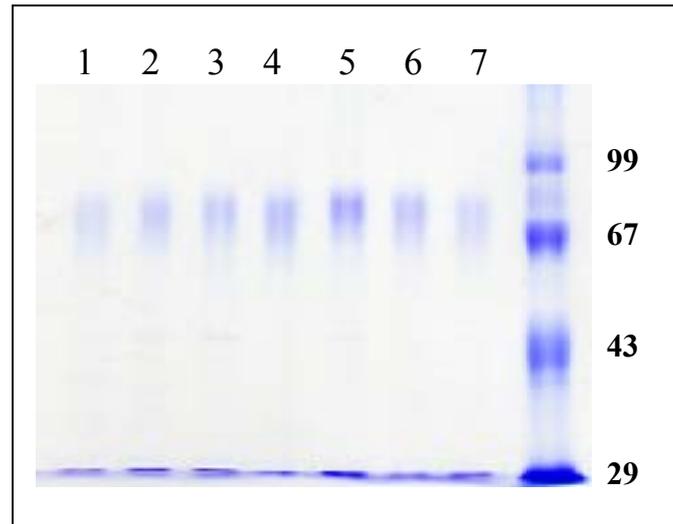


Abb. 13: Darstellung einiger E^{ms} -Mutanten durch SDS-PAGE

Um die Qualität und Quantität der Eluate zu überprüfen, wurden jeweils 0,6 μg E^{ms} -Mutantenprotein in einem PAA-Gel (10 %) unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetrennt und mit Coomassie Blau gefärbt. In der rechten Spur ist der Molekulargewichtsstandard in kDa angegeben.

1= $\text{Lys}_{78}\text{Thr}$; 2= $\text{His}_{74}\text{Phe}$; 3= $\text{Glu}_{75}\text{Gly}$; 4= $\text{Lys}_{36}\text{Gly}$; 5= $\text{Met}_{58}\text{Gly}$; 6= $\text{Trp}_{33}\text{Val}$; 7= E^{ms}

Die ribonukleolytische Aktivität aller E^{ms} -Mutanten wurde durch den Abbau von ^{32}P - α -[UTP] markierter RNA (*Sub-CpU*) bestimmt. Im Degradationstest erfolgte die Inkubation von 2×10^5 cpm Substrat und 4 μg tRNA mit jeweils 50 ng E^{ms} bei 37 °C. Nach Inkubationszeiten von 0 min; 2,5 min; 7,5 min und 15 min erfolgte das Abstoppen der Reaktion und die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze in einem 5 %igen denaturierenden PAA-Gel. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Spaltung zu den jeweiligen Zeitwerten durch „Phosphorimaging“ ermittelt, wobei die Aktivität des E^{ms} als angenommener Standard (100 %) diente (Abb. 14).

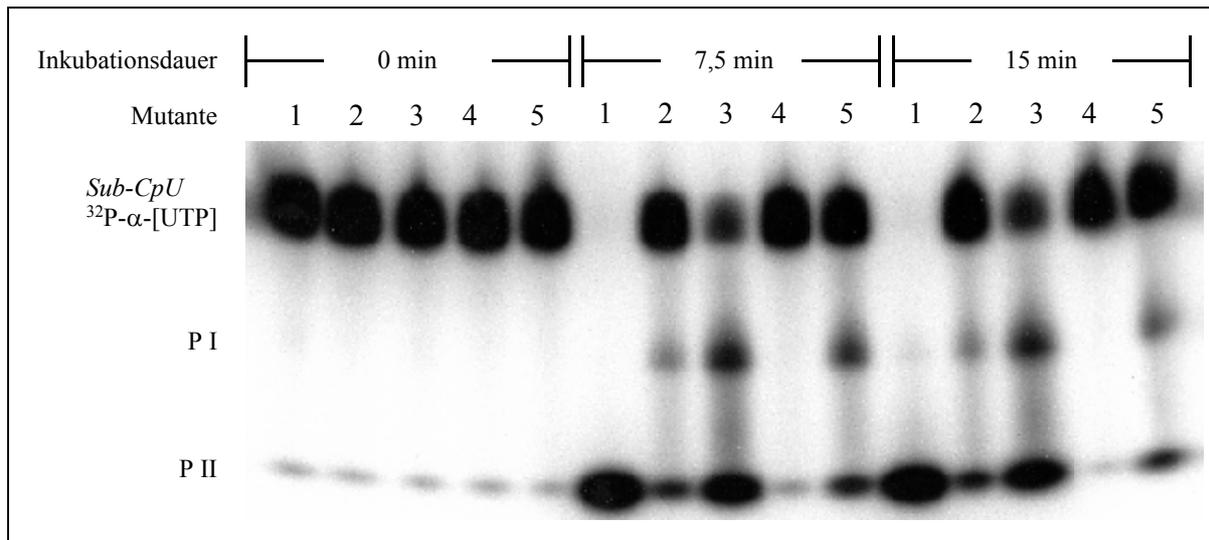


Abb. 14: Bestimmung der RNase-Aktivität

Zur Bestimmung der RNase-Aktivität der E^{ms} -Mutanten *Met₅₈Gly*, *Lys₃₆Gly*, *His₃₀Asp* und *Trp₈₁Gly* wurde der Anteil an Spaltprodukten zu den Zeitpunkten T= 0 min, T= 7,5 min und T= 15 min (in cpm gemessen) prozentual ermittelt. Hierzu erfolgte zunächst die Messung der Radioaktivität/RNA-Bande mittels „Phosphorimaging“. Die Radioaktivität der RNA-Substratbande zum Zeitpunkt T=0 wurde der eingesetzten RNA-Menge gleich gesetzt, so dass die ungespaltene RNA-Substratmenge zu den jeweiligen Zeitpunkten und die prozentuale Bildung der Spaltprodukte berechnet werden konnte. Die Aktivität des E^{ms} diene als Standard. 1= E^{ms} ; 2= *Met₅₈Gly*; 3= *Lys₃₆Gly*; 4= *His₃₀Asp*; 5= *Trp₈₁Gly*

In diesem Versuch ist das Substrat durch das wildtypische (wt) E^{ms} bereits nach 7,5 Minuten vollständig zu Oligoribonukleotiden abgebaut. Dagegen ist die ribonukleolytische Aktivität der Mutanten *Met₅₈Gly*, *Lys₃₆Gly* und *Trp₈₁Gly* deutlich reduziert, da zu allen Zeitpunkten sowohl ungespaltenes Substrat als auch das primäre Spaltprodukt (P I) sichtbar ist. Auch durch eine längere Inkubation (15 min) konnte kein weiterer Abbau des RNA-Substrates herbeigeführt werden.

Ein vollständiger Verlust der Enzymaktivität wurde erwartungsgemäß bei Substitutionen der Histidine des aktiven Zentrums von E^{ms} ermittelt (Abb. 15).

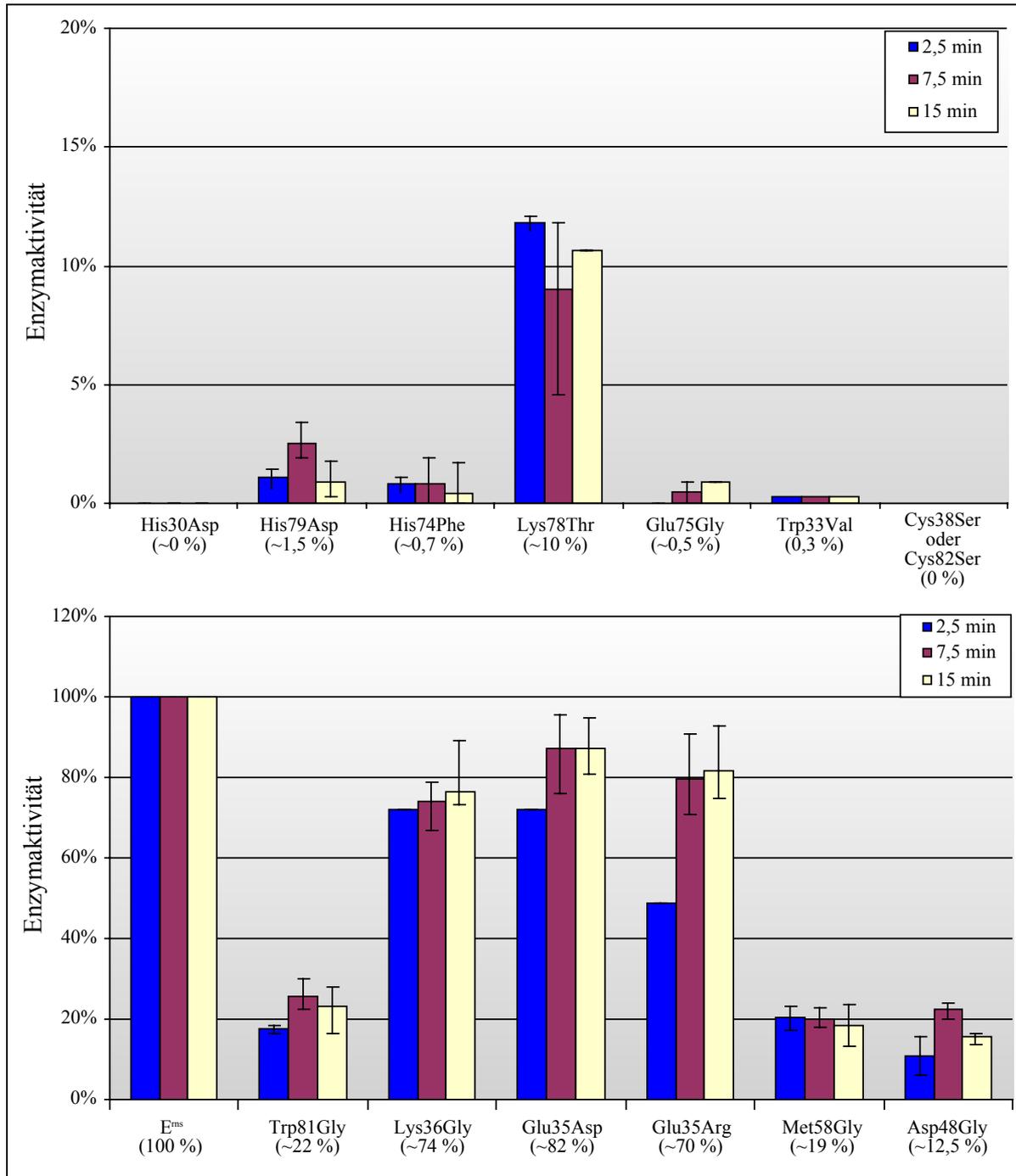


Abb. 15: Ribonukleaseaktivität von E^{rms} -Mutanten

Um die ribonukleolytische Aktivität nach 2,5; 7,5 und 15 minütiger Inkubation zu bestimmen, wurde der prozentuale Anteil der Spaltprodukte ermittelt. Da das Substrat nach Inkubation mit E^{rms} nach 2,5 Minuten abgebaut war, wurde die Enzymaktivität des E^{rms} als Standard mit 100 % angenommen, und die Aktivitäten aller Mutanten angeglichen. Es sind Mittelwerte aus drei Versuchsansätzen aufgeführt.

Während die E^{rms} -Mutante *His₃₀Asp* inaktiv ist, konnte für die Mutante *His₇₉Asp* eine höhere Aktivität (~1,5 %) als für *His₇₄Phe* (~0,7 %) festgestellt werden. Bei Mutation von Aminosäuren, die vermutlich an der Stabilisierung bzw. Aktivierung der RNA beteiligt sind, wies die E^{rms} -Mutante *Lys₇₈Thr* eine erheblich höhere Aktivität (~10 %) als die Mutante

Glu₇₅Gly (~0,5 %) auf. Interessanterweise war eine weitere Mutante (*Trp₃₃Val*) inaktiv. Diese Aminosäure ist in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert. Während die Mutation *Trp₈₁Gly* in einer geringen Aktivität von ca. 22 % resultierte, wies die Mutante *Lys₃₆Gly* noch ca. 74 % der Wildtypaktivität auf. Beide Aminosäuren können dem katalytischen Zentrum zugeordnet werden. Erwartungsgemäß zeigte *Glu₃₅Asp* eine höhere Aktivität als nach Änderung der Ladung. Ebenfalls noch aktiv waren die Mutanten *Asp₄₈Gly* (~12,5 %) und *Met₅₈Gly* (~19 %). Diese Aminosäuren liegen im Bereich zwischen den beiden Domänen des aktiven Zentrums, der zwischen RNase Rh und RNase E^{ms} keine erkennbare Homologie aufweist, weshalb der gemessene Aktivitätsverlust unerwartet hoch war. Mutation von zwei Cysteinen zu Serin (*Cys₈₂Ser* und *Cys₃₈Ser*) führte zur vollständigen Inaktivierung. Die Ribonuklease-Aktivitäten der E^{ms}-Mutanten korrelieren bis auf eine Ausnahme mit den Enzymaktivitäten analoger Rh-Mutanten (Abb. 16).

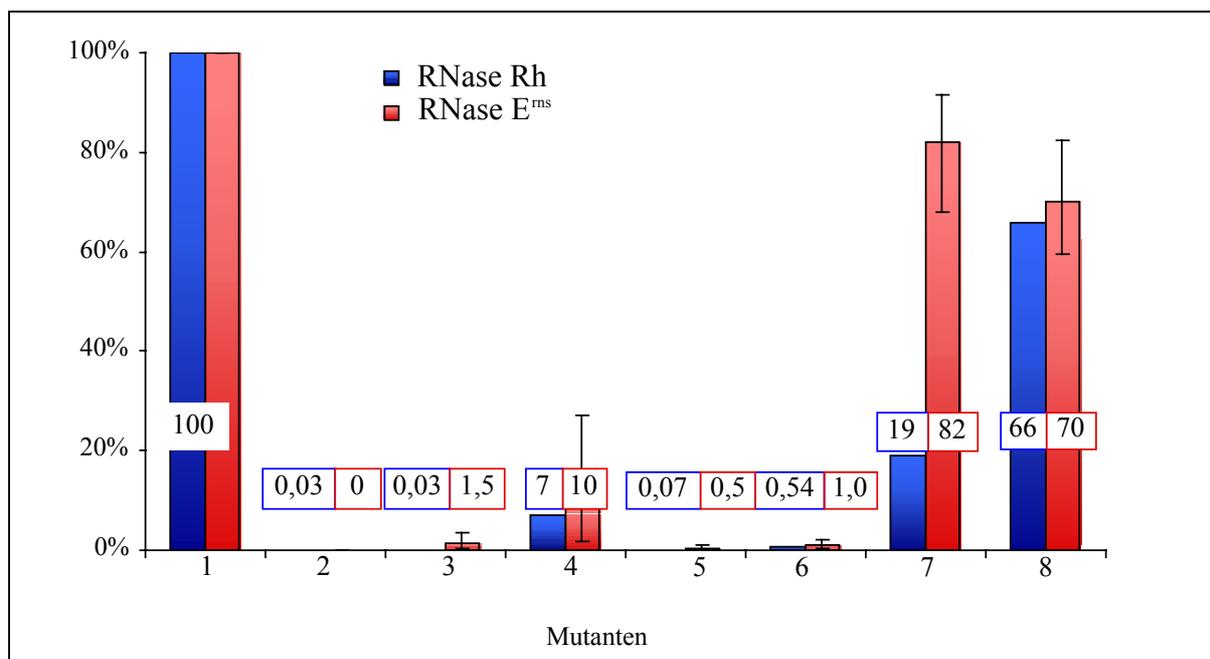


Abb. 16: Vergleich der Ribonukleaseaktivitäten von analogen Mutanten der RNase Rh (blaue Balken) und E^{ms} (rote Balken)

1= wildtyp; 2= RNase Rh: His₄₆Phe (RNase E^{ms}: His₃₀Asp); 3= His₁₀₉Phe (His₇₉Asp);

4= Lys₁₀₈Phe (Lys₇₈Thr); 5= Glu₁₀₅Gly (Glu₇₅Gly); 6= His₁₀₄Phe (His₇₄Phe);

7= Asp₅₁Glu (Glu₃₅Asp); 8= Asp₅₁Asn (Glu₃₅Arg)

3.2.2 Modell der Ribonuklease E^{rns}

Für die Funktionsanalyse eines Proteins ist es von unschätzbarem Vorteil, Kenntnisse von der dreidimensionalen Struktur der Peptidkette zu bekommen. Auf diese Weise lassen sich Wirkungsprinzipien wie Substraterkennung und Katalyse häufig anschaulich erklären, da das Arrangement der an der Katalyse direkt und indirekt beteiligten Aminosäuren erkennbar wird. 3-D Strukturen werden mit sehr großem Aufwand kristallographisch oder auch durch „*nucleare magnetic resonance*“ (NMR) ermittelt. Hierfür sind erhebliche Mengen sehr hoch aufgereinigten Proteins notwendig und nicht in jedem Fall gelingt die Ermittlung der Struktur in brauchbarer Auflösung. Häufig wird als attraktive Alternative ein Modell einer Peptidsequenz anhand einer bereits ermittelten Proteinstruktur entworfen. Voraussetzung ist eine erkennbare Homologie der Aminosäuresequenz, um mit Hilfe von geeigneten Computerprogrammen die Wahrscheinlichkeit für die Ausbildung von Tertiärstrukturen zu errechnen. Die Präzision der Modellierung ist direkt abhängig vom Grad der Verwandtschaft der Proteine. Folglich stellen Modelle, die aufgrund einer geringen Sequenzhomologie entworfen wurden, nur vage Hypothesen dar, die dennoch als Grundlage für weitere experimentelle Analysen von hohem Wert sein können.

Für die T2 Ribonuklease RNase Rh von *Rhizopus niveus* ist eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å verfügbar (Kurihara et al., 1996), die als Basis für ein Modell der RNase E^{rns} verwendet wurde.

Bezogen auf die gesamte Peptidkette ist die Homologie zwischen RNase Rh und E^{rns} äußerst gering (20 %). Vor allem die C-terminalen Hälften der Proteine haben keine erkennbare Übereinstimmung. Allerdings bestehen zwischen der Ribonuklease E^{rns} und der Ribonuklease Rh im Bereich des aktiven Zentrums kurze auffällige Sequenzhomologien, die als Ausgangspunkt für die Modellierung dienen konnten. Die direkte Umgebung der aktiven Histidinreste ist innerhalb der verschiedenen Vertreter der RNase T2 Familie sehr gut konserviert, was darauf schließen lässt, dass die dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums wahrscheinlich bei allen T2 RNasen identisch ist. In der Tat weisen alle bisher verfügbaren Kristallstrukturen von RNasen der T2 Familie eine nahezu identische Struktur des aktiven Zentrums auf (Kurihara et al., 1996, Suzuki et al., 2000, Tanaka et al., 2000, Matsuura et al., 2001, Ida et al., 2002). Im Sequenzvergleich konnten ferner die Positionen von vier konservierten Cysteinen im E^{rns} zugeordnet werden, die für die Ausbildung von zwei intramolekularen Disulfidbrücken verantwortlich sind (Abb. 17).

RNase E ^{rns}	-----ENITQWNLSDNGTNGIQRAMYLR-----GVNRS <u>SLHGI</u>
RNase Rh	-----ANSDTCCSPEYGLVVLNMQWAPGYG-----PDNAFT <u>TLHGL</u>
RNase T2	-----ADSCCFNSPGGALLQTQFWDTNPPSG-----PSDSWT <u>TIHGL</u>
RNase Le	-----AKDFDFFFVYVQQWPGSYC-DTKQSCCYPTTGKP--AADF <u>GIHGL</u>
RNase Mc	-----FDSFWFVQQWPPAVCSFQKSGSCPGSG-----LRTFT <u>TIHGL</u>
RNase S3	MVHVVMVFLLLIVLILCSSTVGVDYFQFTQQYQLAVCNSENRTLCKDPPDKLFTVHGL
RNase CL	-----EWSKLYLAHHWPVTVCCKDCQ-----DPPEYWT <u>TIHGL</u>
	*
RNase E ^{rns}	<u>WPEKI</u> -----CKGVPHTLATD-----TELKEIRGMMDASERTNY---TCCRL
RNase Rh	<u>WPKC</u> SGAYAPSGGCDNSNRASSIASVIKSKD-SSLYNSMLTYWPSNQG---NNNV <u>F</u>
RNase T2	<u>WPDN</u> CDGSYG--QFCDKSREYSNITAILQEQRTELLSYMKKYWPNYEG---DDEE <u>F</u>
RNase Le	<u>WPNND</u> GTYP--NCDPNSPYD-----QSQISDLISSMQQNWPTLACPSGSGST <u>F</u>
RNase Mc	<u>WPQGS</u> -GTSLT--NCPQGSFPD-----ITKISHLQSQLNLTLPNVLR--ANNQ <u>QF</u>
RNase S3	<u>WPSNM</u> VGPDP--KCPKIKNIRK-----REKLLEHQLEI IWPNVFDR-TKNNL <u>F</u>
RNase CL	<u>WPDKG</u> -----EECNRTWHFN-----VTEIKDLMSDMRRYWPDVIIHSSLNRTQ <u>F</u>
	:. . : * . ** *
RNase E ^{rns}	<u>QRHEW</u> NKHGWC-----NWNIDPWIQLMNRTQT-NLTEGPPDKE-----
RNase Rh	<u>WSHEW</u> SKHGTCVSTYDPDCYDNYEEGEDIVDYFQKAMDLSR--QYNVYKAFSSNGIT
RNase T2	<u>WEHEW</u> NKHGTCINTIEPSCYKDYSPQKEVDYLDLQKTVDLQK--GLDSYKALAKAGIV
RNase Le	<u>WSHEW</u> EKHGTC-----ESVLTNQHYFKKALDLKN--QIDLLSILQGADIH
RNase Mc	<u>WSHEW</u> TKHGTC-----ESTFNQAAYFKLAVDMRN--NYDII GALRPHAAG
RNase S3	<u>WDKEW</u> MKHGSCG-----YPTIDNENHYFETVIKMYISKQNVSRILSKAKIE
RNase CL	<u>WKHEW</u> EKHGTCAT-----LPILNSQKKYFSKTLELYQ--LVNLGFLKAGIK
	* :. . . . *
RNase E ^{rns}	CAV--TCRYDKNTDVNVVTQARNRPTTLTGCKKGKNFSFAGTVIEGPCNFVSVEDI
RNase Rh	PGG--TYTATEMQSAIESYFG---AKAKIDCSSGTLSDVALYFYVRG----RDYVI
RNase T2	PDSSKTYKRSEIESALAAIHD--GKKPYISCEDGALNEIWFYFNIKGNAITGEYQPI
RNase Le	PDG-ESYDLVNIRNAIKSAIG---YTPWIQCNVD-QSGNSQLYQVYICVDGSGSSLI
RNase Mc	PNG-RTKSRQAIKGFLLKAKFG---KFPGLRCRTDPQTKVSYLVQVAVACFAQDGSTLI
RNase S3	PDG-KKRALLDIENAIRNGADN--KKPKLKCQKK--GTTTELVEITLCSDKSGEHFI
RNase CL	PGSTTYQMAAIKEVLTEFYG---ITPKIQCLPPEEGEEAQTLCIEFSFTKELELR
	* : *
RNase E ^{rns}	LYGDH-----ECGSLLDQDTALYLLDGMTNTIENARQGAARVTSWLGRQLSTAGKK
RNase Rh	TDALTG-----SCSG-----DVEYPTK
RNase T2	DTLTSPG-----CSTS-----GIKYLPKKSEN
RNase Le	ECPIFPGGK----CGTS-----IEFPTF
RNase Mc	DCTRDT-----CGA-----NFIF
RNase S3	DCPHPFEPISPHYCPT-----NNIKY
RNase CL	TCTEPKEELSV--CNDTL---PVYYPSQVK
	:
RNase E ^{rns}	LERRSKTWFGAYA

Abb. 17: Sequenzvergleich einiger Mitglieder der T2 RNase Familie

Die Aminosäuren, die das aktive Zentrum bilden, sind unterstrichen. Konservierte Aminosäuren sind mit einem Doppelpunkt markiert; ähnliche Aminosäuren durch einen einfachen Punkt hervorgehoben. Aminosäuren, die jeweils nur in einer Sequenz nicht konserviert sind, sind mit einem Stern gekennzeichnet.

RNase E^{rns}: aus KSPV isoliert; **RNase Rh**: aus *Rhizopus niveus* (Pilz) isoliert; **RNase T2**: aus *Aspergillus oryzae* (Pilz) isoliert; **RNase Le**: aus *Lycopersicon esculentum* (Tomate) isoliert; **RNase Mc**: aus *Mormodica charantia* (Kürbis) isoliert; **RNase S3**: aus *Nicotiana glauca* (Pflanze) isoliert; **RNase CL**: „chicken liver“-aus der Hühnerleber isoliert

Aufgrund der Kristallstruktur der RNase Rh ist bekannt, welche Aminosäuren strukturelle Einheiten wie α -Helices, β -Faltblätter und Loops bilden. Da insbesondere die beiden

vorgenommen, was mit dem Computerprogramm WHAT IF[®] nicht möglich war. Aus diesem Grund musste der C-Terminus frei mit Hilfe eines weiteren Computerprogramms modelliert werden (Modeller von Andre Sali[®]). Dieses Programm ermöglicht ein sehr freies Modellieren, da man hier die strukturellen Einheiten und weitere Faktoren wie das Knüpfen von Disulfidbrücken festlegen kann. Somit ist das E^{ms}-Modell des C-Terminus sehr spekulativ. Eine Bewertung der C-terminalen Proteinstruktur ergab zwar, dass die Struktur theoretisch vorliegen könnte, aber dennoch insbesondere im Vergleich zum N-Terminus sehr vage ist. Aus diesem Grund kann eine funktionelle Kongruenz nahezu ausgeschlossen werden, zumal die katalytischen Aminosäuren der Protease ω in der E^{ms} Sequenz nicht enthalten sind. Das Zusammenfügen des RNase Rh-artigen N-Terminus und des Protease-artigen C-Terminus zu einer Chimäre sowie Verfeinerungen erfolgten erneut in dem Computerprogramm WHAT IF[®], bevor die Qualität des gesamten Modells durch das Anfertigen eines Ramachandran Blotes, durch Energieminimierungen und durch Molekulardynamikstimulationen bewertet wurde (Abb. 19).

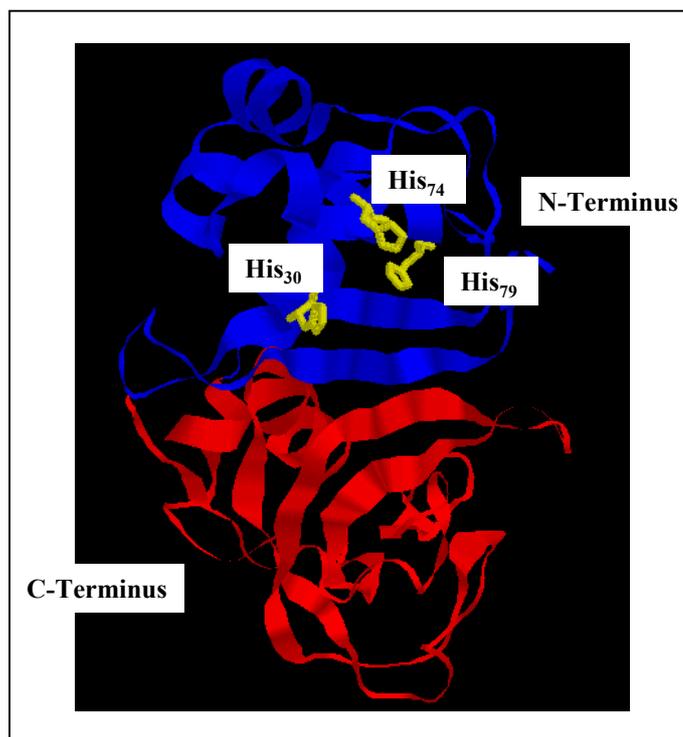


Abb. 19: chimäres Modell von E^{ms} („Rasmol“-Darstellung)

Die N-terminalen blau unterlegten 103 Aminosäuren sind auf Basis der RNase Rh und die C-terminalen 124 Aminosäuren- rot gefärbt- sind auf Basis der Protease ω entworfen worden. Die im N-terminalen Bereich lokalisierten katalytisch aktiven Histidine sind gelb dargestellt.

Zur besseren Vergleichsmöglichkeit sind in Abbildung 20 die Kristallstrukturen der RNase Rh und das Modell der RNase E^{rns} gegenübergestellt.



Abb. 20: Gegenüberstellung der Kristallstruktur von RNase Rh und des Modells von RNase E^{rns}

Sowohl in der Kristallstruktur der RNase Rh (in der gewählten Darstellung auf der linken Seite) als auch im Modell von E^{rns} (rechte Seite) sind β -Faltblätter gelb und α -Helices rot markiert. Auffällige Charakteristika beider Proteine sind das zentral gelegene antiparallele β -Faltblatt und die in dieser Darstellung im Hintergrund lokalisierte α -Helix, die den N-terminalen Bereich mit dem C-terminalen Bereich verbindet. Sie ist im Modell von E^{rns} unterbrochen. Der Aufbau des N-terminalen aktiven Zentrums ist in beiden Strukturen nahezu identisch; die katalytisch aktiven Histidine sind blau. Strukturelle Unterschiede zu RNase Rh sind vor allem im C-terminalen Bereich von E^{rns} vorhanden, da dieser Bereich auf einer anderen Proteinstruktur (Protease ω) basiert.

Während in RNase Rh 6 α -Helices und 7 β -Faltblätter vorhanden sind, enthält RNase E^{rns} 7 α -Helices ($\alpha 1$: 47-54 aa; $\alpha 2$: 58-62 aa; $\alpha 3$: 68-78 aa; $\alpha 4$: 93-103 aa; $\alpha 5$: 108-112 aa; $\alpha 6$: 121-130 aa; $\alpha 7$: 214-216 aa) und ebenfalls 7 β -Faltblätter ($\beta 1$: 11-17 aa; $\beta 2$: 28-34 aa; $\beta 3$: 133-137 aa; $\beta 4$: 159-163 aa; $\beta 5$: 165-168 aa; $\beta 6$: 177-182 aa; $\beta 7$: 197-200 aa). Dominant in beiden Proteinen (Kristallstruktur der RNase Rh und Modell von E^{rns}) ist das zentral gelegene antiparallele β -Faltblatt ($\beta 1$; $\beta 2$; $\beta 5$ und $\beta 6$ von E^{rns}) und die lange α -Helix (in der gewählten Darstellung im Hintergrund), welche die N-terminale Hälfte mit der C-terminalen Hälfte verbindet. Die lange α -Helix ist im Modell der Ribonuklease E^{rns} unterbrochen ($\alpha 4$ und $\alpha 5$). Das Modell gestattet E^{rns} im N-terminalen Bereich trotz der geringen Sequenzhomologie eine zur RNase Rh nahezu identische Faltung einzunehmen. Insbesondere kann die Position der jeweils katalytisch aktiven Histidine (in Abbildung 19 und 20 blau dargestellt) in beiden Strukturen übereinandergelegt werden. Die Struktur der C-terminalen 124 Aminosäuren

unterscheidet sich natürlich von der Struktur der RNase Rh, da diese Aminosäuren anhand der Kristallstruktur der Protease ω modelliert worden sind.

Das Vorkommen von vier Disulfidbrücken innerhalb des Modells von E^{ms} entspricht der für Ribonukleasen der T2 Familie beschriebenen Anzahl (*Übersichtsartikel Irie, 2001*). Innerhalb des Modells der Ribonuklease E^{ms} werden Disulfidbrücken zwischen Cys38-Cys82, Cys68-Cys69, Cys110-Cys114 und Cys138-Cys155 gebildet.

3.2.3 Experimentelle Bestimmung der minimalen Ribonukleasedomäne

Das vorgestellte Modell von E^{ms} basiert auf der Annahme, dass die N-terminale Hälfte der Peptidkette, welche die enzymatische Aktivität enthält, eine eigenständige Domäne bilden kann. Durch die Auswirkung einer fortschreitenden C-terminalen Verkürzung des E^{ms} sollte untersucht werden, ob tatsächlich eine isolierte, ribonukleolytisch aktive N-terminale Domäne existiert.

Da für diese Untersuchungen zunächst die RNase-Aktivität qualitativ erfasst werden sollte, wurden die E^{ms} -Deletionsmutanten in einem Plasmid erzeugt, das die transiente Expression in Säugerzellen erlaubte. Von großem Vorteil war, dass auf die aufwendige Erzeugung von rekombinanten Bakuloviren verzichtet werden konnte. Das Plasmid enthält zwei Promotoren, zum einen den hEF Promotor (humaner Elongationsfaktor) und einen prokaryonten T7 Promotor. Eine Besonderheit bei der Konstruktion der Expressionsplasmide war die Verwendung der IgG κ -Signalsequenz anstelle der authentischen Signalsequenz des E^{ms} . Hierdurch wird eine effektive Translokation ins Endoplasmatische Retikulum (ER) gewährleistet. Zusätzlich wurde der N-Terminus des E^{ms} mit einer Oktapeptidsequenz (DYKDDDDK, sog. FLAG-Tag) versehen, die als Epitop von kommerziell erhältlichen Antikörpern (mAk M2) erkannt wird (Abb. 21). Der FLAG-Tag wurde N-terminal eingefügt, um in jedem Fall das C-terminal verkürzte E^{ms} -Protein identifizieren zu können. Aus Vorversuchen war bekannt, dass der üblicherweise eingesetzte monoklonale Antikörper gegen das E^{ms} (mAk 24/16) im C-terminalen Bereich des Proteins bindet. Nach C-terminaler Verkürzung wäre eine Expressionskontrolle der E^{ms} -Deletionsmutanten mit Hilfe des mAk 24/16 nicht möglich.

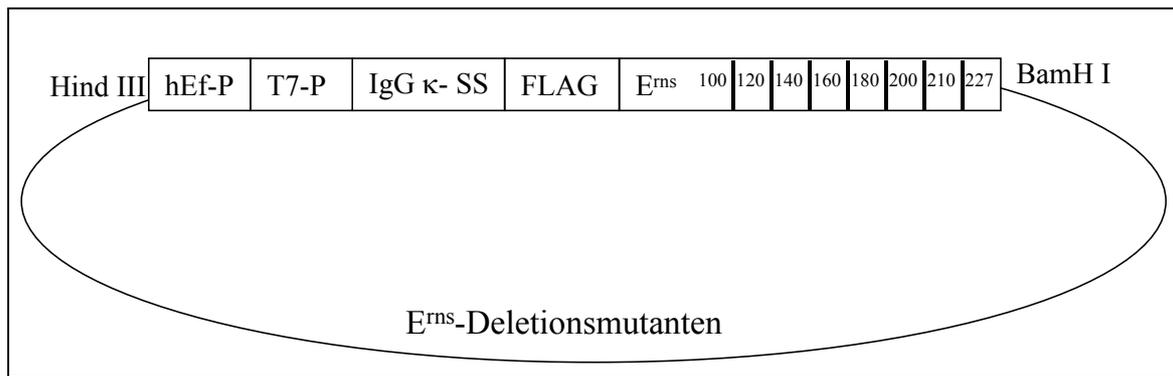


Abb. 21: schematische Darstellung der E^{rns}-Deletionsmutanten

Auf Basis des p494 wurden C-terminale Verkürzungen des E^{rns} vorgenommen, die anschließend in den Plasmidvektor p385 kloniert wurden. „Downstream“ der Promotersequenzen für den humanen Elongationsfaktor (hEF-P) und die T7 RNA-Polymerase (T7-P) ist die IgG κ-Signalsequenz (IgG κ-SS) für die Translokation in das Endoplasmatische Retikulum, das FLAG-Peptid (Expressionskontrolle) und das jeweils verkürzte E^{rns} lokalisiert. Die Zahl im E^{rns} gibt die N-terminal vorhandene Anzahl an Aminosäuren wieder.

Zunächst wurde die für E^{rns} kodierende Sequenz (227 Kodons) im p494, in welchem das authentische Schweinepest E^{rns} in einem Plasmidvektor (p385) vorliegt, durch eine PCR Mutagenese jeweils um zehn bis zwanzig Kodons am C-Terminus verkürzt. Während ein Oligonukleotid als Plusstrangprimer an einen Sequenzabschnitt 5' von der hEF-Promoterregion bindet, ist das zweite Oligonukleotid als Minusstrangprimer zu einem C-terminalen E^{rns}-Sequenzabschnitt komplementär, so dass insgesamt sieben Verkürzungen vorgenommen wurden. Zur einfachen Klonierung in den Plasmidvektor p385 enthielt das 5'-Ende des Plusstrangprimers die Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Hind III (AAGCTT) und das 5'-Ende der sieben Minusstrangprimer die Sequenz für BamH I (GGATCC). Die erzeugten E^{rns}-Deletionsmutanten (E^{rns} 210, E^{rns} 200, E^{rns} 180, E^{rns} 160, E^{rns} 140, E^{rns} 120 und E^{rns} 100) unterschieden sich jeweils um 10 bzw. 20 Aminosäuren, wobei die Zahl der E^{rns}-Deletionsmutante die Anzahl an N-terminal enthaltenen Aminosäuren angibt. In allen sieben E^{rns}-Deletionsmutanten sind die Aminosäuren, die am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt sind, enthalten.

Für die transiente Expression in BHK 21-Zellen wurde jeweils 1 µg DNA der Konstrukte mit Hilfe eines kationischen Transfektionsreagenzes (Superfect) in 2x 10⁵ BHK 21-Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf die Expression der gewünschten Genprodukte durch immunhistochemischen Nachweis mit dem mAk 24/16 und dem mAk M2 überprüft. Während der mAk 24/16 nur den Expressionsnachweis der Konstrukte E^{rns} 210, 200, 180 und 160 erlaubte, ergab der mAk M2 nach Transfektion aller 7 Konstrukte ein positives Signal. Die exprimierten E^{rns}-Moleküle wurden auch durch Immunoblot-Analyse unter Verwendung des mAk 24/16 bzw. des mAk M2 untersucht. Dazu

erfolgte erneut die Transfektion der Expressionsplasmide in BHK 21-Zellen. Die BHK 21-Zellen wurden 72 h nach Transfektion lysiert (Abb. 22).

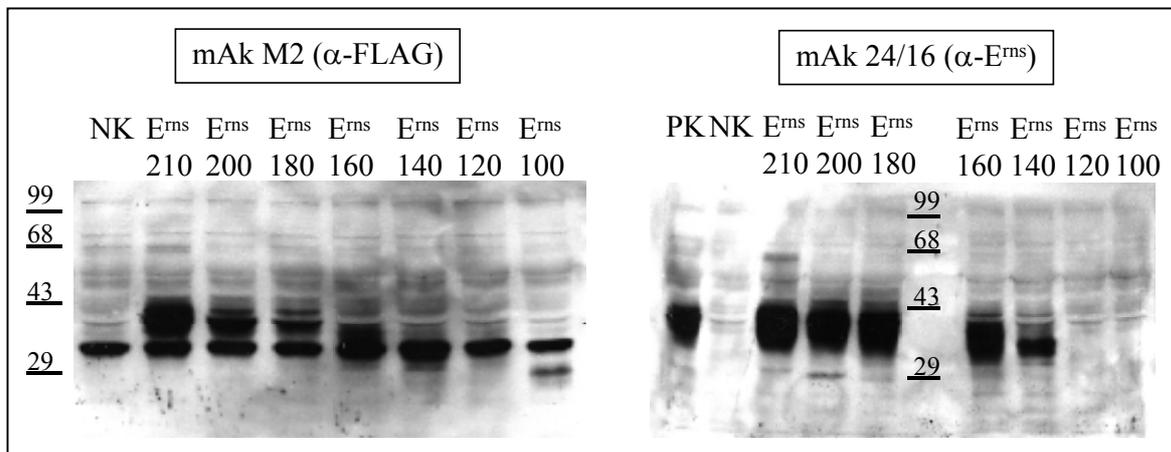


Abb. 22: Immunoblot-Analyse der E^{ms} -Deletionsmutanten zum Nachweis der Proteinexpression im Lysat von transfizierten BHK 21-Zellen

15 μl Lysat der E^{ms} -Deletionsmutanten sowie der Kontrollen von transfizierten BHK 21-Zellen wurden in einem SDS-PAGE (10 % Laemmliigel, 5 % β -Mercaptoethanol) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Immunoblot mit dem mAk 24/16 (α - E^{ms}) bzw. dem mAk M2 (α -FLAG) erfasst. Das Epitop des mAk 24/16 ist C-terminal lokalisiert (<aa 140).

NK= Lysat von nicht transfizierten BHK 21-Zellen als Negativkontrolle; PK= wildtyp E^{ms} als Positivkontrolle

In der Immunoblot-Analyse erkennt der mAk 24/16 E^{ms} -Deletionsmutanten, die um bis zu 87 C-terminale Aminosäuren verkürzt sind. Der mAk M2 erkennt auch noch die Deletionsmutante, die um 127 C-terminale Aminosäuren verkürzt ist (E^{ms} 100). Die Abnahme des apparenten Molekulargewichtes verläuft ab E^{ms} 160 nicht mehr linear, da neben der Verkürzung der Peptidkette auch N-Glykosylierungsstellen wegfallen. So ist in der Deletionsmutante E^{ms} 160 eine N-Glykosylierungsstelle am C-Terminus lokalisiert (aa 158) und wird somit wahrscheinlich nicht mehr glykosyliert. In der Aminosäuresequenz der Deletionsmutante E^{ms} 140 sind nur sieben der neun N-Glykosylierungsstellen kodiert, weshalb diese Mutante ein nochmals verringertes Molekulargewicht aufweist. Eine starke Hintergrundbande wird in der Lokalisation der C-Deletionsmutante E^{ms} 120 durch den mAk M2 erkannt, so dass die Expression dieser Mutante nicht direkt in der Immunoblot-Analyse ersichtlich ist. Allerdings ist der mit dem mAk M2 durchgeführte immunhistochemische Nachweis in den mit dem E^{ms} 120 Konstrukt transfizierten Zellen positiv, so dass davon auszugehen war, dass die Expression des E^{ms} 120 erfolgte. In dem Konstrukt E^{ms} 100 werden wahrscheinlich zwei weitere N-Glykosylierungsstellen nicht mehr glykosyliert (aa 100, aa 95). Sowohl in der Immunoblot-Analyse als auch im immunhistochemischen Nachweis

wurde E^{ms} als Positivkontrolle verwendet, während nicht transfizierte Zellen als Negativkontrolle dienten.

Das durch Behandlung der Zellen mit 1% Triton X-100 bei 4 °C gewonnene und durch Zentrifugation von Unlöslichem befreite Lysat wurde ohne weitergehende Aufreinigung für den Degradationstest verwendet („RNase-Assay“). Die Bestimmung der E^{ms} Konzentrationen erfolgte zuvor im Immunoblot. Es wurden 15-20 µl Lysat mit [32 P] markiertem Substrat gemischt und für 7,5 bzw. 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die Inkubationsbedingungen konstant zu halten, wurden die Reaktionsbedingungen auf 40 mM Tris-Acetat, 0,5 mM EDTA, pH 6,0 angepasst. Die Reaktionsansätze wurden anschließend in einem denaturierenden PAA-Gel (8 %) aufgetrennt. Als Negativkontrolle erfolgte sowohl die Inkubation von Lysat einer inaktiven E^{ms} -Mutante als auch die Inkubation von Lysat nicht transfizierter BHK 21-Zellen mit 32 P- α -[UTP] markiertem *Sub-CpU*. Während Lysat von mit E^{ms} transfizierten BHK 21-Zellen zum Erhalt der Positivkontrolle diente, erfolgte zum Nachweis kontaminierender Ribonukleasen im Reaktionspuffer die Inkubation von 20 µl Reaktionspuffer mit Substrat (Abb. 23).

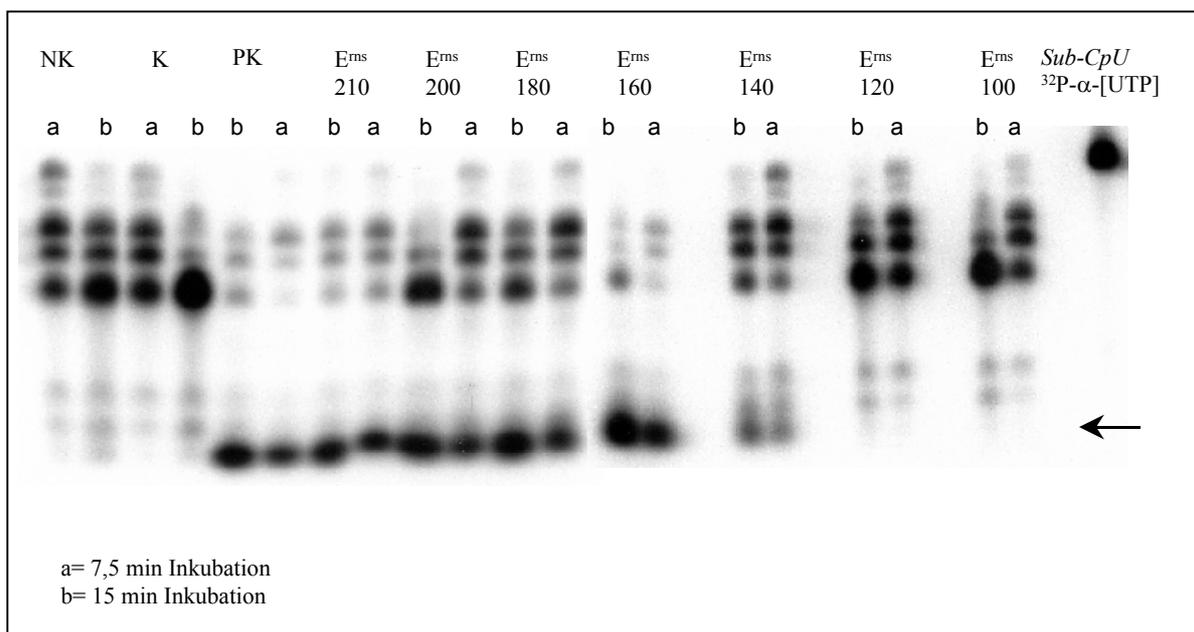


Abb. 23: Bestimmung der minimalen Ribonuklease

15 µl Lysat von mit E^{ms} -Deletionsmutanten bzw. der Kontrollen transfizierten BHK 21-Zellen wurde mit [32 P] markiertem *Sub-CpU* inkubiert. Nach 7,5 bzw. 15 minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auftrennung der Reaktionsansätze in einem denaturierenden PAA-Gel (8 %). Auf der Autoradiographie sind in allen Ansätzen Spaltprodukte unterschiedlicher Größe vorhanden. Aktive E^{ms} -Deletionsmutanten zeichnen sich durch das Vorkommen kleiner Spaltprodukte aus, da diese Fragmente zwar nach Inkubation mit E^{ms} (Positivkontrolle), aber nicht nach Inkubation mit den Negativkontrollen vorhanden sind (←).

NK= Negativkontrolle ($His_{30}\Delta$); **K**= Kontrolle (Lysat von BHK 21-Zellen); **PK**= Positivkontrolle (E^{ms})

Nach elektrophoretischer Auftrennung waren in jedem Zelllysate-Ansatz Spaltprodukte detektierbar. Auch bei den Negativkontrollen war innerhalb von 15 Minuten ein nahezu vollständiger Abbau von *Sub-CpU* zu beobachten, was auf die Anwesenheit zellulärer Ribonukleasen im Lysat zurückzuführen ist. Allerdings konnte anhand des unterschiedlichen Spaltungsmusters zwischen der Aktivität von E^{rms} und den endogenen RNasen unterschieden werden. Während nach Inkubation von BHK 21-Zelllysate bzw. von Lysate einer inaktiven E^{rms} -Mutante das Substrat in 3-4 größere Fragmente gespalten wurde, waren nach Inkubation mit E^{rms} -haltigem Zelllysate zusätzlich kleinere Spaltprodukte nachweisbar. Das Vorkommen dieser kleinen Spaltprodukte wurde als Indikator für die RNase-Aktivität der E^{rms} -Deletionsmutanten gewertet und erlaubte die Klassifizierung der Deletionsmutanten als „aktiv“ oder „inaktiv“. Die kürzeste Form des E^{rms} , die noch schwache RNase-Aktivität besitzt, war die Mutante E^{rms} 140. Bei E^{rms} 120 konnten keine Spaltprodukte mehr nachgewiesen werden. Eine quantitative Bewertung der Enzymaktivität erfolgte nicht, da die eingesetzte Enzymkonzentration der transient exprimierten E^{rms} -Deletionsmutanten lediglich anhand der Immunoblot-Analyse abgeschätzt wurde. Die Ergebnisse unterstützen die auf dem E^{rms} -Modell basierende Hypothese, nach der die N-terminale Hälfte des E^{rms} eine eigenständige Domäne bilden kann. Die für die Ausbildung eines aktiven Enzyms essentielle Peptidkette schließt Aminosäure 140 mit ein. Das bedeutet, dass fast 40 % der Peptidkette (87/227) nicht für die RNase-Aktivität notwendig sind.

3.3 Deletion von N-Glykosylierungsstellen

E^{rms} besitzt von allen pestiviralen Glykoproteinen die höchste Zahl an N-Glykosylierungsstellen. Das E^{rms} von KSPV enthält 9 potentielle Konsensussequenzen (Asn-X-Ser/Thr) und mindestens 50 % des apparenten Molekulargewichts (48 kDa, intrazelluläres Protein; 50-60 kDa, extrazellulär) werden durch N-glykosidisch gebundene Kohlehydrate gebildet. Im Unterschied zu E^{rms} sind die meisten Ribonukleasen der T2 RNase Familie nicht (RNase Rh von *Rhizopus niveus*) oder nur gering N-glykosyliert (S3-RNase von *Pyrus pyrifolia*).

Die Bedeutung der extensiven N-Glykosylierung für die biologischen Eigenschaften des E^{rms} ist unbekannt. Mit Hilfe des Degradationstests sollte hier untersucht werden, ob N-Glykosylierung Einfluss auf die Enzymaktivität von E^{rms} hat. Hinweise für eine wichtige Rolle der N-glykosidisch gebundenen Zuckerketten kamen von vorläufigen Experimenten, in

denen E^{rms} in prokaryonten Zellen (*E. coli*) exprimiert wurde, da in *E. coli* keine N-Glykosylierung erfolgt. Auf diese Weise erzeugtes E^{rms} zeigte keinerlei RNase-Aktivität. Da der „RNase-Assay“ die Bestimmung der Enzymaktivität im Zellysate nach transienter Expression von E^{rms} ermöglichte, bot er sich auch für die weitere Charakterisierung der E^{rms}-Enzymaktivität an. Zunächst sollte die Auswirkung von N-Glykosylierung auf die Enzymaktivität untersucht werden.

3.3.1 Einfluss von N-Glykosylierung auf die Ribonukleasefunktion

Bei allen Pestiviren ist E^{rms} stark glykosyliert, jedoch unterscheiden sich die Zahl und Positionen der Anheftungsstellen für die N-Glykane. Während im E^{rms} von KSPV Alfort neun N-Glykosylierungsstellen (NGS) aufzufinden sind, besitzt KSPV Brescia nur 7. Die meisten BVDV Stämme haben ebenfalls 7 N-Glykosylierungsstellen, BDV dagegen kodiert meist für 8 Asn-X-Ser/Thr Sequenzmotive. Ein Vergleich von 52 E^{rms}-Sequenzen verschiedener Pestiviren ergab, dass die Positionen von drei N-Glykosylierungsstellen (NGS 1, 3 und 5) bei allen Pestiviren erhalten sind. Darüberhinaus sind bei KSPV NGS 2, 6 und 8 zu 96,4 % (27/28) und NGS 9 zu 92,8 % (26/28) vorhanden. Dagegen kommen die NGS 4 (53 %) und NGS 7 (32 %) unregelmäßig vor. Bei BVDV sind neben den NGS 1, 3 und 5 als weitere N-Glykosylierungsstellen die NGS 4, 6 und 7 immer vertreten (18/18), während NGS 8 nur bei 16/18 BVDV Sequenzen vorkommt. Interessanterweise treten NGS 2 und 9 bei BVDV überhaupt nicht in Erscheinung (Abb. 24).

	10	20	30	40	50
KSPV Brescia	ENITQWNLS	DNGTNGIQHAMYLRGVS	SRSLHGIWPEKICKGVPTYLATDTE		
KSPV Alfort	ENITQWNLS	DNGTNGIQRAMYLRGVNRS	LHGIWPEKICKGVPTHLATDTE		
KSPV Iffa	ENITQWNLS	DNGTNGIQHAMYLRGVNRS	LHGIWPGKICKGVPTHLATDVE		
BVDV NADL	ENITQWNLQ	DNGTEGIQRAMFQRGVNRS	LHGIWPEKICTGVPSHLATDIE		
BVDV Oregon	ENITQWNLQ	DNGTEGIQRAMFKRGVNRS	LHGIWPEKICTGVPSHLATDVE		
BDV x-818	ENVTQWNLS	DNGTGTGIQLLMFQRGVNRS	LHGIWPEKICTGVPTHLATDAE		
	60	70	80	90	100
KSPV Brescia	LKEIQGMMDASEGT	NYTCCCKLQRHEWNKHGWCN	NWYNIDPWIQLMNRTQAN		
KSPV Alfort	LKEIRGMMDASERT	NYTCCRLQRHEWNKHGWCN	NWYNIDPWIQLMNRTQTN		
KSPV Iffa	LKEIQGMMDASEGT	NYTCCCKLQRHEWNKHGWCN	NWHYIDPWIQLMNRTQAD		
BVDV NADL	LKTIHGMMDASEKT	NYTCCRLQRHEWNKHGWCN	NWYNIEPWILVMNRTQAN		
BVDV Oregon	LKTIHGMMDASEKT	NYTCCRLQRHEWNKHGWCN	NWYNIEPWILIMNRTQAN		
BDV x-818	LKGIQGMMDASEKT	NYTCCRLQRHEWNKYGWCN	NWYNINPWIWLMNKTQAN		
	110	120	130	140	150
KSPV Brescia	LAEGPPAKECAVTCRYDKNADIN	VVTQARNRPTTLTGCKKGKNFS	FAGTV		
KSPV Alfort	LTEGPPDKECAVTCRYDKNTD	VNVVTQARNRPTTLTGCKKGKNFS	FAGTV		
KSPV Iffa	LAEGPPVKECAVTCRYDKDADIN	VVTQARNRPTTLTGCEKKGKNFS	FAGTV		
BVDV NADL	LTEGQPPRECAVTCRYDRASDLN	VVTQARDSPTPLTGCKKGKNFS	FAGIL		
BVDV Oregon	LTEGQPPRECAVTCRYDRSDLN	VVTQARDSPTQLTGCKKGKNFS	FAGIL		
BDV x-818	LTEGPPPEKECAVTCRFDKEADIN	IVTQARDRPTTLTGCKKGKKS	FAGMI		
	160	170	180	190	200
KSPV Brescia	IEGPCNFVNSVEDILYGDHECGS	LLQDTALYLVDGMTNTIENARQGAARV			
KSPV Alfort	IEGPCNFVNSVEDILYGDHECGS	LLQDTALYLVDGMTNTIENARQGAARV			
KSPV Iffa	IESPCNFVNSVEDTLYGDHERGS	LLQDAALYLVDGMTNTIENARQGAARV			
BVDV NADL	MRGPCNF EIAAS DVLFKEHERIS	MFQDTTLYLVDGLTNSLEGARQGTAKL			
BVDV Oregon	MRGPCNF EIAAS DVLYKEHDCT	GMFQDTAHYLVDGMTNSLESARQGTAKL			
BDV x-818	IEGPCNFVNSVEDILFGDNECSS	LFQDTALYVVDGVTNTVENARQGAAKL			
	210	220			
KSPV Brescia	TSWLGRQLSTAGKRLEGRS	KTWFGAYA			
KSPV Alfort	TSWLGRQLSTAGKKLERRS	KTWFGAYA			
KSPV Iffa	TSWLGRQLSTAGKRLEGRS	KTWFGAYA			
BVDV NADL	TTWL GKQLGIL GKKLENK	SKTWFGAYA			
BVDV Oregon	TTWL GKQLGRL GKKLENK	SKTWFGAYA			
BDV x-818	TSWL GKQLGIM GKKLEHKS	KTWFGANA			

Abb. 24: Sequenzvergleich der Aminosäuren von drei KSPV, zwei BVDV und ein BDV E^{ms}

In allen bisher sequenzierten Pestiviren sind konservierte N-Glykosylierungsstellen (NGS 1, 3 und 5) gelb hervorgehoben, während nicht konservierte durch grüne Boxen gekennzeichnet sind. Die sechste N-Glykosylierungsstelle ist ebenfalls als konserviert markiert, da sie nur bei einem KSPV Isolat nicht vorhanden ist.

Zur Deletion der N-Glykosylierungsstellen wurde jeweils das Asparagin der N-Glykosylierungsstelle (NxT oder NxS) mit Hilfe der „QuikChange“-Methode zu Glutamin mutiert. Glutamin ist lediglich um eine CH₂-Gruppe größer als Asparagin; es wird aber nicht als Substrat für die N-Glykosylierung verwendet. Ausgangsklon für die Anwendung der „QuikChange“-Methode war der schon vorhandene Klon p493, in welchem das authentische Schweinepest E^{ms} in einem Plasmidvektor (p385) vorliegt.

Zunächst wurde jeweils eine der 9 N-Glykosylierungsstelle im Klon p493 deletiert, und die Mutation von Asparagin nach Glutamin für jede mutierte N-Glykosylierungsstelle durch Sequenzierung überprüft. Da NGS 2 und 3 nur durch drei Aminosäuren getrennt sind, wurden diese N-Glykosylierungsstellen neben der Einfachdeletion auch zusammen deletiert (Tab. 6a).

<i>Klon</i>	<i>deletierte N-Glykosylierungsstelle (Δ NGS) Asn [AAC] \rightarrow Gln [CAA]</i>
pyh 1	Δ NGS 1
pyh 2	Δ NGS 2/3
pyh 3	Δ NGS 3
pyh 4	Δ NGS 2
pyh 5	Δ NGS 4
pyh 6	Δ NGS 5
pyh 7	Δ NGS 6
pyh 8	Δ NGS 7
pyh 9	Δ NGS 8
pyh 10	Δ NGS 9

Tab. 6a: Mutanten mit einer deletierten N-Glykosylierungsstelle

Zur Deletion der N-Glykosylierungsstellen wurde im p493, in dem das KSPV E^{ms} im Plasmidvektor p385 vorliegt, das entsprechende Asparagin zu Glutamin mutiert. Deletierte N-Glykosylierungsstellen (Δ NGS ...) sind aufgeführt.

Anschließend erfolgte die DNA-Transfektion der durch Sequenzierung bestätigten Klone in BHK 21-Zellen. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen in 1 % Triton X-100 Lösung lysiert. Die ribonukleolytische Aktivität der E^{ms}-Mutanten konnte erneut direkt im Lysat mittels „RNase-Assay“ bestimmt werden. Im Gegensatz zu den E^{ms}-Deletionsmutanten war es jedoch möglich, die Proteinmenge im Zelllysate durch einen Sandwich-ELISA unter Verwendung des mAk 24/16 als Fänger- und Detektionsantikörper zu bestimmen, weil das C-terminal lokalisierte Epitop bei allen E^{ms}-Mutanten exprimiert wird. Da im Sandwich-ELISA der mAk 24/16 sowohl als Fänger- als auch als Detektionsantikörper verwendet wird, muss E^{ms} zwei Epitope aufweisen, was nur über die Bildung von Dimeren möglich ist. Die Ausbildung von Dimeren wird durch die Deletion von N-Glykosylierungsstellen im Gegensatz zur C-terminalen Verkürzung nicht beeinflusst. Zur Bestimmung der Proteinmenge im ELISA wurde ein im Bakulovirussystem exprimiertes und aufgereinigtes wt E^{ms} definierter Konzentration als Referenzwert verwendet.

Um die Proteinbanden der unterschiedlich stark glykosylierten E^{ms}-Mutanten im Zelllysate vergleichen zu können, erfolgte eine Immunoblot-Analyse mit dem mAk 24/16. Um gleiche

Enzymkonzentrationen zu bekommen, wurde das Volumen an Zelllysats entsprechend der zuvor im Sandwich-ELISA bestimmten Proteinkonzentration eingestellt.

Zur Aktivitätsbestimmung wurden 1×10^5 cpm ^{32}P - α -[UTP] markiertes *Sub-GpU* für 30 bzw. 60 Minuten mit den E^{ms} -Mutanten bei 37 °C inkubiert und die Reaktionsansätze in denaturierenden PAA-Gelen (8 %) aufgetrennt. Die Verwendung definierter Proteinmengen (50 ng) erlaubte eine quantitative Aktivitätsbestimmung. Die unterschiedlich starke Expression der Mutanten wurde durch die Menge des eingesetzten Lysats ausgeglichen (15-20 μl). Um die Reaktionsbedingungen konstant zu halten, wurde jeweils die gleiche Menge an Reaktionspuffer zugegeben, so dass das Endvolumen variierte (Abb. 25). Als Negativkontrolle diente sowohl Zelllysats einer durch Deletion von Histidin 30 inaktiven E^{ms} -Mutante als auch Zelllysats von untransfizierten BHK 21-Zellen. Als Positivkontrolle erfolgte die Inkubation von E^{ms} haltigem Zelllysats (wildtyp= p493) mit der gleichen Substratmenge. Alle Messreihen wurden dreifach wiederholt.

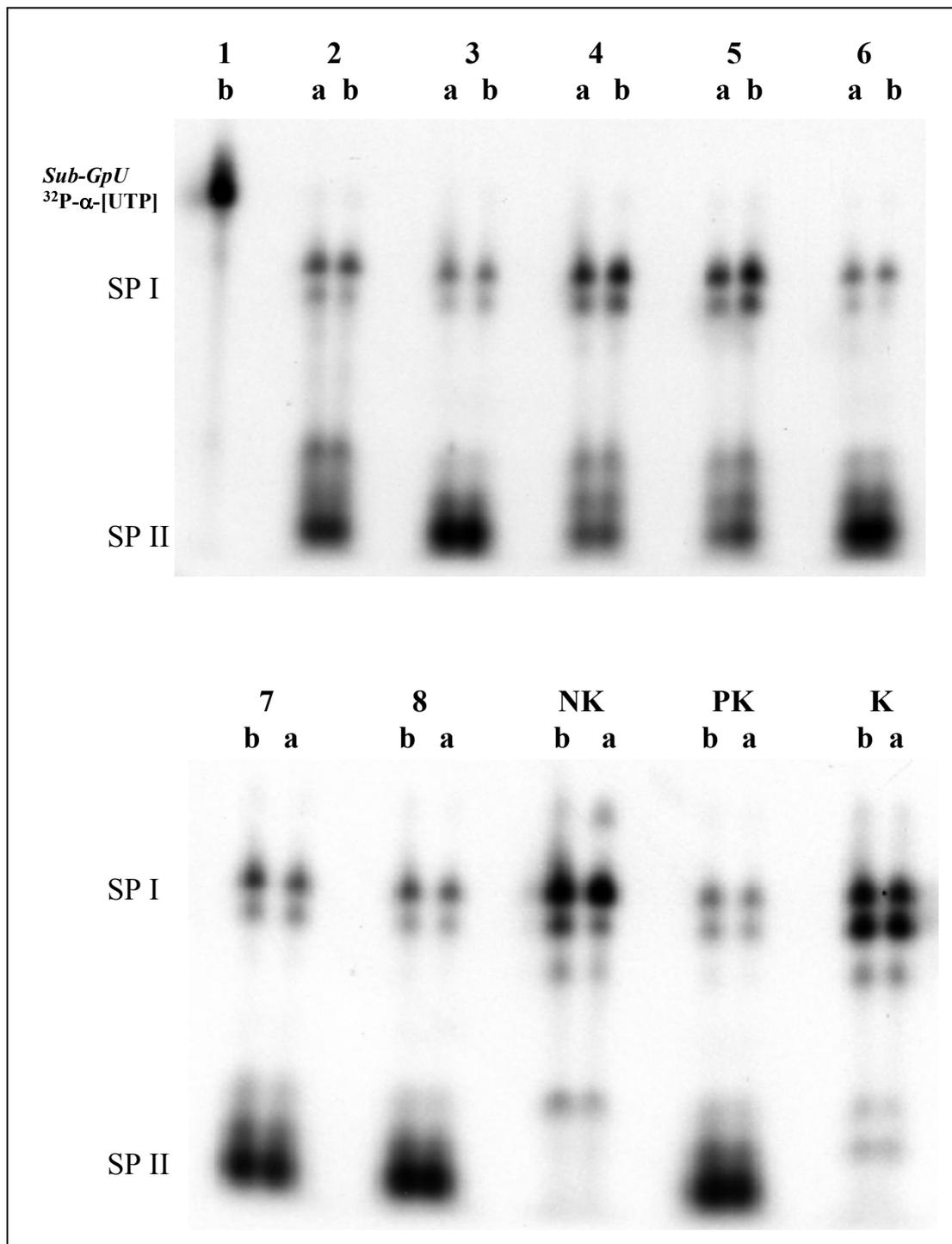


Abb. 25: RNase-Assay der E^{ms} -Mutanten (a= 30 min Inkubation, b= 60 min Inkubation)

Im RNase-Assay wurden 15-20 μ l Lysat der E^{ms} -Mutanten transfizierter BHK 21-Zellen mit 1×10^5 cpm *Sub-GpU* inkubiert. Nach 30 bzw. 60 minütiger Inkubation bei 37 °C erfolgte die Auftrennung der Reaktionsansätze in einem denaturierenden PAA-Gel (8 %). Auf dem Autoradiogramm sind in allen Ansätzen Spaltprodukte unterschiedlicher Größe vorhanden (SP I bzw. SP I und SP II). Aktive E^{ms} -Mutanten zeichnen sich durch das Vorkommen kleiner Spaltprodukte aus (SP II), da diese Fragmente zwar nach Inkubation mit E^{ms} (PK), aber nicht nach Inkubation mit den Negativkontrollen (NK und K) vorhanden sind.

1b= 60 min Wert der RNA mit Reaktionspuffer inkubiert

2= pyh 2 (Δ NGS 2/3); **3**= pyh 5 (Δ NGS 4); **4**= pyh 6 (Δ NGS 5); **5**= pyh 7 (Δ NGS 6);

6= pyh 8 (Δ NGS 7); **7**= pyh 9 (Δ NGS 8); **8**= pyh 10 (Δ NGS 9);

NK= Zellysate von inaktiven E^{ms} (Δ His₃₀); **PK**= Zellysate von wt E^{ms} , **K**= BHK 21-Zellysate

Bei allen NGS-Mutanten war ein Abbau des eingesetzten Substrates zu verzeichnen. Da zelluläre Ribonukleasen das Substrat abbauen (SP I in Abb. 25), wurden die kleineren E^{rms} -spezifischen Spaltprodukte (SP II) zur Aktivitätsbestimmung herangezogen. Um die Höhe der Enzymaktivität ermitteln zu können, wurde die Radioaktivität von nicht gespaltener RNA, unspezifischen Spaltprodukten (SP I) und E^{rms} -spezifischen kleineren Spaltprodukten (SP II) im „Phosphorimager“ erfasst, und der prozentuale Anteil der E^{rms} -spezifischen Spaltprodukte (SP II) an der gesamten Spaltung (SP I + SP II) ermittelt. Um alle E^{rms} -Mutanten besser vergleichen zu können, wurde die Ribonukleaseaktivität des Wildtyp E^{rms} als 100 % angenommen und die Aktivitäten der E^{rms} -Mutanten angeglichen (Abb. 26).

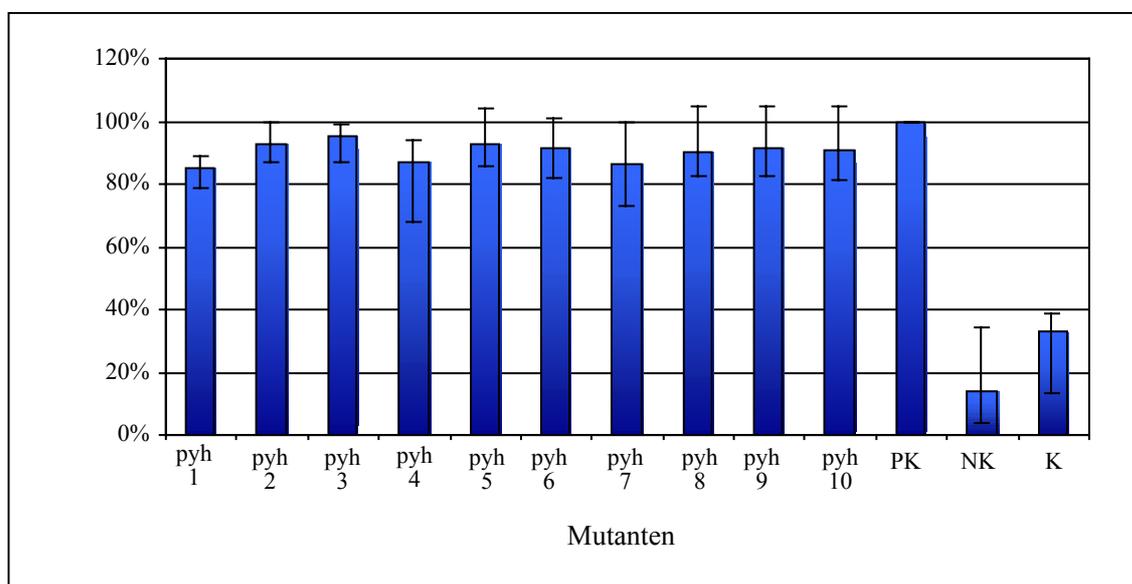


Abb. 26: Ribonukleaseaktivität der Δ NGS E^{rms} -Einfachmutanten

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messreihen.

pyh 1= Δ NGS 1; **pyh 2**= Δ NGS 2/3; **pyh 3**= Δ NGS 3; **pyh 4**= Δ NGS 2; **pyh 5**= Δ NGS 4;

pyh 6= Δ NGS 5; **pyh 7**= Δ NGS 6; **pyh 8**= Δ NGS 7; **pyh 9**= Δ NGS 8; **pyh 10**= Δ NGS 9;

PK= Positivkontrolle: wildtyp E^{rms} ; **NK**= Negativkontrolle: His₃₀ Δ ; **K**= Kontrolle: BHK 21-Zelllysat

Die Eliminierung einzelner N-Glykosylierungsstellen hatte kaum Auswirkung auf die Ribonukleaseaktivität. Um auszuschließen, dass das Fehlen einzelner NGS' funktionell komplementiert werden kann, wurden weitere N-Glykosylierungsstellen entfernt. Auf der Grundlage der bestehenden NGS Δ Plasmide wurden erneut mit der „QuikChange“-Methode weitere Asn→Gln Substitutionen durchgeführt. Hierdurch wurden 7 Doppel- und 5 Dreifachmutanten erzeugt (Tab. 6b), deren ribonukleolytische Aktivität im „RNase-Assay“ bestimmt wurde (Abb. 27).

<i>Klon</i>	<i>deletierte N-Glykosylierungsstelle (Δ NGS) Asn [AAC] \rightarrow Gln [CAA]</i>
pyh 11	Δ NGS 8/9
pyh 12	Δ NGS 5/6
pyh 13	Δ NGS 6/7
pyh 14	Δ NGS 4/5
pyh 15	Δ NGS 5/7
pyh 16	Δ NGS 4/7
pyh 17	Δ NGS 1/4
pyh 18	Δ NGS 1/2/3
pyh 19	Δ NGS 2/3/4
pyh 20	Δ NGS 1/8/9
pyh 21	Δ NGS 5/8/9
pyh 22	Δ NGS 6/8/9

Tab. 6b: Doppel- und Dreifachmutanten des E^{ms}
Die deletierten N-Glykosylierungsstellen sind aufgeführt.

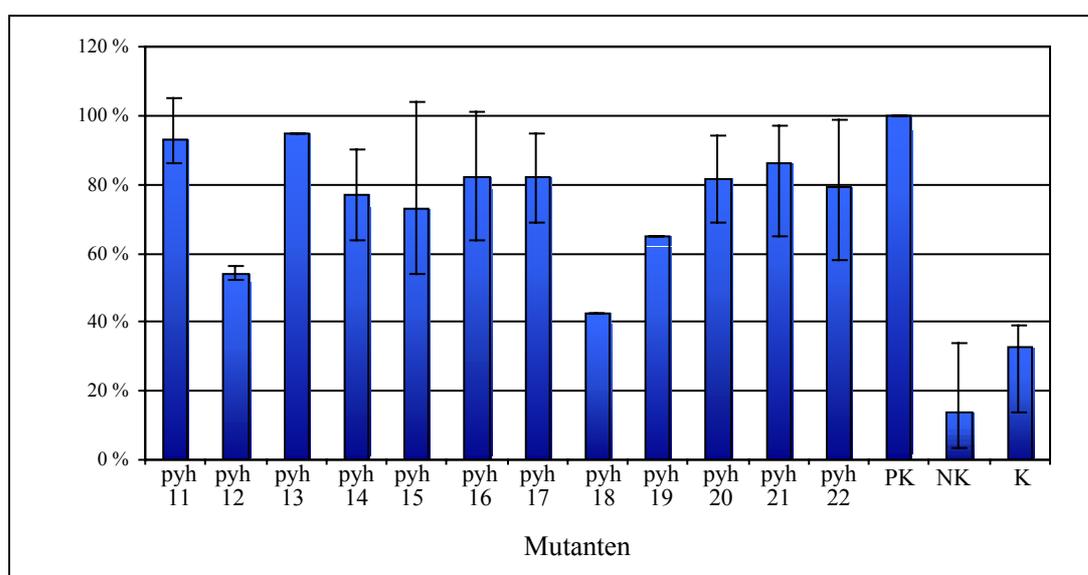


Abb. 27: Ribonukleaseaktivität der Δ NGS E^{ms} Doppel- und Dreifachmutanten

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Messreihen.

pyh 11= Δ NGS 8/9; **pyh 12**= Δ NGS 5/6; **pyh 13**= Δ NGS 6/7; **pyh 14**= Δ NGS 4/5;

pyh 15= Δ NGS 5/7; **pyh 16**= Δ NGS 4/7; **pyh 17**= Δ NGS 1/4; **pyh 18**= Δ NGS 1/2/3;

pyh 19= Δ NGS 2/3/4; **pyh 20**= Δ NGS 1/8/9; **pyh 21**= Δ NGS 5/8/9; **pyh 22**= Δ NGS 6/8/9;

PK= Positivkontrolle: wt E^{ms} ; **NK**= Negativkontrolle: His₃₀ Δ ; **K**= Kontrolle: BHK 21-Zelllysat

Die Eliminierung von zwei N-Glykosylierungsstellen hatte bis auf eine Ausnahme nur geringe Auswirkung auf die RNase-Aktivität. Während die Deletion von zwei N-Glykosylierungsstellen im allgemeinen zu einem Aktivitätsverlust von bis zu 20 % führte, war eine E^{ms} -Mutante mit Δ NGS 5 und 6 (**pyh 12**) nur noch zu ca. 50 % aktiv.

Interessanterweise lagen die Enzymaktivitäten für nahezu alle Dreifachdeletionsmutanten im Bereich von ~60 % bis ~85 %. Eine Ausnahme stellte die E^{ms} -Mutante Δ NGS 1, 2 und 3

(**pyh 18**) dar. Diese Mutante war nur noch zu ~42,5 % aktiv. Hingegen wies die E^{ms}-Mutante Δ NGS 2, 3 und 4 (**pyh 19**) noch eine Aktivität von 65 % auf. Offensichtlich waren die N-Glykosylierungsstellen 1, 2, 3 sowie 5 und 6 für die ribonukleolytische Aktivität wichtig. Da alle generierten Mutanten noch RNase-Aktivität aufwiesen, wurden weitere N-Glykosylierungsstellen entfernt. Bei einigen Mutanten war es möglich, die gewünschte Deletion der N-Glykosylierungsstellen (Δ NGS 8/9) durch Chimärenbildung mit schon vorhandenen E^{ms}-Mutanten zu erzeugen. Die Klonierung konnte unter Verwendung einer „singulären“ Sda I Schnittstelle im E^{ms} (~aa 114) vorgenommen werden, da die N-terminalen sechs N-Glykosylierungsstellen „stromaufwärts“ der „singulären“ Sda I Schnittstelle lokalisiert sind. Andere mussten mit „*QuikChange*“ erzeugt werden. Insgesamt wurden weitere 15 Mutanten, sowie ein vollständig NGS freies E^{ms}, erzeugt (Tab. 6c) und nach Transfektion in BHK 21-Zellen im „*RNase-Assay*“ untersucht. Hierbei zeigten sich deutliche Unterschiede (Abb. 28). Während ein vollständig N-deglykosyliertes E^{ms} (**pyh 38**) inaktiv war, wiesen einige Mehrfachmutanten überraschenderweise noch Enzymaktivitäten von ca. 70-80 % der Wildtypaktivität auf. Hierzu zählten Δ NGS E^{ms} Mehrfachmutanten, die mindestens NGS 1 und 5 enthalten (**pyh 23**= NGS 1/4/5/6/7; **pyh 25**= NGS 1-5; **pyh 27**= NGS 1/5/6/7; **pyh 32**= NGS 1/2/5; **pyh 34**= NGS 1/5). Falls anstelle von NGS 1 die NGS 2 und 3 in Verbindung mit NGS 5 (**pyh 28**) vorkommen, konnte ebenfalls noch eine Enzymaktivität von ca. 60 % detektiert werden. Nahezu inaktiv (~38 % bzw. ~45 %) waren E^{ms}-Mutanten, wenn nur NGS 2 und 3 (**pyh 30**) bzw. NGS 1 und 2 (**pyh 33**) erhalten waren.

<i>Klon</i>	<i>deletierte N-Glykosylierungsstelle (Δ NGS) Asn [AAC] \rightarrow Gln [CAA]</i>
pyh 23	Δ NGS 2/3/8/9
pyh 24	Δ NGS 5/6/8/9
pyh 25	Δ NGS 6/7/8/9
pyh 26	Δ NGS 4/5/8/9
pyh 27	Δ NGS 2/3/4/8/9
pyh 28	Δ NGS 1/4/6/7/8/9
pyh 29	Δ NGS 2/3/4/5/7/8/9
pyh 30	Δ NGS 1/4/5/7/8/9
pyh 31	Δ NGS 2/4/6/7/8/9
pyh 32	Δ NGS 3/4/6/7/8/9
pyh 33	Δ NGS 3/4/5/6/7/8/9
pyh 34	Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9
pyh 35	Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9
pyh 36	Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9
pyh 37	Δ NGS 1/2/3/4/6/7/8/9
pyh 38	Δ NGS 1-9

Tab. 6c: Δ NGS E^{rms} Mehrfachmutanten

Liste der 4-8 fachen Mutanten. Auch ein vollständig NGS freies E^{ms} wurde erzeugt (pyh 38).

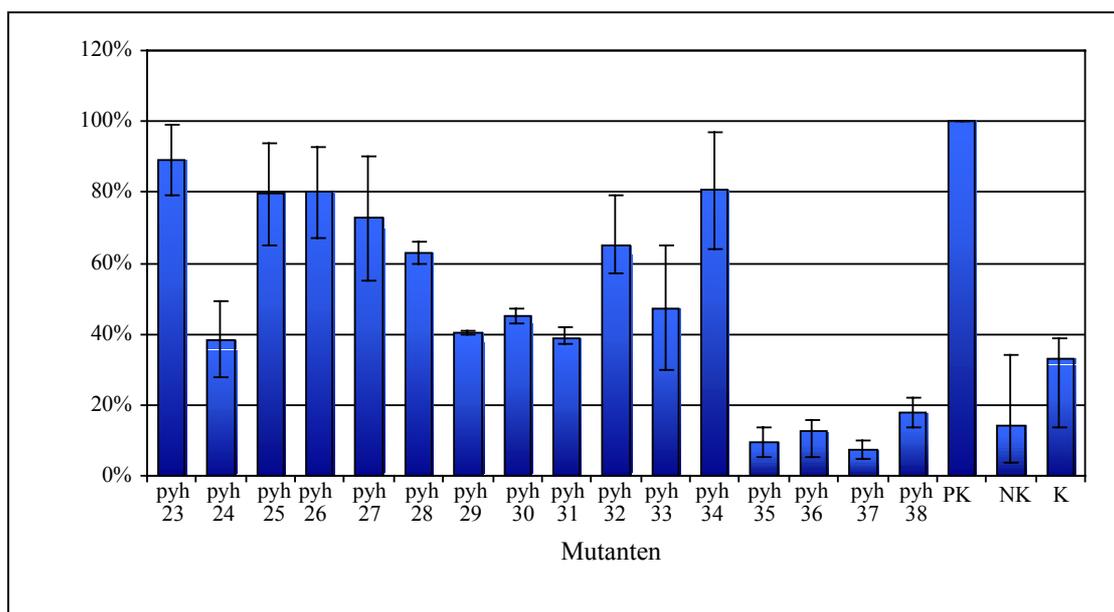


Abb. 28: Ribonukleaseaktivität der Δ NGS E^{rms} Mehrfachmutanten und des NGS freien E^{rms}

Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Versuchsreihen.

pyh 23= Δ NGS 2/3/8/9; **pyh 24**= Δ NGS 5/6/8/9; **pyh 25**= Δ NGS 6/7/8/9; **pyh 26**= Δ NGS 4/5/8/9;

pyh 27= Δ NGS 2/3/4/8/9; **pyh 28**= Δ NGS 1/4/6/7/8/9; **pyh 29**= Δ NGS 2/3/4/5/7/8/9;

pyh 30= Δ NGS 1/4/5/7/8/9; **pyh 31**= Δ NGS 2/4/6/7/8/9; **pyh 32**= Δ NGS 3/4/6/7/8/9;

pyh 33= Δ NGS 3/4/5/6/7/8/9; **pyh 34**= Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9; **pyh 35**= Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9;

pyh 36= Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9; **pyh 37**= Δ NGS 1/2/3/4/6/7/8/9; **pyh 38**= Δ NGS alle;

PK= Positivkontrolle: wt E^{ms} ; **NK**= Negativkontrolle: His₃₀ Δ ; **K**= Kontrolle: BHK 21-Zellysate

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine minimale N-Glykosylierung von zwei N-Glykosylierungsstellen (NGS 1/5) für den Erhalt der Ribonukleaseaktivität essentiell ist. Das alleinige Vorkommen von NGS 3 (**pyh 35**), NGS 2 (**pyh 36**) oder NGS 5 (**pyh 37**) war nicht ausreichend, um im „*RNase-Assay*“ noch ribonukleolytische Aktivität nachweisen zu können.

3.3.2 Einfluss von N-Glykosylierung auf das Viruswachstum

Für die RNase-Aktivität konnte eine konkrete Anforderung an eine minimale N-Glykosylierung bestimmt werden. Um zu untersuchen, wie die Anforderungen an die Glykosylierung bezüglich der Funktion von E^{ms} im Virion sind, mussten N-Glykosylierungsstellen im KSPV Genom mittels „reverser Genetik“ deletiert werden. Unter „reverser Genetik“ wird die Erzeugung spezifischer Mutanten und die nachfolgende Analyse ihrer entsprechenden Phänotypen verstanden. Da die „reverse Genetik“ auf nicht-retroviralen RNA-Viren wie KSPV nicht direkt anwendbar ist, muss zunächst eine sogenannte „infektiöse cDNA-Kopie“ für die Erzeugung rekombinanter Viren hergestellt werden. Die rekombinanten Viren enthalten das gesamte virale Genom in Form einer cDNA-Kopie in einem Plasmid. Ausgehend von einem Bakteriophagen-Promoter (SP6 oder T7) kann *in vitro* durch entsprechende Polymerasen die cDNA in eine RNA-Kopie transkribiert werden. Nach Transfektion der *in vitro* transkribierten RNA in permissive Zellen wird der virale Replikationszyklus initiiert. Für eine Reihe von Pestiviren sind bereits infektiöse cDNA-Gesamtklone beschrieben (*Mendez et al.*, 1998; *Meyers et al.*, 1996a und 1996b; *Moormann et al.*, 1996; *Ruggli et al.*, 1996; *Vassilev et al.*, 1997). Um den *in vitro* Phänotyp von Virusmutanten untersuchen zu können, sollten in dieser Arbeit N-Glykosylierungsstellen im E^{ms} des infektiösen Gesamtklons p447 deletiert werden.

Da die einfache Umklonierung der bereits erzeugten E^{ms}-Mutanten (pyh 1-38) in den infektiösen Gesamtklon wegen fehlender Restriktionsenzymchnittstellen nicht möglich war, mussten Mutageneseserien zur Deletion von N-Glykosylierungsstellen erneut durchgeführt werden. Aufgrund der Plasmidgröße von 14,5 kb war es nicht möglich, die „*QuikChange*“-Methode direkt mit der vollständigen cDNA-Kopie von KSPV (p447) durchzuführen. Aus diesem Grund wurde die entsprechende Mutation unter Verwendung der schon vorhandenen Oligonukleotide zuerst auf der kleineren DNA (ca. 7 kb) eines Vorklons (pHCK9), welcher einen Sequenzabschnitt der cDNA-Kopie eines KSPV enthält (nt 56–4000), durchgeführt. Innerhalb dieses Sequenzabschnittes im pHCK 9 ist sowohl die komplette DNA-Sequenz von

E^{ms} als auch die Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen enthalten. Erneut konnte die zusätzliche Deletion von NGS 8 und 9 durch Chimärenbildung über die Verwendung der Sda I Schnittstelle in der E^{ms} -Sequenz erfolgen.

Nachdem alle erforderlichen Deletionen von N-Glykosylierungsstellen in Vorklonen mittels Sequenzierung verifiziert worden waren, erfolgte die Klonierung des mutierten E^{ms} aus dem Vorklon in den Gesamtklon p447. Da die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen Xho I und Bgl II in beiden Klonen nur einmal vorkommen, konnte die E^{ms} -Sequenz über die Verwendung dieser Restriktionsendonukleasen jeweils zwischen den Vorklonen und dem infektiösen Klon ausgetauscht werden. Auf diese Weise wurden zwölf infektiöse Gesamtklone erzeugt (Tab. 7).

infektiöse Klone (Basis cDNA-Kopie eines KSPV's)	deletierte N- Glykosylierungsstelle Asn [AAC]→Gln [CAA]	Vorklone (Basis pHCK 9)
pyh 51	Δ NGS 1	pyh 39
pyh 52	Δ NGS 1/4	pyh 40
pyh 53	Δ NGS 3/4	pyh 41
pyh 54	Δ NGS 8/9	pyh 42
pyh 55	Δ NGS 2/3/4	pyh 43
pyh 56	Δ NGS 2/3/8/9	pyh 44
pyh 57	Δ NGS 6/7/8/9	pyh 45
pyh 58	Δ NGS 1/4/6/7/8/9	pyh 46
pyh 59	Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9	pyh 47
pyh 60	Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9	pyh 48
pyh 61	Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9	pyh 49
pyh 62	Δ NGS 1-9	pyh 50

Tab. 7: Liste der Vorklone und der infektiösen KSPV mit mutiertem E^{ms}

Die N-Glykosylierungsstellen wurden zunächst im Vorklon pHCK 9 durch „QuikChange“ Mutagenese erzeugt und durch Xho I/ Bgl II Spaltung in den infektiösen cDNA Klon p447 eingefügt.

Zur Erzeugung infektiöser RNA Transkripte wurden die Konstrukte durch die Restriktionsendonuklease Sma I linearisiert. Die Erkennungssequenz für die Endonuklease Sma I (CCCGGG) existiert nur am 3'-Ende der cDNA, so dass ein definiertes 3'-Ende erzeugt wurde. Nach der *in vitro* Transkription mit Sp6 RNA-Polymerase wurde die *in vitro* transkribierte RNA aller infektiösen Klone zur Überprüfung der Funktionalität jeweils in empfängliche Sk 6-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Als Positivkontrolle für die Beurteilung des Experimentes wurden ebenfalls *in vitro* Transkripte des infektiösen Gesamtklons p447 synthetisiert und transfiziert. Nach der Transfektion beginnt die transfizierte cRNA eines funktionsfähigen infektiösen Klons mit der Translation und

Replikation, so dass nach wenigen Stunden virales Antigen in den transfizierten Zellen nachweisbar ist.

Hierfür wurde der immunhistochemische Nachweis des Glykoproteins E2 mit Hilfe des mAk A18 als primärer Antikörper durchgeführt. Alle generierten infektiösen Klone waren nach Transfektion positiv, d. h. in allen Fällen konnte virales Antigen und somit Replikation der Konstrukte nachgewiesen werden.

Um spätere Ergebnisse der Virusvermehrung verschiedener Konstrukte direkt vergleichen zu können, wurden Unterschiede der „spezifischen Infektiosität“ der transkribierten cRNAs bestimmt (Tab. 8). Als „spezifische Infektiosität“ wird der Transfektionserfolg gemessen, d. h. die Anzahl antigenpositiver Zellen, bezogen auf die Menge transfizierter cRNA. Der Wert ist somit ein Maß für die Fähigkeit eines bestimmten Transkripts eine Infektion zu initiieren. Um die spezifische Infektiosität berechnen zu können, werden nach einer Immunperoxidase-Färbung die Anzahl antigenpositiver Zellareale bei einer bestimmten Verdünnung ausgezählt. Da die Höhe der „spezifischen Infektiosität“ für alle Mutanten ungefähr gleich war ($\sim 1,5 \times 10^5/\mu\text{g}$ cRNA), konnte das Wachstumsverhalten aller infektiösen Klone verglichen werden. 12 h, 24 h, 48 h und 72 h nach der Transfektion von jeweils $1\mu\text{g}$ cRNA in Sk 6-Zellen wurden die Überstände geerntet und jeweils durch neues Medium ersetzt. Der Virustiter wurde für jeden Überstand mittels Titration ermittelt (Abb. 29).

infektiöser Klon	Δ NGS	spezifische Infektiosität/ μg cRNA
pyh 51	Δ NGS 1	$13 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 52	Δ NGS 1/4	$18,9 \times 10^3/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 53	Δ NGS 3/4	$11 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 54	Δ NGS 8/9	$18 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 55	Δ NGS 2/3/4	$10,2 \times 10^5/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 56	Δ NGS 2/3/8/9	$13 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 57	Δ NGS 6/7/8/9	$59 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 58	Δ NGS 1/4/6/7/8/9	$6 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 59	Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9	$37 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 60	Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9	$6 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 61	Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9	$20 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
pyh 62	Δ NGS 1-9	$18 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA
p447	keine	$31 \times 10^4/\mu\text{g}$ cRNA

Tab. 8: Bestimmung der spezifischen Infektiosität

Die spezifische Infektiosität gibt den Transfektionserfolg (Anzahl antigenpositiver Zellen/Menge an transfizierter RNA) wieder.

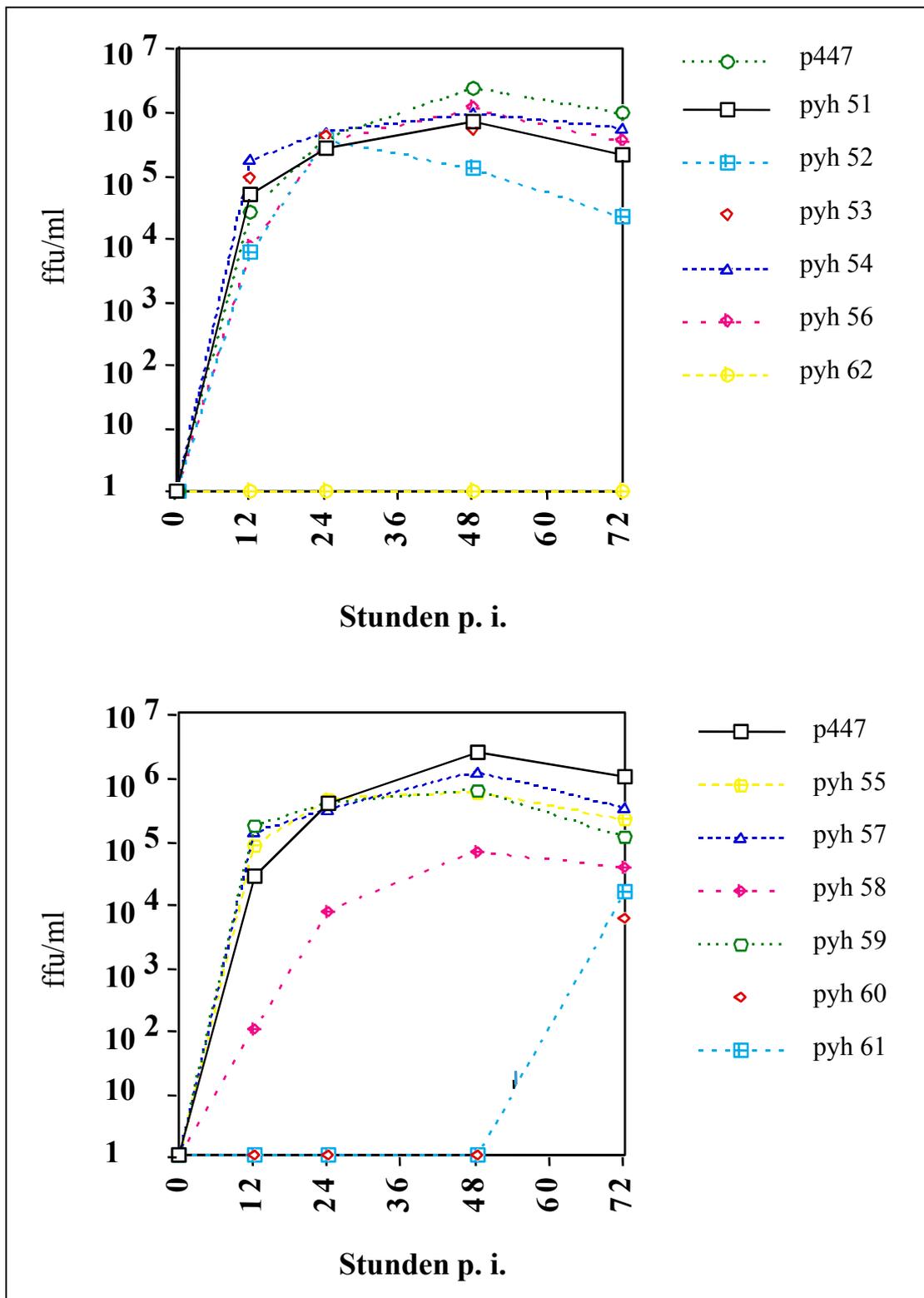


Abb. 29: Viruswachstum der generierten infektiösen Klone im Vergleich zum KSPV (p447)

Um das Wachstum der generierten Gesamtklone mit dem KSPV p447 vergleichen zu können, wurde zunächst jeweils 1 µg cRNA in 1×10^6 Sk 6-Zellen mittels Elektroporation transfiziert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von freigesetztem Virus nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h durch Titration auf Sk 6-Zellen.

pyh 51= Δ NGS 1; **pyh 52**= Δ NGS 1/4; **pyh 53**= Δ NGS 3/4; **pyh 54**= Δ NGS 8/9;

pyh 55= Δ NGS 2/3/4; **pyh 56**= Δ NGS 2/3/8/9; **pyh 57**= Δ NGS 6/7/8/9;

pyh 58= Δ NGS 1/4/6/7/8/9; **pyh 59**= Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9; **pyh 60**= Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9;

pyh 61= Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9; **pyh 62**= Δ NGS 1-9; **p447**= KSPV

Die Virustiter entsprechen mit Ausnahme von fünf Konstrukten nahezu den Virustitern des Wildtyps (p447). Auch die Virusvermehrung des Konstrukts mit nur zwei enthaltenen N-Glykosylierungsstellen (**pyh 59**: NGS 1/5) ist dem Wildtyp sehr ähnlich. Virus, in dem NGS 2, 3 und 5-9 im E^{ms} erhalten sind (**pyh 52**), weist in den ersten 24 h annähernd gleiche Wachstumstiter wie der Wildtyp auf; anschließend fällt der Virustiter ab. Ein ebenfalls nur reduziertes Wachstumsvermögen weist das Konstrukt **pyh 58**: NGS 2/3/5 auf. Erst 72 h nach Transfektion sind niedrige Virustiter zweier weiterer infektiöser Klone vorhanden, bei welchen nur noch NGS 3 und 5 (**pyh 60**) bzw. NGS 2 und 5 (**pyh 61**) vorhanden sind. Zu keinem Zeitpunkt ist KSPV mit unglykosyliertem E^{ms} (**pyh 62**) vermehrungsfähig.

Um das Wachstumsverhalten der verschiedenen Virusmutanten direkt und auch mit der ribonukleolytischen Aktivität analoger E^{ms}-Mutanten vergleichen zu können, wurde für jedes Konstrukt die durchschnittliche Virusproduktion/h für den Zeitraum von 72 h (Σ [Virustiter 0-72 h]/72 h) in ffu/ml berechnet (=Vermehrungsfähigkeit). Um nun die Werte der Vermehrungsfähigkeit mit der ribonukleolytischen Aktivität zu vergleichen, wurde die Vermehrungsfähigkeit des Wildtyps als 100 % angenommen. In Abbildung 30 sind die Ribonukleaseaktivitäten von in BHK 21-Zellen exprimierten Proteins und die Vermehrungsfähigkeit der entsprechenden infektiösen Gesamtklone in % gegenübergestellt.

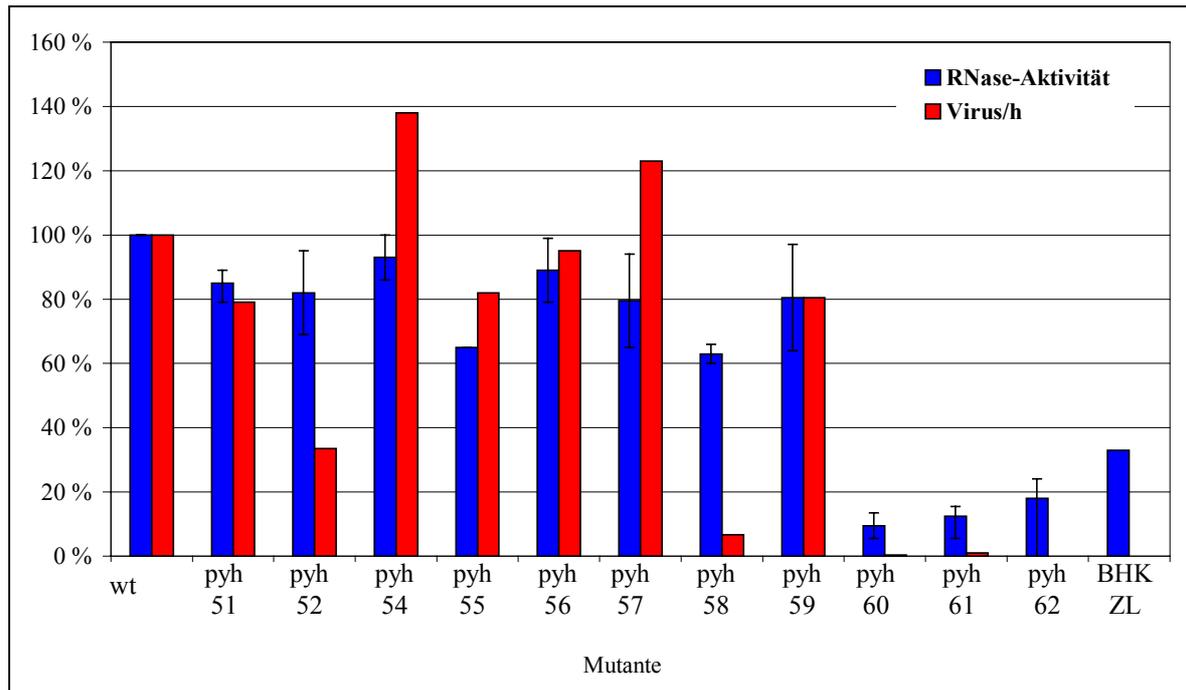


Abb. 30: Vergleich der Ribonuklease-Aktivität zellulär exprimierten Proteins (blaue Balken) und der Vermehrungsfähigkeit von KSPV-Konstrukten (rote Balken)

Zur besseren Übersicht wurde die Enzymaktivität des wildtyp E^{ms} sowie die Wachstumseigenschaft des KSPV p447 als 100 % angenommen (= wt). Die Werte der jeweiligen Konstrukte wurden diesem Wert angeglichen. Die Bezeichnung der Klone entspricht der Nummerierung der infektiösen Gesamtklone.

pyh 51= Δ NGS 1; **pyh 52**= Δ NGS 1/4; **pyh 54**= Δ NGS 8/9; **pyh 55**= Δ NGS 2/3/4;

pyh 56= Δ NGS 2/3/8/9; **pyh 57**= Δ NGS 6/7/8/9; **pyh 58**= Δ NGS 1/4/6/7/8/9;

pyh 59= Δ NGS 2/3/4/6/7/8/9; **pyh 60**= Δ NGS 1/2/4/6/7/8/9; **pyh 61**= Δ NGS 1/3/4/6/7/8/9;

pyh 62= Δ NGS 1-9; **wt**= KSPV p447 bzw. E^{ms}

Interessanterweise ist das alleinige Vorkommen von NGS 1 und 5 sowohl für den Erhalt von 80 % der Ribonukleaseaktivität als auch für 80 % Viruswachstum ausreichend. Zwei weitere Konstrukte (**pyh 55** und **pyh 56**) sind ribonukleolytisch aktiv (~60 % bzw. ~90 %) und gut vermehrungsfähig. In beiden Konstrukten ist NGS 1 und 5 vorhanden (**pyh 55**= NGS 1/5-9 und **pyh 56**= NGS 1/4-7). Die Enzymaktivität als auch der Wert für die Virusvermehrung ist höher, wenn NGS 1 in Verbindung mit NGS 4-7 (**pyh 56**) vorhanden ist. Es hat den Anschein, dass der Verlust von NGS 1 für das Viruswachstum nicht in gleicher Weise wie für den Erhalt der Ribonukleaseaktivität durch NGS 2 und 3 kompensiert werden kann. Während sowohl Virus mit enthaltener NGS 2, 3 und 5 (**pyh 58**) im E^{ms} als auch Virus mit enthaltener NGS 2, 3, 5-9 (**pyh 52**) nur minimal bzw. schlecht vermehrungsfähig ist, ist in beiden Fällen die enzymatische Aktivität des E^{ms} mit ca. 60 % bzw. 80 % deutlich höher. Die Kompensation von NGS 1 ist für das Viruswachstum nur bei gleichzeitigem Vorkommen der verbleibenden NGS 2-9 (**pyh 51**) möglich. Der Wert für die Vermehrungsfähigkeit von Virus, das NGS 1-7 im E^{ms} enthält (**pyh 54**), ist um ca. 40 % höher als für den Wildtyp. Ebenfalls

ein um ca. 20 % höherer Wert konnte für Virus mit enthaltener NGS 1-5 (**pyh 57**) detektiert werden. Die Ribonuklease-Aktivität beider Proteine beträgt ca. 90 % bzw. ca. 80 %. Weder das alleinige Vorkommen von NGS 2 und 5 (**pyh 61**) bzw. NGS 3 und 5 (**pyh 60**) noch die vollständige N-Deglykosylierung (**pyh 62**) resultiert in einem aktiven Protein oder einem vermehrungsfähigen Virus.

4 Diskussion

4.1 Substratspezifität der Ribonuklease E^{ms}

Viren haben verschiedenartige Mechanismen entwickelt, den Wirtszellstoffwechsel zu ihren Gunsten zu beeinflussen. Picornaviren kodieren z. B. verschiedene Proteasen (L^{pro} bei MKSV, 2a Protease bei Entero- und Rhinoviren), die mit Translationsinitiationsfaktoren interagieren und auf diese Weise den Zugang 5' cap tragender zellulärer mRNAs zu Ribosomen inhibieren (z. B. *Weidman et al.*, 2001, *Kanjanahaluethai et al.*, 2000). Inflenzaviren zerstören zelluläre mRNA-Moleküle, indem sie die 5' cap Struktur abschneiden und für die viruskodierten mRNAs verwenden („cap snatching“ z. B. *Li et al.*, 2001; *Leahy et al.*, 2001).

Eine ähnliche Funktion ist auch für das E^{ms} zu fordern, da insbesondere kleine RNA Viren sehr platzsparend ausgelegt sind und nur essentielle Funktionen kodieren. Für die Replikation des pestiviralen Genoms wird E^{ms} nicht benötigt, wie Studien mit subgenomischen Replikons belegen (*Behrens et al.*, 1998). Viren sind jedoch bei ihrer Vermehrung in der Zellkultur auf das E^{ms} , nicht aber auf die Ribonuklease-Aktivität angewiesen. Interessanterweise sind KSP Viren, die in der Zellkultur lebensfähig sind und ein enzymatisch inaktives E^{ms} kodieren (*Hulst et al.*, 1998; *Meyers et al.*, 1999), im Schwein kaum mehr vermehrungsfähig, d. h. es wird weder eine Krankheit ausgelöst noch ist eine Reisolierung von Virus möglich (*Meyers et al.*, 1999). Für in Insektenzellen erzeugtes und anschließend gereinigtes E^{ms} konnte gezeigt werden, dass es in isolierten B-Lymphozyten verschiedener Spezies Apoptose induziert. Die Enzymaktivität schien jedoch nicht der Auslöser zu sein (Ph. D. Thesis von C. J. Brusckke, zitiert in einem Übersichtsartikel von *Hulst*, 2001).

Da bekannt war, dass E^{ms} *in vitro* bevorzugt einzelsträngiges homopolymeres Uridin spaltet, es aber andererseits heteropolymere Substrate, wie z.B. das virale Genom oder ribosomale RNA, vollständig degradiert, sollte die Spaltspezifität auf der Basis eines definierten heteropolymeren RNA-Substrates analysiert werden. Hierzu wurde in einem limitierenden Verdau das radioaktiv markierte RNA-Substrat mit E^{ms} inkubiert und das Spaltungsmuster ausgewertet. E^{ms} spaltet unter denaturierenden Inkubationsbedingungen (7 M Harnstoff, 56 °C) ausschließlich NpU Phosphodiesterbindungen, wobei Adenin, Cytosin, Guanin und Uridin an der N-Position stehen können.

Zur weiteren Charakterisierung der NpU Spaltung sollte untersucht werden, ob für die N-Position eine Basenpräferenz existiert. Verwendet wurden RNA-Moleküle mit einer Länge von 50 nt, die sich nur in der Base 5' von Uridin unterscheiden (*Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU*). Das jeweilige RNA-Substrat wurde radioaktiv markiert und mit in Insektenzellen erzeugtem und gereinigtem E^{ms} inkubiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Ansätze in einem denaturierenden PAA-Gel waren die Spaltungsmuster der vier RNA-Substrate weitgehend identisch: Es war sowohl das definierte Spaltprodukt der NpU Spaltstelle als auch ein Set an um jeweils ein Nukleotid verschieden großer Spaltfragmente nachweisbar. Diese zusätzlichen Spaltfragmente konnten nochmals unterteilt werden in Spaltprodukte, die in der Nähe der NpU Spaltstelle akkumulierten und Spaltprodukte, die nahezu gleichmäßig über die gesamte Gelfläche hinweg bis zur Lauffront aufgetrennt wurden. Das 5'-Spaltprodukt der NpU Spaltstelle war sowohl nach Markierung des 5'-Endes als auch nach interner Markierung des singulären Uridins (Einbau von ³²P- α -[UTP]) nachweisbar. Folglich verbleibt die radioaktiv markierte Phosphatgruppe nach interner Markierung am 3'-Ende des 5'-Spaltproduktes, was in Einklang mit dem für Mitglieder der T2 RNase Familie postulierten Spaltungsmechanismus ist. Anhand der RNase Rh (T2 RNase) konnte aufgezeigt werden, dass die Spaltung eine Phosphotransferase-Reaktion ist, bei der die Phosphatgruppe auf das 3'-Ende des 5'-Spaltproduktes übertragen wird (z. B. *Ohgi et al.*, 1992).

Falls eine Basenpräferenz von E^{ms} an der B1 Seite (N-Position) vorhanden ist, sollte sie anhand der enzymkinetischen Parameter K_m und V_{max} für die vier NpU Substrate nachgewiesen werden. Hierzu wurde jeweils der Substratumsatz pro Zeiteinheit ermittelt und die Werte verglichen. Da sowohl die Reaktionsgeschwindigkeiten ($V_{max} = 50-150$ fmol/s) als auch die Bindungsaffinitäten ($K_m = 85-260 \times 10^{-9}$ M) von *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* bzw. *Sub-UpU* nur gering variierten, hat die Base an der N-Position nahezu keinen Einfluss auf die Spaltung. Einzig *Sub-ApU* weist aufgrund des kleinsten K_m -Wertes ($\sim 260 \times 10^{-9}$ M) eine geringgradig höhere Substrataffinität auf; auch die Spaltung erfolgt im Vergleich zu den anderen NpU Substraten schneller ($V_{max} = \sim 150$ fmol/s). Erste Hinweise für die Bevorzugung der ApU Spaltstelle ergaben sich in einem limitierenden Verdau von einer heteropolymeren RNA durch E^{ms}, weil von insgesamt fünf ApU Spaltprodukten drei zu einer stärkeren Schwärzung des Films führten (siehe Abb. 2 in 3.1). Da die Stärke der Filmschwärzung mit der Höhe an Radioaktivität korreliert, lag eine Akkumulation von Spaltfragmenten dieser Spaltstelle vor. Für die T2 RNase MC1 von *Momordica charantia* (aus Kürbiskernen isoliert), die ebenfalls NpU Phosphodiesterbindungen spaltet, wurde eine Spaltpräferenz für das

Diribonukleotid CpU ermittelt (Irie *et al.*, 1993). RNase MC1 akzeptiert an der N-Position Adenin, Cytosin oder Uridin. Es ist für Ribonukleasen ungewöhnlich, dass die Spaltspezifität anhand der B2 Seite (3'-Spaltstelle) determiniert wird. In der Regel wird die Spaltspezifität über Baseninteraktionen an der B1 Seite (5'-Spaltstelle bzw. N-Position) begründet. So spalten z.B. RNasen der T2-Familie, die aus Pilzen isoliert wurden, bevorzugt Phosphodiesterbindungen von ApN (z. B. *Übersichtsartikel Irie, 2001*). Auch bei den meisten pflanzlichen Ribonukleasen ist die Spaltspezifität an der B1 Seite festgelegt. Interessanterweise ist bei Ribonukleasen, die in Pflanzensamen vorkommen, wie RNase MC1 oder RNase LC1 (*Luffa cylindrica*), die Spaltspezifität an der B2-Seite (3'-Spaltprodukt) determiniert (Irie *et al.*, 1993).

Wenn man die K_m -Werte der NpU Substrate für E^{ms} mit den Werten anderer Ribonukleasen vergleicht, sind sie mindestens um den Faktor 10^3 niedriger, was einer hohen Bindungsaffinität entspricht. Allerdings wurden enzymkinetische Untersuchungen für andere Ribonukleasen mit Diribonukleotiden durchgeführt. Die Substrateigenschaften von Diribonukleotiden unterscheiden sich von den Eigenschaften längerer RNA-Molekülen. So ist auch der K_m -Wert für E^{ms} , der für UpU Diribonukleotide ermittelt wurde, mit $\sim 870 \times 10^{-6}$ M (Windisch *et al.*, 1996) um den Faktor 10^3 höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte. Es ist wahrscheinlich, dass bei längeren RNA-Molekülen zusätzlich zu den Baseninteraktionen, die im aktiven Zentrum stattfinden, eine separate Bindung in einer Substratbindungstasche erfolgt, was eine höhere Substrataffinität des E^{ms} bewirkt. Die Wechselzahlen von E^{ms} für *Sub-ApU*, *Sub-CpU*, *Sub-GpU* und *Sub-UpU* liegen im Bereich von $\sim 0,5-1,3$ s⁻¹. Die Wechselzahl ($V_{max}/\text{totale Enzymkonzentration}$) ist ein Maß für die Enzymaktivität, da sie bei vollständiger Substratsättigung die Anzahl der pro Zeiteinheit gespaltenen Substratmoleküle wiedergibt. Beispielsweise beträgt die Wechselzahl von RNase Rh für das Diribonukleotid ApU $135,5$ s⁻¹ (Ohgi *et al.*, 1992) und ist somit um den Faktor 100 höher als die für E^{ms} ermittelten Wechselzahlen. Ein direkter Aktivitätsvergleich von E^{ms} mit anderen Ribonukleasen ist jedoch nicht möglich, da die verwendeten Substrate unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Während bei Diribonukleotiden nur eine Spaltung erfolgt, werden RNA-Moleküle mehrfach gespalten. Hierdurch erhöht sich die Molarität an spaltbarem RNA-Substrat, was zur kompetitiven Hemmung führt. Im Spaltungsmuster der NpU Substrate ist ersichtlich, dass eine Degradation der NpU Spaltprodukte bis in kleinste Fragmente erfolgt (Abb. 9 in 3.1). Auch der mit zunehmender Inkubationszeit zu beobachtende geringere Umsatz an RNA-Substrat ist ein Indiz für die kompetitive Hemmung. Da in einem limitierenden Verdau ausschließlich NpU Phosphodiesterbindungen gespalten werden und

Uridin-freie RNA kein Substrat darstellt, liegt jedoch eine starke Präferenz des E^{ms} für Uridin vor. Auch nach Inkubation mit homopolymeren Substraten wurde eine starke Präferenz für poly-U ermittelt. Ein Abbau von poly-A, poly-C oder poly-G konnte nicht nachgewiesen werden (*Windisch et al.*, 1996). Alle hinsichtlich der Basenpräferenz analysierten Ribonukleasen der T2 Familie weisen eine Basenpräferenz anstelle einer absoluten Basenspezifität auf (z. B. Übersichtsartikel *Irie*, 2001). Während eine Basenpräferenz von T2 RNasen aus Pilzen in der Regel für A > G > C, U besteht, spalten pflanzliche RNasen der T2-Familie bevorzugt Guanin (G > A = U > C). Einzig die RNase MC1 besitzt eine starke Präferenz für Uridin: U >> G > A > C (Übersichtsartikel *Irie*, 2001). Die Spaltpräferenz von E^{ms} ist U >> N.

Anstelle weiterer unspezifischer endonukleolytischer Spaltungen könnte die Bildung zusätzlicher Spaltprodukte auch auf einer 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität des E^{ms} basieren. Eine 5'-3' Exoribonuklease-Aktivität ist aufgrund der Experimente auszuschließen, da nach Abspaltung des radioaktiven Phosphatmoleküls nach 5'-Endmarkierung der Nachweis verschieden großer Spaltfragmente nicht möglich ist. Da Exoribonukleasen zumeist Mononukleotide abspalten, unterscheiden sich die Spaltprodukte um ein Ribonukleotid (*Zuo et al.*, 2002; Übersichtsartikel *Cannistraro & Kennell*, 2001). Voraussetzung für eine 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität ist das Vorkommen eines weiteren exoribonukleolytisch aktiven Zentrums. Da die N-terminalen 140 Aminosäuren von E^{ms} zum Erhalt der Ribonuklease-Aktivität ausreichen, und das RNA-Substrat in zum Wildtyp identische Fragmente gespalten wird, müsste ein zusätzliches aktives Zentrum im N-terminalen Bereich (aa 1-140) vorhanden sein. Uns ist jedoch keine Endoribonuklease bekannt, die gleichzeitig exoribonukleolytisch aktiv ist, ohne Mitglied eines Enzymkomplexes zu sein. Schließlich ist nicht auszuschließen, dass z. B. während der immunaffinitätschromatographischen Aufreinigung von E^{ms} Umwelt-RNasen angereichert wurden, die das RNA-Substrat ebenfalls spalten. Jedoch konnte das Spaltungsmuster mit verschiedenen Präparationen von E^{ms} beobachtet werden. Warum eine Akkumulation von Spaltprodukten in unmittelbarer Nähe des NpU Spaltproduktes vorhanden ist, bedarf noch weiterführender Analysen. Denkbar wäre eine „unpräzise“ Spaltung. Da sehr wahrscheinlich keine absolute Basenspezifität vorliegt, wäre es möglich, dass auch die benachbarten Basen in die B2 Seite binden. Falls eine häufigere Spaltung von Basen, die zu Uridin benachbart sind, aufgrund der Nähe zu Uridin erfolgt, wären Spaltprodukte ähnlicher Größe nachweisbar. Auch das Vorliegen eines Artefaktes ist möglich. Da nach Transkription mit T3 RNA-Polymerase vermutlich aufgrund des „*Template-switches*“ der T3 RNA-

Polymerase eine Schar verschieden großer RNA-Moleküle vorlag, erfolgte das Ausschneiden einzelner RNA-Banden aus dem denaturierenden PAA-Sequenzgel. Nach Ausschneiden mehrerer anstelle von einer RNA-Bande und anschließender Inkubation mit E^{ms} könnten nach Auftrennen der Reaktionsansätze mehrere Spaltprodukte in Höhe der NpU Spaltstelle in Verbindung mit der gleichen Anzahl an RNA-Substratbanden vorkommen.

4.2 Mutagenesestudien der RNase E^{ms}

4.2.1 aktives Zentrum

Die verwandtschaftliche Beziehung von E^{ms} zu RNase Rh wurde bestätigt, da E^{ms} -Mutanten, die zu RNase Rh-Mutanten analog waren, ähnlich hohe Enzymaktivitäten aufwiesen. Zur Bestimmung der RNase-Aktivitäten musste zunächst ein Testsystem etabliert werden (Degradationstest). Im Degradationstest werden im Unterschied zu dem bisher für E^{ms} verwendeten Testsystem, das auf der photospektrometrischen Erfassung freigesetzter säurelöslicher kleiner Spaltprodukte basiert, alle Spaltprodukte erfasst. Ein weiterer Vorteil ist, dass keine Fällung der Spaltprodukte erforderlich ist, da ihr Anteil direkt im denaturierenden PAA-Gel mittels „Phosphorimaging“ ermittelt werden kann. Folglich sind noch geringe Aktivitäten messbar.

E^{ms} -Mutanten mit ausgetauschten Aminosäuren, die im oder in der Nähe des aktiven Zentrums lokalisiert sind, weisen noch geringe (His₇₉Asp= 1,5 %, Lys₇₈Thr= 9,9 %) bzw. nahezu keine Ribonuklease-Aktivität (His₃₀Asp= 0 %, His₇₄Phe= 0,7 %, Glu₇₅Gly= 0,5 %) mehr auf. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit analogen Mutagenesestudien der RNase Rh, weshalb der Aufbau beider aktiver Zentren vermutlich vergleichbar ist. Für eine Reihe weiterer T2 RNasen, z.B. RNase LE, konnte ein zu RNase Rh identischer Aufbau des katalytischen Zentrums bereits anhand der Röntgenkristallstruktur aufgezeigt werden (*Tanaka et al.*, 2000). Die enzymatische Spaltung der RNA wird bei RNase Rh im Zuge der Protonierung des Histidin 109 eingeleitet, worauf sich ein instabiles RNA-Zwischenprodukt bildet, das unter Aufnahme eines Wasserstoffions vom Protonendonator, Histidin 46, zerfällt (*Ohgi et al.*, 1992). Da Histidin 104 nicht direkt an der Grundreaktion der Katalyse beteiligt ist, sondern zusammen mit Glutaminsäure 105 und Lysin 108 die Stabilisierung des Zwischenproduktes bewirkt, ist der Aktivitätsverlust nach Mutation von Histidin 109 höher

(0,03 % Wildtypaktivität) als nach Mutation von Histidin 104 (0,54 % Wildtypaktivität). Ein Aktivitätsunterschied in dieser Höhe kann nach Mutagenese im E^{ms} nicht nachgewiesen werden. Die Mutation von Histidin 74 zu Phenylalanin resultiert in einem um den Faktor 2 höheren Aktivitätsverlust (noch 0,7 % Wildtypaktivität) als nach Mutation von Histidin 79 zu Aspartat (1,5 % Wildtypaktivität). Histidin 74 ist die zu Histidin 104 in RNase Rh analoge Aminosäure. Im vorläufig entworfenen Modell von E^{ms} , das auf Basis der Kristallstruktur der RNase Rh (N-terminale 103 aa) und der Protease ω (C-terminale 124 aa) erstellt wurde, könnte sowohl Histidin 74 als auch Histidin 79 als Protonenakzeptor für ein Wasserstoffion der 2' OH-Ribosegruppe des Ribonukleotids mit der Base 1 dienen (Abb. 31). Histidin 30 fungiert bei der Spaltung wahrscheinlich als Protonendonator für das 5' Sauerstoffatom der Ribose des Ribonukleotids mit der Base 2. Da die zu Histidin 30 und Histidin 79 analogen Histidine in der Familie der T2 RNasen hoch konserviert sind, führen diese Histidine wahrscheinlich auch im E^{ms} die Grundreaktion der Spaltung durch. Das zu Histidin 74 analoge Histidin ist bei RNase I, die aus *E. coli* isoliert wurde, und bei RNase S_{F11} aus *Nicotiana glauca* durch Tyrosin ersetzt (z.B. Übersichtsartikel Irie *et al.*, 2001). Da Tyrosin nicht geladen ist, fungieren die Imidazolringe der hoch konservierten Histidine 30 und 79 während der Grundreaktion der Spaltung höchstwahrscheinlich als Protonendonator und als Protonenakzeptor.

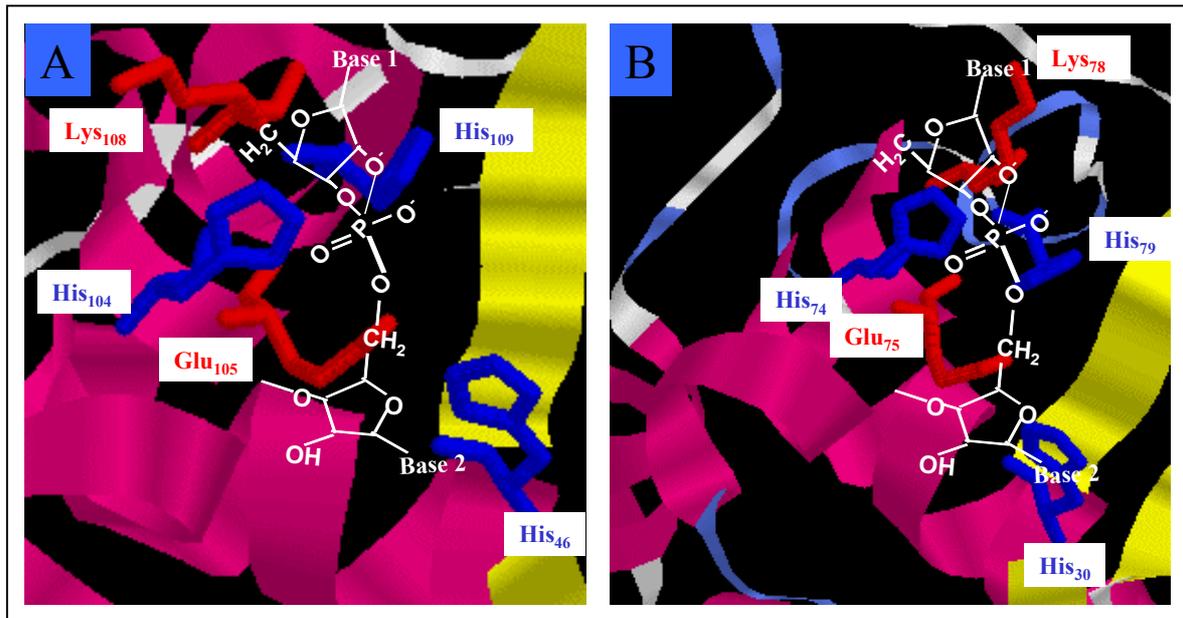


Abb. 31: Vergleich der aktiven Zentren von RNase Rh (A) und E^{ms} (B)

Die katalytisch aktiven Aminosäuren sind sowohl in der Kristallstruktur von RNase Rh als auch im Modell von E^{ms} markiert. Um die Funktion der blau dargestellten Histidine während der RNA-Spaltung besser vergleichen zu können, wurde ein Diribonukleotid in das aktive Zentrum eingezeichnet. In RNase Rh führen die Histidine 46 und 109 die Grundreaktion der Spaltung durch. Die analogen Aminosäuren im E^{ms} sind die Histidine 30 und 79 („Rasmol“-Darstellung).

Die Basenspezifität ($A > G > C, U$) der RNase Rh wird über eine hydrophobe Tasche an der B1 Seite bestimmt. Die Röntgenkristallstruktur ergab, dass der Boden der Tasche von den Aminosäuren Asp₅₁, Tyr₅₇ und Trp₄₉ gebildet wird (Kurihara *et al.*, 1996). Dabei interagiert die Base Asp₅₁ vermutlich durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken mit der Base des Ribonukleotids 5' von der Spaltstelle (B1 Seite). Um zu untersuchen, ob diese Beobachtung auf E^{ms} übertragbar ist, wurde in Anlehnung an Aspartat 51 der RNase Rh die Aminosäure Glutamat 35 des E^{ms} mutiert (Abb. 32).

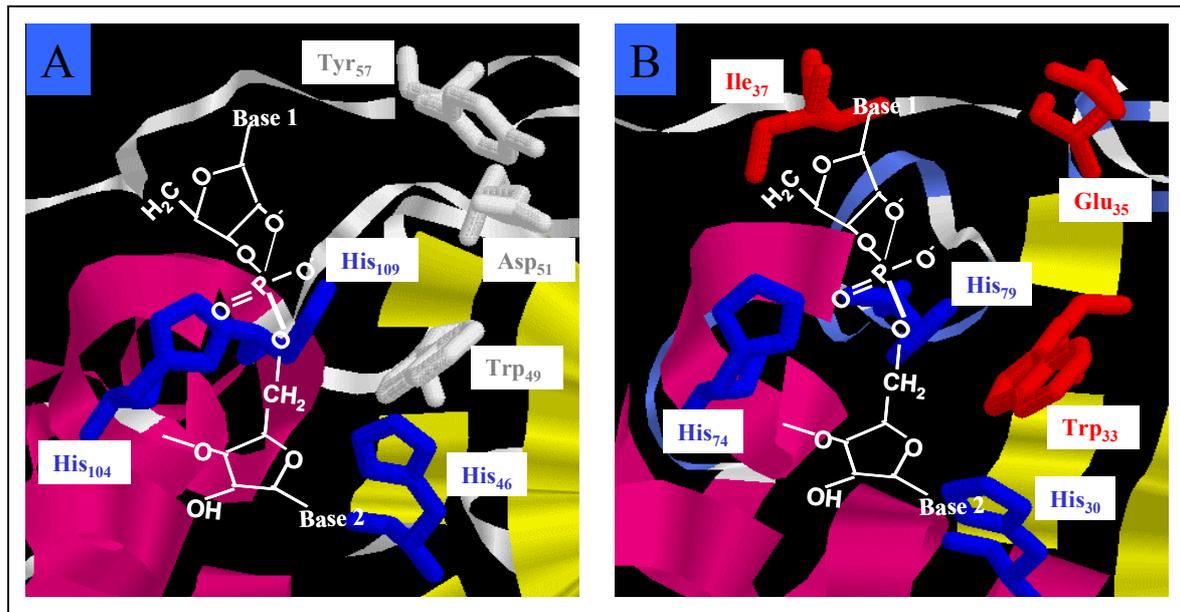


Abb. 32: Aminosäuren der B1 Seite (grau unterlegt) in der Kristallstruktur von RNase Rh (A) und analoge Aminosäuren (rot) im Modell von E^{ms} (B)

An der B1 Seite der RNase Rh bilden Tryptophan 49, Aspartat 51 und Tyrosin 57 eine hydrophobe Tasche aus. Die entsprechenden Aminosäuren im E^{ms} sind Tryptophan 33, Glutamat 35 und evtl. Isoleucin 37. Neben der Substratbindung ist Tryptophan 49 bei der RNase Rh an der Ausrichtung des Imidazolrings der katalytisch aktiven Aminosäure Histidin 109 durch die Ausbildung eines „Stackings“ beteiligt. Eine solche Interaktion könnten im E^{ms} die Aminosäuren Tryptophan 33 und Histidin 79 eingehen.

Da im Gegensatz zu Aminosäureaustauschen der RNase Rh ($Asp_{51}Glu= 16\%$; $Asp_{51}Asn= 66\%$) die E^{ms} -Mutanten ($Glu_{35}Asp$ und $Glu_{35}Arg$) im Vergleich zum Wildtyp noch etwa zu ca. 82 % bzw. ~70 % aktiv waren, ist davon auszugehen, dass diese Aminosäureposition zumindest nicht in gleichem Maße wie Aspartat 51 der RNase Rh an der Substratbindung von E^{ms} beteiligt ist. Es konnte auch keine Änderung der Spaltpräferenz der E^{ms} -Mutanten $Glu_{35}Asp$ und $Glu_{35}Arg$ im Degradationstest festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist einleuchtend, da E^{ms} eine andere Spaltspezifität besitzt. Im Gegensatz zu RNase Rh ist die Spaltspezifität nicht an der B1 Seite der Spaltstelle (RNase Rh spaltet bevorzugt ApN Phosphodiesterbindungen) sondern an der B2 Seite der Spaltselle determiniert (Spaltung von NpU). In Anlehnung an das Modell von E^{ms} könnte das RNA-Substrat jedoch ebenfalls wie bei RNase Rh in eine hydrophobe Tasche der B1 Seite binden. Eine hydrophobe Tasche könnte aus den Aminosäuren Glutamat 35, Isoleucin 37 und Tryptophan 33 gebildet werden. Da der Austausch von Tryptophan 33 zu Valin einen nahezu vollständigen Verlust der Ribonukleaseaktivität (0,3 % Aktivität) bewirkt, könnte Tryptophan 33 eine maßgebliche Interaktion mit der Base an der B1 Seite eingehen. Es darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass ein solcher Austausch auch die Ausrichtung der aktiven Aminosäure Histidin 79 verändern könnte, da eine mögliche Stabilisierung von Histidin 79 durch den aromatischen

Ring des Tryptophan 33 fehlt (siehe Abb. 32). Bei RNase Rh bildet der aromatische Ring von Tryptophan 49 mit dem Imidazolring des Histidin 109 ein „Stacking“ aus (Kurihara *et al.*, 1996).

E^{ms}-Mutanten, bei welchen Methionin 58 bzw. Aspartat 48 zu Glycin mutiert wurden, sind nur noch zu etwa 20 % bzw. 12 % aktiv. Es ist unklar, warum diese Mutationen einen so hohen Effekt auf die RNase-Aktivität haben. Im E^{ms}-Modell sind Methionin 58 und Aspartat 48 an der Oberfläche des Modells exponiert, wodurch eine Interaktion mit dem RNA-Substrat möglich sein könnte.

Zusätzlich zur Mutation von Aminosäuren, die evtl. an der Substratbindung beteiligt bzw. katalytisch aktiv sind, wurden Cysteine, die im Modell von E^{ms} eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden, zu Serin mutiert (Cys₃₈Ser und Cys₈₂Ser). Die Substitution zu Serin verhindert die Ausbildung von Disulfidbrücken. In beiden Fällen hat die Cys→Ser Substitution zu inaktivem E^{ms} geführt, so dass vermutlich beide Cysteine an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sind.

4.2.2 minimale Ribonuklease

Das in dieser Arbeit erstellte Modell von E^{ms} basiert auf zwei unterschiedlichen Proteinstrukturen: Während die N-terminalen 103 Aminosäuren auf Basis der RNase Rh modelliert wurden, sind die C-terminalen 124 Aminosäuren auf Basis der Kristallstruktur der Protease ω entstanden. Da das Modell somit die Hypothese nahe legt, dass E^{ms} aus zwei Domänen besteht, und das aktive Zentrum der Ribonuklease Teil der N-terminalen Region ist, sollten zur Bestimmung der „minimalen Ribonuklease“ zunächst C-terminale Verkürzungen vorgenommen werden. Die Bestimmung der „minimalen Ribonuklease“ erfolgte mit ungereinigtem E^{ms} Protein, das durch transiente Expression in Säugerzellen (BHK 21-Zellen) erzeugt wurde. Zur Aktivitätsbestimmung wurde im Degradationstest radioaktiv markiertes Substrat (z. B. *Sub-CpU*) mit Zelllysate inkubiert. Obwohl im Zelllysate endogene RNase-Aktivität erkennbar war, ließ sich durch das Auftreten spezifischer kleiner Spaltprodukte die Aktivität qualitativ nachweisen. RNA-Fragmente, die auf der Spaltung durch RNasen im BHK 21-Zelllysate basieren, konnten anhand ihrer Größe von den E^{ms}-spezifischen Spaltprodukten abgegrenzt werden; das Endprodukt dieser zellulären RNasen war größer als

die E^{ms} -spezifischen Spaltprodukte. Für die Bildung der kleinen Spaltprodukte ist die weitere unspezifische endonukleolytische oder aber die hypothetische 3'-5' Exoribonuklease-Aktivität des E^{ms} verantwortlich. Da die eingesetzte Enzymkonzentration nicht bestimmt werden konnte, war nur eine qualitative Aussage bezüglich der enzymatischen Aktivität der E^{ms} -Deletionsmutanten zu treffen. Nach Deletion von 87 C-terminalen Aminosäuren konnte noch ribonukleolytische Aktivität nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass mindestens die C-terminalen 87 Aminosäuren eine eigenständige Domäne unbekannter Funktion ausbilden können (Abb. 33).

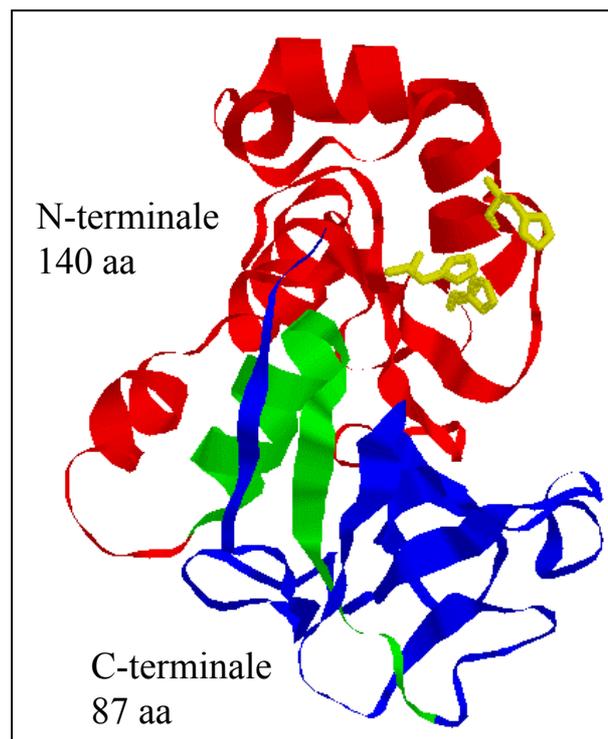


Abb.33: Darstellung der für die Enzymaktivität essentiellen 140 N-terminalen Aminosäuren im Modell von E^{ms}

Die zum Erhalt der Enzymaktivität essentiellen N-terminalen Aminosäuren sind rot dargestellt. Die Farben blau und grün markieren die nicht essentiellen Aminosäuren. Aminosäuren, die den Unterschied zwischen aktiver C-terminal verkürzter E^{ms} -Mutante (E^{ms} 140) und nicht mehr aktiver E^{ms} -Mutante (E^{ms} 120) bilden, sind grün unterlegt.

Es sind weitere Mutagenesestudien im Bereich von Aminosäure 120 bis Aminosäure 140 (in Abb. 33 grün markiert) notwendig, um eine exakte Eingrenzung der essentiellen Aminosäuren zu erhalten. Es ist denkbar, dass eine zumindest im Modell von E^{ms} gebildete α -Helix (aa 130-140) zur Stabilisierung des N-terminalen Bereichs benötigt wird. Die enzymatische Aktivität eines isolierten N-Terminus (s. o.) *in vitro* ist für keine andere T2 RNase beschrieben. Für RNase III von *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Substratbindedomäne zwar für die Aktivität *in vivo* benötigt wird, das aber unter bestimmten unphysiologischen

Bedingungen *in vitro* diese Domäne nicht für eine katalytische Aktivität des Enzyms notwendig ist (nach unveröffentlichten Angaben zitiert in *Nicholson*, 1999). Vor kurzem konnte für eine isolierte C-terminale Domäne von E^{ms} (37 bzw. 27 aa) Translokationsaktivität aufgezeigt werden. Translokation ist ein energieunabhängiger, relativ schneller Prozess (< 1 Minute), bei dem Proteine ohne Interaktion mit zellulären Rezeptoren die Zellmembran passieren können. Peptide, die aa 194-220 bzw. aa 191-227 des E^{ms} umfassen, sind zur Translokation durch Zellmembranen fähig (*Langedijk et al.*, 2001). Diese Peptide waren in der Lage Proteine wie „Streptavidin-FITC“ oder „Avidin-Texas Red“ zu translozieren. Auch die Aufnahme des 227 aa langen E^{ms} in das Zytoplasma von epithelialen Zellen wurde nachgewiesen.

Eine weitere mögliche Funktion des C-terminalen Bereichs (aa 140-227) leitet sich aus dem Modell von E^{ms} ab, in welchem die C-terminalen 124 Aminosäuren auf Basis der Röntgenkristallstruktur der Protease ω , einer Papain ähnlichen Cysteinprotease, modelliert worden sind. Da die Protease, welche die Spaltung zwischen E^{ms} und E1 während der Polyproteinprozessierung durchführt, nicht bekannt ist, könnte die C-terminale Domäne von E^{ms} eine Autoprotease darstellen. Jedoch fehlen in der Sequenz von E^{ms} die charakteristischen katalytisch aktiven Aminosäuren (Cystein und Histidin), die üblicherweise in einem konservierten Sequenzkontext stehen (z. B. *Lim et al.*, 2000). Es besteht auch keine Homologie zwischen E^{ms} und anderen Papain ähnlichen Cysteinproteasen.

4.3 Einfluss von N-Glykosylierung auf die Ribonukleasefunktion und das Viruswachstum in Zellkultur

Ein auffälliges Charakteristikum des E^{ms} ist der hohe Grad an N-Glykosylierung, wobei bei den verschiedenen Pestiviren 7–9 potentielle N-Glykosylierungsstellen vorkommen (die meisten BVDV-Stämme haben 7 N-Glykosylierungsstellen, BDV-Stämme weisen 8 und KSPV 7-8 N-Glykosylierungsstellen auf). In Virion-assoziiierter oder sezernierter Form besitzt das E^{ms} bei einem berechneten Molekulargewicht von 25 kDa eine apparente molekulare Masse von 50-60 kDa (Monomer) und ist damit das am stärksten glykosylierte Protein von Pestiviren. Die nähere Analyse zeigt, dass drei der N-Glykosylierungsstellen vollständig konserviert sind (NGS 1, 3 und 5), es aber ansonsten speziesspezifische Präferenzen gibt.

Zur Klärung der Funktion der N-Glykosylierung bei E^{ms} wurde zunächst der Einfluss der N-Glykosylierung auf die RNase-Aktivität und anschließend auf die Vermehrungsfähigkeit von

KSPV in der Zellkultur untersucht. Durch schrittweise Substitution der Asparagin-Reste zu Glutamin in der Konsensussequenz Asn-x-Thr/Ser (x steht für jede Aminosäure außer Prolin) wurden insgesamt 38 E^{ms}-Mutanten erzeugt, transient in BHK 21-Zellen exprimiert und im Degradationstest enzymatisch erfasst. Vor der Aktivitätsbestimmung wurde die E^{ms}-Konzentration in den Zelllysaten anhand eines E^{ms}-Standards im Sandwich-ELISA bestimmt. Es zeigte sich, dass eine Deletion von mindestens zwei N-Glykosylierungsstellen erforderlich war, bis ein Aktivitätsverlust von ca. 20 % auftrat. Einzig die gleichzeitige Mutation der NGS 5 und 6 führte zu einem Aktivitätsverlust von 50 %. Andererseits waren eine Reihe von E^{ms}-Mutanten, die nur zwei bis fünf der neun potentiellen N-Glykosylierungsstellen enthielten, noch zu 60-80 % aktiv. Hohe enzymatische Aktivität konnte nachgewiesen werden, wenn NGS 1 bzw. NGS 2 und 3 in Verbindung mit NGS 5 (bzw. NGS 6) erhalten waren. So war interessanterweise das alleinige Vorkommen von NGS 1 und 5 im E^{ms} für den Erhalt von ca. 80 % der Enzymaktivität ausreichend. Während das Vorkommen von NGS 2 und 3 in Verbindung mit NGS 5 ebenfalls noch zu 60 % Aktivität führte, waren E^{ms}-Mutanten mit erhaltener NGS 2 und 5 bzw. NGS 3 und 5 inaktiv. Während die Deletion der 5. N-Glykosylierungsstelle in einer E^{ms}-Mutante mit noch insgesamt fünf enthaltenen N-Glykosylierungsstellen (NGS 1/2/3/6/7) durch das Vorkommen der 6. kompensiert werden konnte (~80 % Aktivität), ist dies durch die 4. nicht möglich (~40 % Aktivität). Falls nur noch NGS 1 und 6 erhalten sind, kann NGS 5 nicht durch NGS 6 ersetzt werden (~40 %). Auch ein vollständig N-deglykosyliertes E^{ms} wies keine Aktivität mehr auf.

Mögliche Funktionen der N-Glykosylierung für Proteine sind vielfältig. Neben der Steigerung der Löslichkeit können die Zuckerketten die Immunogenität von Peptidketten reduzieren, indem Epitope abgedeckt werden und für Antikörper unzugänglich sind. Ferner können Zuckerketten als Liganden für Lektine dienen, wie sie auf Zelloberflächen vorhanden sind. Eine neue Hypothese sieht Zuckerketten als assistierende Faktoren bei der Proteinfaltung, wobei ER lokalisierte Chaperone, Calnexin und Calretikulin, spezifisch an N-Glykane binden (z. B. *Helenius et al.*, 2001; *Parodi et al.*, 2000; *Hebert et al.*, 1995). Voraussetzung für eine Bindung an Calnexin und Calretikulin ist das Vorliegen eines Monoglukosids (Glu₁Man₉GlcNc₂). Da unter physiologischen Bedingungen pro N-Glykosylierungsstelle eine unterschiedliche Anzahl an Glukosiden vorliegen, müssen zunächst überzählige Zuckerreste, katalysiert durch Glukosidase I und II, entfernt werden. Die Bindung des Glykoproteins an Calnexin und Calretikulin wird durch die Interaktion eines Co-Chaperons, einer Thiol Oxidoreduktase der Protein Disulfid Isomerase Familie, vervollständigt. Diese Interaktion ermöglicht es der Thiol Oxidoreduktase in die unmittelbare Nähe von Cysteinen zu gelangen

und somit Disulfidbrücken auszubilden. Nachdem die Faltung beendet ist, wird die Dissoziation des Glykoproteins von Calnexin bzw. Calretikulin durch Abspaltung des noch vorhandenen Glukoserestes durch Glukosidase II ermöglicht. Nun unterliegt das Glykoprotein einer Qualitätskontrolle durch die UDP-Glukose-Glykoprotein-Glykosyltransferase, die Zuckerketten und vermutlich auch Peptidstrukturen erkennt. Falls das Glykoprotein zu diesem Zeitpunkt seine korrekte Proteinfaltung erlangt hat, wird es in das nächste Kompartiment (Golgi Apparat) transportiert; falls nicht, wird ein Glukoserest wieder zugeführt, so dass das Glykoprotein erneut von Calnexin und Calretikulin gebunden wird, bis die korrekte Proteinfaltung erreicht ist; oder bei Missfaltung eine Zuführung zum ER assoziierten Degradasom erfolgt.

Um auch den Einfluss der N-Glykosylierung auf die Virusvermehrung zu untersuchen, war es notwendig, zunächst das Asparagin der Konsensussequenz für die N-Glykosylierung in der cDNA eines KSPV's mittels „reverser Genetik“ zu substituieren. Insgesamt wurden zwölf infektiöse Gesamtklone erzeugt, die jeweils Mutationen verschiedener N-Glykosylierungsstellen im E^{ms} aufwiesen. Die Wahl der zu deletierenden N-Glykosylierungsstelle wurde in Anlehnung an einige E^{ms}-Mutanten, die zur Untersuchung der ribonukleolytischen Aktivität dienten, getroffen. Um das Wachstumsverhalten der zwölf KSP Viren vergleichen zu können, wurde nach Bestimmung der spezifischen Infektiosität von allen KSP Viren Wachstumskurven erstellt. Interessanterweise korrelierte die Höhe der erzielten Virustiter für die minimale N-Glykosylierung des E^{ms} (NGS 1 und 5) mit der Ribonukleaseaktivität. Ein KSPV, das nur NGS 1 und 5 im E^{ms} besitzt, weist einen im Vergleich mit dem Wildtyp nur um 20 % verminderten Virustiter auf; die analoge E^{ms}-Mutante war ebenfalls noch zu etwa 80 % enzymatisch aktiv. Da mit einem vollständig N-deglykosylierten E^{ms} keine Viruspartikel gebildet wurden, ist ein minimal glykosyliertes E^{ms} auch für die Vermehrung von KSPV in der Zellkultur essentiell. Während zum Erhalt von 60 % Aktivität NGS 2, 3 und 5 ausreicht, kann das Fehlen von NGS 1 für die Virusvermehrung nicht durch das alleinige Vorkommen von NGS 2 und 3 in Verbindung mit NGS 5 kompensiert werden (~10 % vermehrungsfähig im Vergleich zum Wildtyp). Falls nur NGS 1 im E^{ms} mutiert ist, ist das KSPV noch zu ca. 80 % vermehrungsfähig; nach zusätzlicher Deletion von NGS 4 sind es jedoch nur noch 40 %. Der Virustiter, der 72 h nach Infektion für Gesamtklone mit enthaltener NGS 2 und 5 bzw. NGS 3 und 5 im E^{ms} auftritt, ist wahrscheinlich auf die Bildung von Revertanten zurückzuführen. Da jedoch eine gezielte Erzeugung der Revertanten misslang und nach Wiederholung des Versuchs zu keinem Zeitpunkt infektiöses Virus nachweisbar war, könnte auch eine Kontamination vorliegen.

Interessanterweise ist sowohl für die Virusvermehrung als auch für den Erhalt der ribonukleolytischen Aktivität das alleinige Vorkommen von NGS 1 und 5 im E^{ms} ausreichend. Diese beiden N-Glykosylierungsstellen sind bei allen bisher sequenzierten Pestiviren hoch konserviert, so dass eine Interaktion von NGS 1 und 5 mit Calnexin bzw. Calretikulin wahrscheinlich ist. Da N-Glykosylierung für die Interaktion mit Calnexin und Calretikulin essentiell ist, kann die Deletion von N-Glykosylierungsstellen zum Verlust der Bindung und zur Missfaltung mit Funktionsausfall des betreffenden Proteins führen. Während für BVDV E1 und E2 mittels Immunpräzipitation die Bindung an Calnexin nachgewiesen werden konnte (Branza-Nichita *et al.*, 2001; Durantel *et al.*, 2001), ist eine solche Interaktion der E^{ms}-Mutante mit zwei enthaltenen N-Glykosylierungsstellen (NGS 1 und 5) anhand des Modells dieser Mutante leicht vorstellbar (Abb. 34). Im Modell sind beide N-Glykosylierungsstellen im N-terminalen Bereich um ca. 180° versetzt lokalisiert, wodurch eine Interaktion sowohl mit Calnexin als auch mit Calretikulin ermöglicht wird. Nach Eintreten der Proteinkette in das ER wäre es denkbar, dass das membranständige Calnexin an die zuerst im ER erscheinende weiter N-terminal gelegene NGS 1 bindet, während das im Lumen des ER vorkommende Calretikulin eine Interaktion mit NGS 5 eingeht. Beide Chaperone rekrutieren als Co-Chaperon eine Thiol Oxidoreduktase. Da aufgrund dieser Interaktion die Thiol Oxidoreduktase in unmittelbarer Nähe zu Cysteinen positioniert ist, kann die Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgen. Interessanterweise werden im E^{ms}-Modell Disulfidbrücken in unmittelbarer Nähe zu NGS 1 und 5 gebildet.

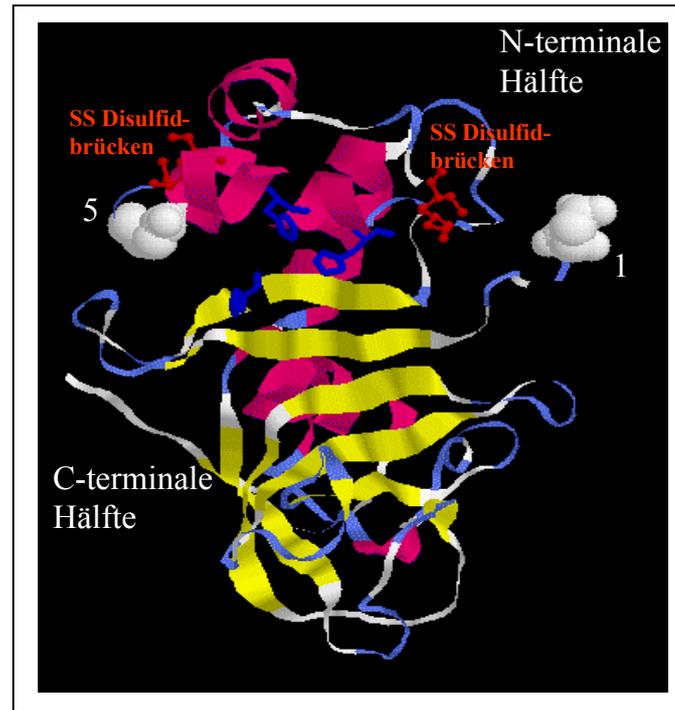


Abb. 34: Lage der essentiellen N-Glykosylierungsstellen im Modell des E^{ms}

Im Modell von E^{ms} sind NGS 1 und 5 (weiße Kugeln) in unmittelbarer Nähe zu möglichen Disulfidbrücken (rot) lokalisiert. Beide N-Glykosylierungsstellen befinden sich um 180° versetzt in der N-terminalen Hälfte, so dass sie Calnexin bzw. Calretikulin binden können. Zur Ausbildung der Disulfidbrücken erfolgt die Rekrutierung des Co-Chaperons, einer Thiol Oxidoreduktase, durch die beiden Chaperone (Text).

Da die essentiellen N-Glykosylierungsstellen nur in der N-terminalen Hälfte lokalisiert sind, ist es wahrscheinlich, dass der für den Erhalt der ribonukleolytischen Aktivität essentielle N-terminale Bereich (E^{ms} 140, s. o.) eine korrekte Faltung einnehmen kann. Da jedoch ebenfalls eine große Anzahl an infektiösen Viruspartikeln gebildet wird (ca. 80 % des Wildtyps), folgt daraus, dass der C-terminale Bereich ebenfalls korrekt gefaltet oder– eher unwahrscheinlich– für die Virusvermehrung nicht notwendig ist.

Die Hypothese, dass eine Interaktion zwischen den ER-assoziierten Chaperonen, Calnexin und Calretikulin, stattfinden muss, wird durch das Ergebnis, dass ein durch Endoglykosidase H Behandlung vollständig deglykosyliertes E^{ms} ribonukleolytisch aktiv ist (*Windisch et al.*, 1996), gestützt. Während durch Endoglykosidase H die Deglykosylierung nach der Proteinexpression erfolgt, d. h. das Protein konnte seine korrekte Faltung einnehmen, ist in der vorliegenden Arbeit durch Mutation der DNA schon vor der Proteinexpression die Deglykosylierung determiniert worden. Somit wird im Gegensatz zur Endoglykosidase H Behandlung eine mögliche Interaktion mit Calnexin und Calretikulin durch vollständige Deglykosylierung unterbunden. Allerdings ist es fraglich, ob bei der hohen Anzahl an N-Glykosylierungsstellen im E^{ms} (7-9) tatsächlich alle N-Glykosylierungsstellen durch

Endoglykosidase H Behandlung deglykosyliert wurden. Fehlende N-Glykosylierung könnte auch die Ursache für die Inaktivität bakteriell exprimierten E^{rms} sein. Im prokaryonten Expressionssystem findet keine N-Glykosylierung statt.

4.4 Fazit

Auch wenn es in dieser Arbeit gelang, die Ribonuklease-Aktivität, hier wiederum insbesondere die Substratspezifität, des E^{rms} näher zu charakterisieren, ist die tatsächliche Funktion des E^{rms} weiterhin unbekannt. Da jedoch E^{rms} keine absolute Spaltspezifität, sondern vielmehr eine bevorzugte Spaltstelle (NpU) besitzt, erfolgt *in vivo* wahrscheinlich eine unspezifische Spaltung von RNA-Molekülen. Für das „virion host shutoff“ (vhs) Protein von α -Herpesviren wurde ein unspezifischer Abbau zellulärer RNA nachgewiesen (z. B. *Übersichtsartikel Klumpp et al., 2001; Smith et al., 2002; Feng et al., 2002*). Das vhs ist eine im Tegument eingelagerte lösliche virale Ribonuklease. Nach Fusion der Virushülle mit der Zellmembran gelangt das vhs in das Zytoplasma der neu infizierten Zelle, wo es mRNAs unspezifisch spaltet. Da kürzlich für E^{rms} eine Translokation in das Zytoplasma von Zellen nachgewiesen wurde (*Langedijk et al., 2001*), ist die zelluläre Aufnahme von E^{rms} denkbar. Wie bereits zuvor erwähnt, ist in der C-terminalen Sequenz von E^{rms} ein Translokationspeptid (aa 194-220 bzw. 191-227) lokalisiert, das Ähnlichkeit mit Mangain und dem L3 Loop des Ribotoxins aufweist, und die Aufnahme von E^{rms} in die Zelle ermöglicht. Da bisher noch kein intrazellulärer RNA-Abbau nachgewiesen wurde, ist geplant, den Abbau in Zellen, die verschiedene E^{rms}-Mutanten konstitutiv exprimieren, aufzuzeigen.

5 Zusammenfassung

Die T2 Ribonuklease E^{ms} ist ein Glykoprotein, das ausschließlich bei Pestiviren vorkommt. Es tritt sowohl als Strukturprotein als auch als sezerniertes Protein in Erscheinung. Während E^{ms} für die Bildung von Viruspartikeln als essentiell beschrieben wurde, ist die Funktion der RNase für den viralen Lebenszyklus sowie die Pathogenese unbekannt. Um die Enzymfunktion von E^{ms} zu analysieren, wurden drei experimentelle Ansätze gewählt: 1. Bestimmung der Substratspezifität, 2. Mutationsanalyse des aktiven Zentrums inklusive Modellierung des Proteins und 3. Einfluss von N-Glykosylierung auf die Enzymaktivität.

- zu 1** Die Spaltspezifität von E^{ms} wurde auf der Grundlage von heteropolymeren RNA-Substraten in limitierenden Verdauen ermittelt. RNA-Fragmente, die nach limitierenden Verdauen durch E^{ms} gebildet wurden, entsprechen einer Spaltung 5' von Uridin ($\text{Np}\downarrow\text{U}$). Für die Untersuchung der NpU Spaltstelle wurden einzelsträngige RNA-Moleküle (45-56 nt) eingesetzt, die sich nur an der N-Position unterscheiden (N= A, C, G oder U). Kinetische Bestimmungen der NpU Spaltung durch E^{ms} ergaben Affinitätskonstanten zwischen 105–250 nM sowie einen geringen Substratumsatz von weniger als einem Molekül Substrat/Molekül Enzym s^{-1} .
- zu 2** Auf der Grundlage der Substratspezifität wurde ein RNase-Test für die Aktivitätsbestimmung von E^{ms} -Mutanten entwickelt. Neben insgesamt 14 Mutationen im Bereich des aktiven Zentrums, die im Wesentlichen die Zugehörigkeit zur T2 RNase Familie bestätigten, wurden auch C-terminale Verkürzungen untersucht. Nach Verkürzung des C-Terminus um 87 Aminosäuren blieb die RNase-Aktivität des E^{ms} erhalten. Dieses Ergebnis ist in Analogie zu einem Modell von E^{ms} , das auf der Grundlage von RNase Rh erstellt wurde. Auch das Modell lässt die Eigenständigkeit einer RNase-Domäne erkennen, die etwa die N-terminale Hälfte des Proteins umfasst (aa 1-103).
- zu 3** Die Anheftung von Zuckermolekülen an die Asparaginreste der N-Glykosylierungsstellen wird durch die Substitution $\text{Asn}\rightarrow\text{Gln}$ verhindert. Nach Substitution einzelner bzw. mehrerer Asparagine wurden insgesamt 38 E^{ms} -Mutanten erzeugt, und die Aktivitäten nach Expression in eukaryonten Zellen bestimmt. Während in Abwesenheit aller N-Glykosylierungsstellen keine RNase-Aktivität mehr nachgewiesen wurde, ist das Vorkommen von zwei N-Glykosylierungsstellen, NGS 1 und 5, für den Erhalt der enzymatischen Aktivität ausreichend. Die gleichen N-Glykosylierungsstellen sind auch für die Vermehrungsfähigkeit von KSPV in revers genetischen Experimenten essentiell.

6 Summary

The T2 ribonuclease E^{ms} is a glycoprotein, which is only present in pestiviruses. E^{ms} is a structural protein and it is also secreted from infected cells. While it is described that E^{ms} is essential for the formation of viral particles, the function of the RNase-activity for the viral lifecycle or pathogenesis is unknown.

To analyze the enzymatic function of E^{ms} , three different experimental approaches were chosen: 1st determination of the substrate specificity, 2nd mutagenesis-studies with respect to the active site including modelling of E^{ms} and 3rd influence of N-glycosylation on enzyme activity.

- 1st To detect the cleavage specificity of E^{ms} a limited digest of heteropolymeric RNA-substrates was performed. Under suboptimal conditions E^{ms} cleaves exclusively phosphodiesterbonds 5' of uridine bases ($\text{Np}\downarrow\text{U}$). To analyze the NpU cleavage site, single stranded RNA molecules of 45-56 nts were synthesized. These substrates only differ in the base at the N-position ($\text{N} = \text{A, C, G}$ oder U). Kinetic parameters of the NpU cleavage for all four substrates revealed K_m values of 105–250 nM and a low turn over rate (less than one molecule substrate/molecule enzyme s^{-1}).
- 2nd Based on the substrate specificity an RNase-assay was established, which allow the precise determination of the RNase-activity of various E^{ms} -mutants. The results of 14 mutants with single amino acid exchanges in the active center mainly conformed the integration of E^{ms} into the family of T2 RNases. In addition E^{ms} was C-terminal truncated and the RNase-activity was measured. The deletion of 87 C-terminal amino acids still led to an active RNase. These results conformed a model of E^{ms} , which was designed based on the crystal structure of the T2 RNase Rh. According to the 3-D structure the N-terminal half of the protein forms an independent RNase domain (aa 1-103).
- 3rd Asn→Gln substitution abolishes the linkage of sugar molecules to the asparagine residue of N-glycosylation sites. Substitution of single, double or multiple asparagine residues resulted in 38 E^{ms} -mutants. The E^{ms} -mutants were expressed in eucaryotic cells and the RNase-activity was analyzed. While the deletion of all N-glycosylation sites led to an inactive enzyme, a minimal set of two N-glycosylation sites, NGS 1 and 5, turned out to be sufficient for RNase-activity. In a reverse genetic system the same minimal set was also essential for the detection of CSFV.

7 Literaturverzeichnis

Avalos-Ramirez, R., M. Orlich, M., Thiel, H.-J., and Becher, P. (2001); Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* **286**, 456-465.

Becher, P., Orlich, M., Kosmidou, A., König M., Baroth, M., and Thiel, H.-J. (1999); Genetic diversity of pestiviruses: identification of novel groups and implications for classification. *Virology* **262**, 64-71.

Becher, P., Orlich, M., and Thiel, H.-J. (1998); Complete genomic sequence of border disease virus, a pestivirus from sheep. *J. Virol.* **72**, 5165-5173.

Becher, P., Orlich, M., Shannon, A. D., Horner, G., König M., and Thiel, H.-J. (1997); Phylogenetic analysis of pestiviruses from domestic and wild ruminants. *J Gen Virol* **78**, 1357-1366.

Behrens, S.-E., Grassmann, C. W., Thiel, H.-J., Meyers, G., and Tautz, N. (1998); Characterization of an Autonomous Subgenomic Pestivirus RNA Replicon. *J. Virol.* **72**, 2364-2372.

Branza-Nichita, N., Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Dwek, R. A., and Zitzmann, N. (2001); Antiviral effect of N-Butyldeoxynojirimycin against bovine viral diarrhea virus correlates with misfolding of E2 envelope proteins and impairment of their association into E1-E2 heterodimers. *J. Virol.* **75**, 3527-3536.

Bruschke, C. J. M., Hulst, M. M., Moormann, R. J. M., van Rijn, P. A., and van Oirschot, J. T. (1997); Glycoprotein E^{ms} of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. *J. Virol.* **71**, 6692-6696.

Cannistraro, V. J. & D. Kennell (2001); Escherichia coli ribonuclease II. *Methods Enzymol* **342**, 309-330.

Collett, M. S., Larson, R., Gold, C., Strick, D., Anderson, D. K., and Purchio, A. F. (1988a); Molecular cloning and nucleotide sequence of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **165**, 191-199.

Collett, M. S., Larson, R., Belzer, S. K., and Retzel, E. (1988b); Proteins encoded by bovine viral diarrhea virus: the genomic organization of a pestivirus. *Virology* **165**, 200-208.

Collett, M. S., Anderson, D. K., and Retzel E. (1988c); Comparison of the pestivirus bovine viral diarrhea virus with members of the flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **69**, 2637-2643.

Collett, M. S., Wiskerchen, M., Welniak, E., and Belzer, S. K. (1991); Bovine viral diarrhea virus genomic organization. *Arch. Virol. Suppl.* **3**, 19-27.

D'Alessio, G., A. Di Donato, et al. (1991); Seminal RNase: a unique member of the ribonuclease superfamily. *Trends Biochem Sci* **16**, 104-106.

- Deng, R. & Brock, K. V.** (1992); Molecular cloning and nucleotide sequence of a pestivirus genome, noncytopathic bovine viral diarrhea virus strain SD-1. *Virology* **191**, 867-869.
- Deutscher, M. P.** (1993); Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity. *J. Biol. Chem.* **268**, 13011-13014.
- Dubuisson, J. & Rice, C. M.** (1996); Hepatitis C virus glycoprotein folding: disulfide bond formation and association with calnexin. *J. Virol.* **70**, 778-786.
- Dunne, H. W.** (1973); Hog cholera (European swine fever). *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* **17**, 315-359, review.
- Durantel, D.** (2001); Study of the mechanism of antiviral action of iminosugar derivatives against bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **75**, 8987-8998.
- Edwards, S., Fukusho, A., Lefèvre, P. C., Lipowski, A., Pejsak, S., Roehle, P., and Westergaard, J.** (2000); Classical swine fever: the global situation. *Vet. Microbiol.* **73**, 103- 119.
- Elbers, K., Tautz, N., Becher, P., Stoll, D., Rümenerpf, T., and Thiel, H.-J.** (1996); Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7. *J. Virol.* **70**, 4131-4135.
- Ellgaard, L. & Helenius, A.** (2001); ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 431-437.
- Enzmann, P. J. & Weiland, F.** (1978); Structural similarities of hog cholera virus with togaviruses. *Arch. Virol.* **57**, 339-348.
- Fantini, J., Maresca, M., Hammache, D., Yahi, N., and Delezay, O. M.** (2000), Glycosphingolipid (GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells: activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconj J* **17**, 173-179.
- Feng, P., Everly, D. N. Jr, and Read G. S. D.** (2001), mRNA decay during herpesvirus infections: interaction between a putative viral nuclease and a cellular translation factor. *J Virol* **75**, 10272-10280.
- Harada, T., Tautz, N., and Thiel, H.-J.** (2000); E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J. Virol.* **74**, 9498-9506.
- Harlow, E. & Lane, D.** (1988); In: *Antibodies, a laboratory manual*. Cold spring harbour laboratory press, New York
- Hayano, K., Iwama, M., Sakamoto, H., Watanabe, H., Sanda, A., Ohgi, K., and Irie, M. M.** (1993); Characterization of poly C preferential ribonuclease from chicken liver. *J Biochem (Tokyo)* **114**, 156-162.

- Hebert, D. N.**, Foellmer, B., and Helenius A. B. (1995); Glucose trimming and reglucosylation determine glycoprotein association with calnexin in the endoplasmic reticulum. *Cell* **81**, 425-433.
- Heinz, F. X.**, Collett, M. S., Purcell, R. H., Gould, E. A., Howard, C. R., Houghton, M., Moormann, R. J. M., Rice, C. M., and Thiel, H.-J. (2000); Family Flaviviridae. In "Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, Eds.), 859-878. Academic Press, San Diego
- Helenius, A. & Aebi, M.** (2001); Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* **291**, 2364-2369
- Horzinek, M.**, Reczko, E., and Petzoldt, K. (1967); On the morphology of hog cholera virus. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **21**, 475-478.
- Horzinek, M.**, Maess, J., and Laufs, R. (1971); Studies on the substructure of togaviruses. II. Analysis of equine arteritis, rubella, bovine viral diarrhoea, and hog cholera viruses. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **33**, 306-318.
- Hulst, M. M.**, Westera, D. F., Wensvoort, G., and Moormann, R. J. M. (1993); Glycoprotein E1 of hog cholera virus expressed in insect cells protects swine from hog cholera. *J. Virol.* **67**, 5435-5442.
- Hulst, M. M.**, Himes, G., Newbigin, E., and Moormann, R. J. M. (1994); Glycoprotein E2 of classical swine fever virus: expression in insect cells and identification as a ribonuclease. *Virology* **200**, 558-565.
- Hulst, M. M. & Moormann, R. J.** (1997); Inhibition of pestivirus infection in cell culture by envelope proteins E^{ms} and E2 of classical swine fever virus: E^{ms} and E2 interact with different receptors. *J. Gen. Virol.* **78**, 2779-2787.
- Hulst, M. M.**, Panoto, F. E., Hoekman, H. G. P., van Gennip, H. G. P., and Moormann, R. J. M. (1998); Inactivation of the RNase activity of glycoprotein E^{ms} of classical swine fever virus results in a cytopathogenic virus. *J. Virol.* **72**, 151-157.
- Hulst, M. M.**, van Gennip, H. G. P., Vlot, A. C., Schooten, E., Smit, A. J., and Moormann, R. J. M. (2001); Interaction of classical swine fever virus with membrane-associated heparan sulfate: role for virus replication in vivo and virulence. *J. Virol.* **75**, 9585-9595.
- Hulst, M. M. & Moormann, R. J.** (2001); E^{ms} protein of pestiviruses, pp. 431-440 in *Methods and Enzymology*, volume 342, Ribonucleases part B, Nicholson, A. W. (Ed), Academic Press, USA.
- Ida, K.**, Norioka, S., Yamamoto, M., Kumasaka, T., Yamashita, E., Newbigin, E., Clarke, A. E., Sakiyama, F., and Sato, M. (2002); The 1.55 Å resolution structure of *Nicotiana glauca* S_{F11}-RNase associated with Gametophytic Self-incompatibility. *J. Mol. Biol.* **314**, 5127-5136.
- Iqbal, M.**, Flick-Smith, H., and McCauley, J. (2000); Interactions of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E^{ms} with cell surface glycosaminoglycans. *J. Gen. Virol.* **81**, 451-459.

- Inokuchi, N.**, Koyama, T., Sawada, F., and Irie, M. (1993); Purification, some properties, and primary structure of base non-specific ribonucleases from *Physarum polycephalum*. *J. Biochem.* **113**, 425-432.
- Irie, M.**, Watanabe, H., Ohgi, K., Minami, Y., Yamada, H. and Funatsu, G. (1993); Base specificity of two plant seed ribonucleases from *Momordica charantia* and *Luffa cylindrical*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **57**, 497-498.
- Irie, M.**, Ohgi, K., Watanabe, H., Iwama, M., Nakamura, K. T., Kurihara, H., Nonaka, T., Mitsui, Y., Horiuchi, H., and Takagi, M. (1994); pH profile of kinetic constants of RNase Rh from *Rhizopus niveus* and its mutant enzymes towards UpU, and possible mechanisms of RNase Rh. *J. Biochem.* **115**, 1083-1087.
- Irie, M.** (1997); RNase T2 Family RNases, pp.109-124 in *Ribonucleases structures and functions*, D'Alesio, G., Riordan, J. F.(Eds), Academic Press, USA.
- Irie, M. & Ohgi, K.** (2001); Ribonuclease T2, pp. 42-56 in *Methods and Enzymology*, volume **341**, Ribonucleases part A, Nicholson, A. W. (Ed), Academic Press, USA.
- Kanjanahaluethai, A. & S. C. Baker** (2000); Identification of mouse hepatitis virus papain-like proteinase 2 activity. *J Virol* **74**, 7911-7921.
- Kawata, Y.**, Sakiyama, F., Hayashi, F., and Kyogoku, Y. (1990); Identification of two essential histidine residues of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur. J. Biochem.* **187**, 255-262.
- Klumpp, K.**, Hooker, L., and Handa, B. L. (2001); Influenza virus endoribonuclease. *Methods Enzymol* **342**, 451-466.
- König, M.**, Lengsfeld, T., Pauly, T., Stark, R., and Thiel, H.-J. (1995); Classical Swine Fever Virus: independent induction of protective immunity by two structural glycoproteins. *J. Virol.* **69**, 6479-6486.
- Kurihara, H.**, Nonaka, T., Mitsu, Y., Ohgi, K., Irie, M., and Nakamura, K. T. (1996); The crystal structure of ribonuclease Rh from *Rhizopus niveus* at 2,0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **255**, 310-320.
- Kümmerer, B. M.**, Stoll, D., and Meyers, G. (1998); Bovine Viral Diarrhea Virus strain Oregon: a novel mechanism for processing of NS2-3 based on point mutations. *J. Virol.* **72**, 4127-4138.
- Kümmerer, B.M. & G. Meyers** (2000); Correlation between point mutations in NS2 and the viability and cythpathogenicity of bovine viral diarrhea virus strain Oregon analyzed with an infectious cDNA clone. *J. Virol.* **74**, 390-400.
- Laemmli, U.K.** (1970); Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Langedijk, J. P. M.** (2001); Translocation activity of C-terminal domain of pestivirus E^{ms} and ribotoxin L3 loop. *J. Biol. Chem.* **277**, 5308-5314.

- Leahy, M. B.**, Pritlove, D. C., Poon, L.L., and Brownlee G. G. D. (2001); Mutagenic analysis of the 5' arm of the influenza A virus virion RNA promoter defines the sequence requirements for endonuclease activity. *J Virol* **75**, 134-142.
- Li, M. L.**, Rao, P., and Krug, R. M. (2001); The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *Embo J* **20**, 2078-2086.
- Lim, K. P.**, NG, L. F. P., and Liu, D. X. (2000); Identification of a novel cleavage site of the first papain-like proteinase domain encoded by open reading frame 1a of the coronavirus *Avian Infectious Bronchitis Virus* and characterization of the cleavage products. *J. Virol.* **74**, 1674-1685.
- Lineweaver, H. & Burk, D.** (1934); The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* **76**, 658-666.
- Liu, N. Q.**, A. S. Lossinsky, et al. (2002), Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* **76**, 6689-6700.
- Lo, S.-J.**, Selby, M. J., and Ou, J.-H. (1996); Interaction between Hepatitis C Virus core protein and E1 envelope protein. *J. Virol.* **70**, 5177-5182.
- Matton, D. P.**, Nass, N., Clarke, A. E., and Newbiggin E. (1994); Self-incompatibility: how plants avoid illegitimate offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 1992-1997.
- Matsuura, T.**, Sakai, H., Unno, M., Ida, K., Sato, M., Sakiyama, F., and Norioka, S. (2001); Crystal structure at 1,5-Å resolution of *Pyrus pyrifolia* pistil ribonuclease responsible for gametophytic self-incompatibility. *J. Biol. Chem.* **276**, 45261-45269.
- McClure, B. C.**, Haring, V., Ebert, P. R., Anderson, M. A., Simpson, R. J., Sakiyama, F., and Clarke, A. E. (1989); Style self-incompatibility gene products of *Nicotia glauca* are ribonucleases. *Nature* **342**, 955-957.
- Meador, J. & Kennell, D.** (1990); Cloning and sequencing the gene encoding *Escherichia coli* ribonuclease I: exact physical mapping using the genome library. *Gene* **95**, 1-7.
- Mendez, E.**, Ruggli, N., Collett, M. S., and Rice, C. M. (1998); Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cythogenicity. *J. Virol.* **72**, 4737-4745.
- Meyers, G.**, Rügenapf, T., and Thiel, H.-J. (1989); Molecular cloning and nucleotide sequence of the genome of hog cholera virus. *Virology* **171**, 555-567.
- Meyers, G.**, Thiel, H.-J., and Rügenapf, T. (1996a); Classical Swine Fever Virus: recovery of infectious viruses from cDNA constructs and generation of recombinant cytopathogenic defective interfering particles. *J. Virol.* **70**, 1588-1595.
- Meyers, G.**, Tautz, N., Becher, P., Thiel, H.-J., and Kümmerer, B. M. (1996b); Recovery of cytopathogenic and noncytopathogenic bovine viral diarrhea viruses from cDNA constructs. *J. Virol.* **70**, 8606-8613.

- Meyers, G. & Thiel, H.-J.** (1996); Molecular characterization of pestiviruses. *Adv. Virus. Res.* **47**, 53-118, review.
- Meyers, G., Saalmüller, A., and Büttner, M.** (1999); Mutations abrogating the RNase activity in glycoprotein E^{ms} of the pestivirus classical swine fever virus lead to virus attenuation. *J. Virol.* **73**, 10224-10235.
- Milligan J. F., Groebe D. R., Witherell G. W., and Uhlenbeck O. C.** (1987); Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res* **14**, 8783-8798.
- Moennig, V. & Plagemann, P. G.** (1992); The pestiviruses. *Adv. Virus Res.* **41**, 53-98, review.
- Moennig, V.** (2000); Introduction to classical swine fever: virus, disease and control policy. *Vet. Microbiol.* **73**, 93-102.
- Moormann, R. J., Warmerdam, P. A., van der Meer, B., and Hulst, M. M.** (1990); Nucleotide sequence of hog cholera virus RNA: properties of the polyprotein encoded by the open reading frame spanning the viral genomic RNA. *Vet. Microbiol.* **23**, 185-191.
- Moormann, R. J., Warmerdam, P. A., van der Meer, B., Hulst, M. M., and van Rijn, P. A.** (1996); Infectious RNA transcribed from an engineered full-length cDNA template of the genome of a pestivirus. *J. Virol.* **70**, 763-770.
- Nicholson A. W.** (1999); function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 371-390.
- Numata, T., Suzuki, A., Yao, M., Tanaka, I., and Kimura, M. A.** (2001), Amino acid residues in ribonuclease MC1 from bitter melon seeds which are essential for uridine specificity. *Biochemistry* **40**, 524-530.
- Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., and Irie, M.** (1992); Evidence that three histidine residues of a base non-specific and adenylic acid preferential ribonuclease from *Rhizopus niveus* are involved in the catalytic function. *J. Biochem.* **112**, 132-138.
- Ohgi, K., Horiuchi, H., Watanabe, H., Iwama, M., Takagi, M., and Irie, M.** (1993); Role of Asp51 and Glu105 in the enzymatic activity of a ribonuclease from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.* **113**, 219-224.
- Ohgi, K., Iwama, M., Tada, K., Takizawa, R., and Irie, M.** (1994); Role of Lys108 in the enzymatic activity of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.* **117**, 27-33.
- Ohgi, K., Takeuchi, M., Iwama, M., and Irie, M.** (1996); Enzymatic properties of mutant enzymes at Trp49 and Tyr57 of RNase Rh from *Rhizopus niveus*. *J. Biochem.* **119**, 9-15.
- Parodi, A. J.** (2000); Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 69-93.

- Pellerin, C.**, van den Hurk, J., Lecomte, J., and Tussen, P. (1994); Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology* **203**, 260-268.
- Poole, T. L.**, Wang, C., Popp, R. A., Potgieter, L. N., Siddiqui, A., and Collett, M.S. (1995); Pestivirus translation initiation occurs by internal ribosome entry. *Virology* **206**, 750-754.
- Purchio, A. F.**, Larson, R., and Collett, M. S. (1983); Characterization of virus-specific RNA synthesized in bovine cells infected with bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **48**, 320-324.
- Rice, C. M.** (1996). Flaviviridae: The viruses and their replication, pp. 931-959; in Fields, B. N., Kneipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*, 3. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Ridpath, J. F.**, Bolin, S. R., and Dubovi, E. J. (1994); Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes. *Virology* **205**, 66-74.
- Ridpath, J. F. & Neill J. D.** (2000); Detection and characterization of genetic recombination in cytopathic type 2 bovine viral diarrhea viruses. *J. Virol.* **74**, 8771-8774.
- Rinck, G.**, Birghan, C., Harada, T., Meyers, G., Tautz, N., and Thiel, H.-J (2001); A cellular J-domain protein modulates polyprotein processing and cytopathogenicity of a pestivirus. *J. Virol.* **75**, 9470-9482.
- Rijnbrand, R.**, van der Straaten, T., van Rijn, P. A., Spaan, W. J., and Bredenbeek, P. J. (1997); Internal entry of ribosomes is directed by the 5' noncoding region of classical swine fever virus and is dependent on the presence of an RNA pseudoknot upstream of the initiation codon. *J. Virol.* **71**, 451-457.
- Ruggli, N.**, Tratschin, J. D., Mittelholzer, C., and Hofmann, M. A. (1996); Nucleotide sequence of classical swine fever virus strain Alfort/187 and transcription of infectious RNA from stably cloned full-length cDNA. *J Virol* **70**, 3478-3487.
- Rümenapf, T.**, Stark, R., Meyers, G. and Thiel, H.-J. (1991); Structural proteins of hog cholera virus expressed by vaccinia virus: further characterization and induction of protective immunity. *Virology* **65**, 589-597.
- Rümenapf, T.**, Unger, G., Strauss, J. H., and Thiel, H.-J. (1993); Processing of the envelope glycoproteins of pestiviruses. *J. Virol.* **67**, 3288-3294.
- Rümenapf, T.**, Stark, R., Heimann, M., and Thiel, H.-J. (1998); N-terminal protease of pestiviruses: identification of putative catalytic residues by site-directed mutagenesis. *J. Virol.* **72**, 2544-2547.
- Rybak, S. M. & Vallee B. L.** (1988); Base cleavage specificity of angiogenin with *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* 5S RNAs. *Biochemistry* **27**, 2288-2294.
- Saatkamp, H. W.**, Berentsen, P. B. M., and Horst, H. S. (2000); Economic aspects of the control of classical swine fever outbreaks in the European Union. *Vet. Microbiol.* **73**, 221-237.

- Sambrook, J.**, Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989); Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.**, Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977); DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Schelp, C.**, Greiser-Wilke, I., Wolf, G., Beer, M., Moennig, V., and Liess, B. (1995); Identification of cell membrane proteins linked to susceptibility to bovine viral diarrhea virus infection. *Arch. Virol.* **140**, 1997-2009.
- Schneider, R.**, Unger, G., Stark, R., Schneider-Scherzer, E., and Thiel, H.-J. (1993); Identification of a structural glycoprotein of an RNA virus as a ribonuclease. *Science* **261**, 1169-1171.
- Smith, T. J.**, Morrison, L. A., and Leib, D. A. (2002); Pathogenesis of herpes simplex virus type 2 virion host shutoff (vhs) mutants. *J Virol* **76**, 2054-2061.
- Stark, R.**, Meyers, G., Rumenapf, T., and Thiel, H.-J. (1993); Processing of pestivirus polyprotein: cleavage site between autoprotease and nucleocapsid protein of classical swine fever virus. *J. Virol.* **67**, 7088-7095.
- Steffens, S.**, Thiel, H. J., and Behrens, S.-E. (1999), The RNA-dependent RNA polymerases of different members of the family Flaviviridae exhibit similar properties in vitro. *J Gen Virol* **80**, 2583-2590.
- Susa, M.**, König, M., Saalmüller, A., Reddehase, M. J., and Thiel, H.-J. (1992); Pathogenesis of classical swine fever: B-lymphocyte deficiency caused by hog cholera virus. *J. Virol.* **66**, 1171-1175.
- Suzuki, A.**, Yao, M., Tanaka, I., Numata, T., Kikukawa, S., Yamasaki, N., and Kimura, M. (2000); Crystal structures of the ribonuclease MC1 from bitter melon seeds, complexed with 2'-UMP or 3'-UMP, reveal structural basis for uridine specificity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **275**, 572-576.
- Tamura, J. K.**, Warrenner, P., and Collett, M. S. (1993); RNA-stimulated NTPase activity associated with the p80 protein of the pestivirus bovine viral diarrhea virus. *Virology* **193**, 1-10.
- Tanaka, N.**, Arai, J., Inokuchi, N., Koyama, T., Ohgi, K., Irie, M., and Nakamura, K. T. (2000); Crystal structure of a plant ribonuclease, RNase LE. *J. Mol. Biol.* **298**, 859-873.
- Tautz, N.**, Meyers, G., Stark, R., Dubovi, E. J., and Thiel, H.-J. (1996); Cytopathogenicity of a pestivirus correlated with a 27-nucleotide insertion. *J. Virol.* **70**, 7851-7858.
- Tautz, N.**, Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1997); Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites. *J. Virol.* **71**, 5415-5422.
- Tautz, N.**, Harada, T., Kaiser, A., Rinck, G., Behrens, S.-E., and Thiel, H.-J. (1999); Establishment and characterization of cytopathogenic and noncytopathogenic pestivirus replicons. *J. Virol.* **73**, 9422-9432.

- Tautz, N.**, Kaiser, A., and Thiel, H.-J. (2000); NS3 serine protease of bovine viral diarrhoea virus: characterization of active site residues, NS4A cofactor domain, and protease-cofactor interactions. *Virology* **273**, 351-363.
- Thiel H.-J.**, Stark, R., Weiland, E., Rügenapf, T., and Meyers, G. (1991); Hog cholera virus: molecular composition of virions from a pestivirus. *J. Virol.* **65**, 4705-4712.
- Thiel H.-J.**, Plagemann, P. W. G., and Moennig, V. (2001). Pestiviruses, pp. 1016-1022; in Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M. (Eds). *Fields Virology*, 4. Ausgabe. Lippincott-Raven, Philadelphia.
- Tijssen, P.**, Pellerin, C., Lecomte, J., and van den Hurk, J. (1996); immunodominant E2 (gp53) sequence of highly virulent bovine viral diarrhoea group II viruses indicate a close resemblance to a subgroup of border disease viruses. *Virology* **217**, 356-361.
- Tsukiyama-Kohara, K.**, Iizuka, N., Kohara, M., and Nomoto, A. (1992); Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.* **66**, 1476-1483.
- Vassilev, V. B.**, Collett, M. S., and Donis, R. O. (1997); Authentic and chimeric full-length genomic cDNA clones of bovine viral diarrhoea virus that yield infectious transcripts. *J Virol* **71**, 471-478.
- Vidovic, V.** (1997); Molekulare Charakterisierung des aktiven Zentrums der pestiviralen RNase E^{rns}. Diplomarbeit des Fachbereichs für Biologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen
- Warrener, P. & Collett, M. S.** (1995); Pestivirus NS3 (p80) protein possesses RNA helicase activity. *J. Virol.* **69**, 1720-1726.
- Watanabe, H.**, Sugiyama, K., Iwama, M., Futaki, R., and Irie, M. (1983); Modification of a major ribonuclease from *Aspergillus satoii* with 1-Cyclohexyl-3-(2-Morpholinyl-(4)-Ethyl) Carbodiimide. *J. Biochem.* **94**, 63-70.
- Weidman, M. K.**, P. Yalamanchili, et al. (2001); Poliovirus 3C protease-mediated degradation of transcriptional activator p53 requires a cellular activity. *Virology* **291**, 260-271.
- Weiland, E.**, Stark, R., Haas, B., Rügenapf, T., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1990); Pestivirus glycoprotein which induces neutralizing antibodies forms part of a disulfide-linked heterodimer. *J. Virol.* **64**, 3563-3569.
- Weiland, E.**, Ahl, R., Stark, R., Weiland, F., and Thiel, H.-J. (1992); A second envelope glycoprotein mediates neutralization of a pestivirus, hog cholera virus. *J. Virol.* **66**, 3677-3682.
- Weiland, F.**, Weiland, E., Unger, G., Saalmüller, A., and Thiel, H.-J. (1999); Localization of pestiviral envelope proteins E^{rns} and E2 at the cell surface and on isolated particles. *J. Gen. Virol.* **80**, 1157-1165.

- Wengler, G.**, Bradley, D. W., Collett, M. S., Heinz, F.H., Schlesinger, R. W., and Strauss, J. H. (1995) Flaviviridae. In F.A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A.W. Jarvis, G. P. Martelli, M.A. Mayo, and M.D. Summers (Eds.). Virus Taxonomy. Sixth Report on the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer Verlag, Wien, New York.
- Widjojoatmodjo, M. N.**, van Gennip, H. G. P., Bouma, P. A., van Rijn, P. A., and Moormann, R. J. M. (2000); Classical Swine Fever Virus E^{rms} deletion mutants: trans-complementation and potential use as nontransmissible, modified, live-attenuated marker vaccines. *J. Virol.* **74**, 2973-2980.
- Windisch, J. M.**, Schneider, R., Stark, R., Weiland, E., Meyers, G., and Thiel, H.-J. (1996); RNase of classical swine fever virus: biochemical characterization and inhibition by virus-neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.* **70**, 352-358.
- Wiskerchen, M.**, Belzer, S. K., and Collett, M. S. (1991); Pestivirus gene expression: the first protein product of the bovine viral diarrhea virus large open reading frame, p20, possesses proteolytic activity. *J. Virol.* **65**, 4508-4514.
- Wiskerchen, M. & Collett, M. S.** (1991); Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus NS3 serine protease: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312-5322.
- Wu, Y. N.**, Mikulski, S. M., Ardelt, W., Rybak, S. M., and Youle, R. J. (1993); A cytotoxic ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **268**, 10686-10693.
- Xu, J.**, Mendez, E., Caron, P. R., Lin, C., Murcko, M. A., Collett, M. S., and Rice, C. M. (1997); Bovine Viral Diarrhea Virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication. *J. Virol.* **71**, 5312-5322.
- Xue, W. & Minocha, C.** (1993) ; Identification of the cell surface receptor for bovine viral diarrhea virus by using anti-idiotypic antibodies. *J. Gen. Virol.* **74**, 73-79.
- Yu, H.**, Grassmann, C. W., and Behrens, S. E. (1999); Sequence and structural elements at the 3' terminus of bovine viral diarrhea virus genomic RNA: functional role during RNA replication. *J. Virol.* **73**, 3638-3648.
- Zhong, W.**, Gutshall, L. L., and Del Vecchio, A. M. (1998); Identification and characterization of an RNA-dependent RNA polymerase activity within the nonstructural protein 5B region of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol.* **72**, 9365-9369.
- Zuo, Y. & Deutscher, M. P.** (2002); The physiological role of RNase T can be explained by its unusual substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **5**, 5.