

**Analyse der Replikationsfähigkeit des Mengovirus in Abhängigkeit von  
Mutationen der Glycyl-transfer-Ribonukleinsäure-Synthetase-Bindestelle  
in der 3'-nicht-translatierten-Region**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von **Selena Angela Fuchshuber, geb. Guggenberger**

aus Lich

Gießen (2025)

**Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Biochemisches Institut**

Gutachter: Apl. Prof. Dr. Michael Niepmann

Gutachter: Prof. Dr. Ziebuhr

Tag der Disputation: 21.11.2025

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>- 1 -</b>
1.1	Das Mengovirus	- 1 -
1.2	Virale Genomorganisation und exprimierte Proteine	- 2 -
1.3	Replikationszyklus	- 7 -
1.4	Die Glycyl-tRNA-Synthetase	- 10 -
1.5	Zielsetzung der Arbeit	- 14 -
<b>2</b>	<b>Materialien</b>	<b>- 16 -</b>
2.1	Materialien und Geräte	- 16 -
2.2	Chemikalien	- 17 -
2.3	Lösungen	- 19 -
2.4	Puffer	- 19 -
2.4.1	Allgemein	- 19 -
2.4.2	Gelelektrophorese	- 21 -
2.4.3	Probenpuffer für Nukleinsäuren	- 21 -
2.4.4	Puffer für Elektroporation	- 22 -
2.4.5	Probenpuffer für Proteine	- 23 -
2.4.6	Puffer für SDS-Page	- 23 -
2.4.7	Puffer für Western Blot	- 24 -
2.5	Enzyme	- 25 -
2.6	Kit-Systeme	- 25 -
2.7	Nukleotide	- 25 -
2.8	Antikörper	- 26 -
2.9	Bakterienstämme	- 26 -
2.10	Plasmide	- 26 -
2.11	Marker	- 27 -
2.12	Zelllinien	- 27 -
2.13	Kulturmedien	- 28 -
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>- 29 -</b>
3.1	Zellbiologische Methoden	- 29 -
3.1.1	Auftauen von Zellen	- 29 -
3.1.2	Einfrieren von Zellen	- 30 -
3.1.3	Kultivierung von eukaryotischen Zellen	- 30 -
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer	- 31 -
3.1.5	Elektroporation	- 31 -
3.1.6	Lipofektion	- 32 -
3.1.7	Infektionsreihe	- 33 -
3.1.8	Polymerüberschichtung	- 33 -

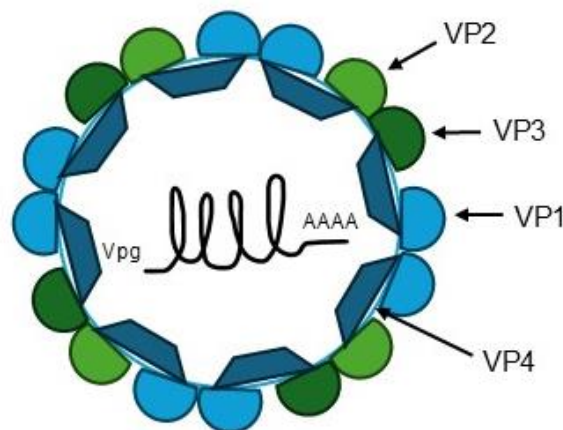
3.1.9	Plaque Assay.....	- 34 -
3.2	Sequenzierung der Plasmid-DNA.....	- 35 -
3.3	Mikrobiologische Methoden.....	- 36 -
3.3.1	Bakterienkultivierung.....	- 36 -
3.3.2	Standard Transformation.....	- 36 -
3.3.3	Kultivieren der Bakterien im Flüssigmedium.....	- 37 -
3.3.4	Plasmid-DNA-Maxipräparation.....	- 37 -
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	- 39 -
3.4.1	Verdau mit Restriktionsenzymen der Plasmid-DNA.....	- 39 -
3.4.2	Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung.....	- 40 -
3.4.3	Transkription – <i>in vitro</i> .....	- 41 -
3.4.4	Verdau mit DNase I.....	- 42 -
3.4.5	Nachweis von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese.....	- 42 -
3.4.6	Fluorometrische Bestimmung der Konzentration mittels Qubit®.....	- 43 -
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	- 44 -
3.5.1	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.....	- 44 -
3.5.2	Luciferase Assay mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System.....	- 48 -
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>- 51 -</b>
4.1	Herstellen der MV-RNA.....	- 51 -
4.2	Nachweis der Produktion von viralen Partikeln in HeLa-Zellen.....	- 53 -
4.2.1	Plaque Assays mit Mengoviren.....	- 54 -
4.2.2	Proteinbiochemischer Nachweis der 3D Pol mittels Western Blot.....	- 62 -
4.2.3	Lumineszenznachweis mittels HiBiT-Tags (Luciferase Assay). -	64 -
4.3	Lumineszenznachweis von replikationsunfähigen Konstrukten.....	- 67 -
4.4	Nachweis der Produktion von viralen Partikeln in neuronalen Zelllinien.....	- 73 -
4.4.1	Plaque Assay mit SK-N-AS-Zellen.....	- 74 -
4.4.2	Lumineszenznachweis SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen.....	- 79 -
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>- 88 -</b>
5.1	Methodische Diskussion.....	- 88 -
5.1.1	Einfluss der Transfektion auf die Infektion.....	- 88 -
5.1.2	Inhibitionsfaktoren im Agar verhindern die Plaque-Entstehung -	89 -
5.1.3	Fragliches Plateau des Luminometers.....	- 90 -
5.2	Limitationen.....	- 91 -
5.2.1	GARS-Bindung hat positiven Einfluss auf die Virusproduktion -	91 -
5.2.2	GARS-Bindung beeinflusst Translation.....	- 93 -
5.2.3	Neuroblasten der Maus zeigen größere Virusproduktion als menschliche Neuroblasten.....	- 97 -

5.3	Ausblick.....	- 101 -
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>- 103 -</b>
<b>7</b>	<b>Summary .....</b>	<b>- 104 -</b>
<b>8</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>- 105 -</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>- 109 -</b>
<b>10</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>- 115 -</b>
10.1	Plasmidkarten .....	- 115 -
10.1.1	MV-Wildtyp.....	- 115 -
10.1.2	MV-3'-UTR-Mutante .....	- 116 -
10.1.3	MV mit HiBiT.....	- 117 -
<b>11</b>	<b>Publikationsverzeichnis .....</b>	<b>- 118 -</b>
11.1	International Peer Review Journals.....	- 118 -
11.2	Konferenz Beiträge.....	- 118 -
<b>12</b>	<b>Erklärung zur Dissertation .....</b>	<b>- 119 -</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>- 120 -</b>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Mengovirus

Das Mengovirus (MV) gehört zur Familie der *Picornaviridae* (lat. *pico* „klein“, RNA = Ribonukleinsäure) und zur Gattung der *Cardioviren*. Zu den *Cardioviren* zählen auch das Enzephalomyokarditis Virus (EMCV) und das Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV). Das Genom des MV besteht aus einer 7,8 kb langen, einzelsträngigen und positiv-orientierten Ribonukleinsäure (ssRNA) und besitzt, wie die meisten eukaryotischen mRNAs, einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende [1]. Picornaviren sind nicht behüllt und besitzen eine ikosaedrische Kapsel, welche einen Durchmesser von ca. 30 nm hat [2]. Dieses Kapsid ist eine komplexe Struktur aus Proteinen und dient der Verpackung des viralen Genoms. Es ist aus 60 Kapsomeren aufgebaut und besitzt eine 5:3:2 Symmetrie [3]. Die Untereinheiten bestehen jeweils aus den Polypeptiden Virusprotein (VP) 1, VP2, VP3 und VP4 [3], wobei das VP4 sich im Inneren der Kapsel befindet und von außen nicht sichtbar ist (Abbildung 1).



**Abbildung 1. Innenansicht des Mengovirus mit Strukturproteinen, schematisch.** VP = Virusprotein.  
AAA = Poly-A-Schwanz.

1948 wurde das MV von George W. A. Dick aus einem Rhesus-Affen in Entebbe (Uganda, Afrika) isoliert, welcher eine Paralyse der Hinterbeine aufwies [4]. Dick selbst erlitt eine fieberhafte Erkrankung mit Enzephalitis bei der Isolation des

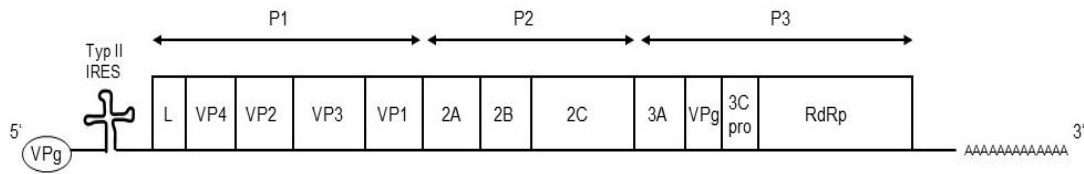
Virus. Das MV konnte anschließend auch in seinem Blut nachgewiesen werden [5]. Dennoch treten Erkrankungen des Menschen mit dem MV sehr selten auf und haben, sofern es zu einer Infektion kommt, einen eher milden Verlauf. Das Virus scheint v.a. in Nagern sein natürliches Reservoir zu haben, kann aber auch andere Säuger infizieren. Injiziert man das MV intraperitoneal oder auch intrazerebral in Mäuse, so kommt es zu einer letalen Meningoenzephalomyelitis [6, 7].

## 1.2 Virale Genomorganisation und exprimierte Proteine

Der codierende Bereich des Mengovirus-Genoms besteht aus drei Regionen (Abbildung 2, Tabelle 1). Die P2- und P3-Regionen codieren nichtstrukturelle Proteine, während die P1-Region die strukturellen Proteine der neuen Virionen codiert. Am 5'-Ende der RNA befindet sich ein kleines Protein, das VPg, das über eine Phosphoesterbindung an das 5'-Uridyl der RNA geknüpft ist [8, 9]. Dieses virusspezifische Protein ersetzt unter anderem bei Picornaviren das 5'-Cap (5'-5'-Triphosphatbindung), welches bei zellulären mRNAs üblich ist. Das 5'-Cap erhöht die Stabilität der RNA während des Transports aus dem Kern ins Zytoplasma, indem es den Abbau der RNA von 5'-3'-Exonukleasen verhindert. Zudem ist es auch für die Initiation der Translation von Bedeutung. Auch das VPg des MV scheint eine Rolle bei der Initiation der RNA-Synthese zu spielen [10]. Die vier Proteine, welche aus der P1-Region entstehen, VP1, VP2, VP3 und VP4 (nach neuer Nomenklatur VP4 = 1A, VP2 = 1B, VP3 = 1C und VP1 = 1D), formen das Kapsid [3,11]. VP1 und VP3 bilden gemeinsam ein kleines Loch, das sog. Pit, welches als Erkennungsstelle für virusspezifische Rezeptoren dient [5]. Die P1-Region enthält auch den Leader (L), der zusammen mit 2A (P2-Region) antidefensive Funktionen erfüllt [12]. In Romanova *et al.* wird zudem beschrieben, dass eine Mutation im L-Protein dazu führt, dass die Fähigkeit des MV, die Apoptose zu verhindern, verloren geht [13]. Für das Virus ist es wichtig, dass die Wirtszelle nicht die Apoptose einleitet und dadurch die Virusreplikation verhindern kann. Ebenfalls beeinflusst das L-Protein den Transport wirtseigener Substrate in den Nukleus, indem es an die Ran-GTPase bindet. So ist es möglich, die Wirtszelle daran zu hindern, die Transkription antiviraler Gene hoch zu regulieren [14] und damit einhergehend die virale Vermehrung einzudämmen.

Das L-Protein macht es dem MV möglich, die Immunantwort des Wirts zu hemmen, indem die Expression von NF- $\kappa$ B reduziert wird [15], sowie folglich die der Typ I Interferone (IFN- $\alpha$  und - $\beta$ ). NF- $\kappa$ B ist normalerweise im Zytoplasma an sein Inhibitor-Protein I- $\kappa$ B gebunden. Wird I- $\kappa$ B phosphoryliert, so löst es sich von NF- $\kappa$ B, wird polyubiquitiniert und im Proteasom degradiert. Diese Degradation führt dazu, dass NF- $\kappa$ B frei wird und in den Nukleus transloziert werden kann, wo es als Transkriptionsfaktor (TF) fungiert. Zusammen mit weiteren TF fördert NF- $\kappa$ B die Transkription von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  [16], welche ebenfalls die virale Vermehrung supprimieren können.

Die P2- und P3-Region codieren Gene, welche für die Genomreplikation unabdingbar sind und die RNA-Synthese steuern, indem sie mit reifen Proteinen interagieren. Die P2-Region codiert für die Proteine 2A, 2B und 2C. Das Protein 2A ist unter anderem dafür verantwortlich, dass die 5'-Cap-abhängige Translation der Wirts-mRNA ausgeschaltet wird [17, 18], indem es an Ribosomen binden kann [19] und somit die zelluläre Proteinbiosynthese verhindert. Des Weiteren scheint das 2A-Protein auch an der Inhibition der Wirts-Transkription beteiligt zu sein [20]. Die Funktion des 2B-Protein ist bisher noch nicht bekannt. Das 2C-Protein hat eventuell einen Einfluss auf die Initiation der RNA-Synthese [21], während die P3-Proteine, 3A, 3B, 3C und 3D an der Genomreplikation (1.3) beteiligt sind. Das Protein 3B entspricht dem VPg des 5'-Endes (Tabelle 1) und ist wahrscheinlich ebenfalls notwendig, um die RNA-Synthese zu initiieren [22]. Unklar ist, ob das VPg in Kombination mit dem 3A-Protein einen 3AB-Komplex bildet oder allein agiert [22]. Das 3C-Protein ist eine virusspezifische Protease, die für einige Schritte in der posttranslationalen Modifikation, also die Prozessierung des Viruspolyproteins, verantwortlich ist [23, 24]. Das 3D-Protein kann mithilfe von Primern die Entstehung von RNA katalysieren [25, 26], erfüllt also die Funktion einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp, hier die sog. 3D Pol).

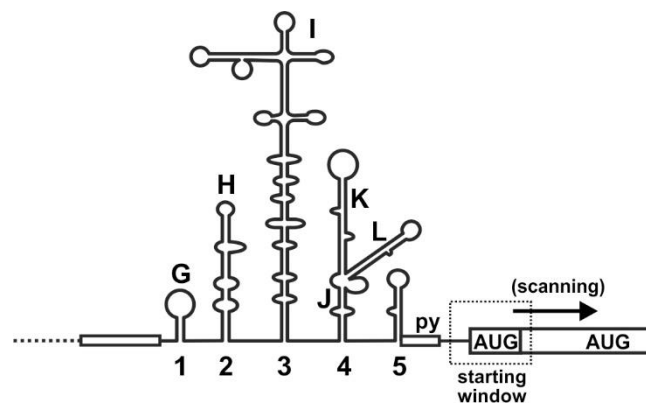


**Abbildung 2. Aufbau des Mengovirus-Genoms, schematisch.** Am 5'-Ende der viralen RNA befindet sich das 5'-VPg, sowie die 5'-UTR, welche die IRES enthält. Anschließend folgt die P1-Region, die für die strukturellen Proteine 1, 2, 3 und 4 (VP1, VP2, VP3, VP4) codiert, sowie für das Leader-Protein (L). Dem schließt sich die P2-Region an, die die nicht-strukturellen Proteine 2A, 2B und 2C beinhaltet. Die darauffolgende P3-Region codiert für die Proteine 3A, 3B (entspricht dem 5'-VPg), 3C und 3D (entspricht der RNA-abhängigen RNA-Polymerase 3D Pol; engl. RNA-dependent RNA-polymerase [RdRp]). Abschließend folgt die 3'-UTR mit dem Poly-A-Trakt.

Region	Protein	Funktion
P1	Leader (L)	Antidefensive Funktion
	VP4 (1A), VP3 (1B), VP2 (1C), VP1 (1D)	Strukturelle Proteine
P2	2A	Antidefensive Funktionen, Bindung an Ribosom
	2B	Nicht bekannt
	2C	Initiation der RNA-Synthese
P3	3A	Genomreplikation
	3B (VPg)	Dient als Primer am 3'-Ende
	3C	Viruspezifische Protease (posttranslationale Modifikation)
	3D	RNA-abhängige RNA-Polymerase (3D Pol)

**Tabelle 1. Erklärung zu Abbildung 2.**

Die IRES-Elemente befinden sich in der 5'-UTR und rekrutieren Komponenten der zellulären Translationsmaschinerie, so ist kein 5'-Cap nötig, um die Translation einzuleiten [27]. Sie werden in vier Gruppen eingeteilt, welche aufgrund der unterschiedlichen Sekundärstrukturen entstehen. Zusammen mit dem Maul-und-Klauenseuche-Virus (FMDV), besitzen das EMCV und das MV eine Typ-II-IRES [27].

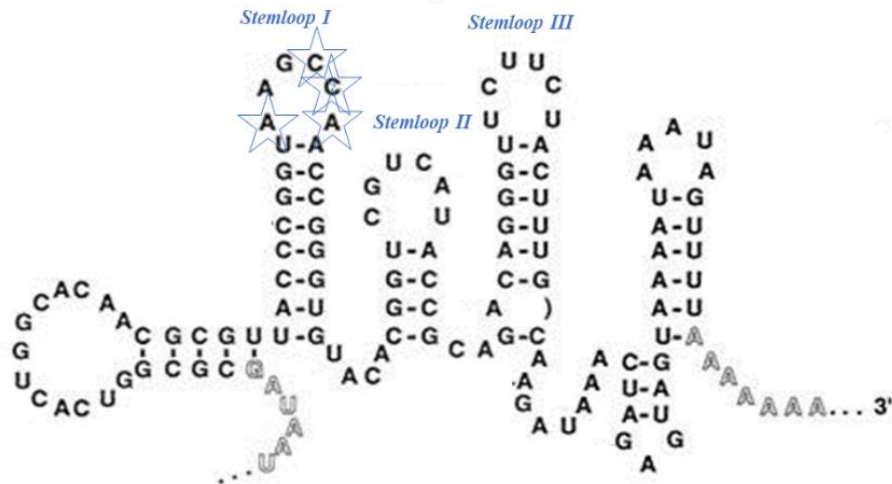


**Abbildung 3. IRES vom Typ II.** Sekundärstruktur der EMCV-IRES, die sich in der 5'-UTR befindet. Mit den Buchstaben G bis L sind die IRES-Stemloops gekennzeichnet. Py entspricht dem Oligopyrimidin-Trakt. Mit AUG ist die Basenabfolge Adenin – Uracil – Guanin abgekürzt, an welcher das Ribosom bindet und die Translation beginnt. Verwendung der Abbildung mit Genehmigung von Michael Niepmann (s. Einverständniserklärungen).

IRES-Elemente sind dem Startcodon vorgeschaltet und besitzen eine ausgeprägte Sekundärstruktur mit teilweise doppelsträngigen Sequenzabschnitten [28]. Zur Initiation der Translation (1.3) dockt die 5'-UTR an das Ribosom an. Es entsteht ein einziges großes Polypeptid, welches man in strukturelle und nicht-strukturelle Einheiten unterteilen kann, die an der Virus-Replikation beteiligt sind. Gleichzeitig verhindert das MV die Translation des Wirtes über zwei Mechanismen. Zum einen erfolgt eine Dephosphorylierung von eIF4E-BP, das in diesem Zustand nun ein Inhibitor von eIF4E ist und somit einen wichtigen Initiationsfaktor der Wirts-Translation behindert [29], zum anderen interagiert das Protein 2A des Virus mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms und verhindert so die Interaktion mit gecappten mRNAs [30]. Die 5'-UTR besitzt lange Polycytidylat (Poly-C)-Bereiche, deren Länge höchstwahrscheinlich die

Pathogenität des MV positiv beeinflussen [31, 32]. Wird der Poly-C-Trakt des MV verkürzt, so scheint die Virulenz des Virus reduziert zu sein [31].

Die 3'-UTR von Cardioviren ist circa 126 nt lang und befindet sich zwischen dem 3'-Ende der P3-Region und dem Poly-A-Schwanz. Sie enthält drei Stemloops (SL, engl. *stem* = Stamm; *loop* = Schleife), welche bereits zum Teil charakterisiert wurden. In einer von Duque *et al.* publizierten Studie konnte durch Klonierung von Virus-Genomen, welche entweder eine Deletion von SL I ( $\Delta$ I), SL II ( $\Delta$ II) oder SL III ( $\Delta$ III) hatten, die Bedeutung des jeweiligen Stemloops isoliert betrachtet werden. Bei  $\Delta$ I wurde die Beobachtung gemacht, dass trotz Deletion eine Virusvermehrung stattfinden konnte und beim Plaque Assay die Plaques kleiner waren als die des Wildtyp-Konstrukts (post-Transfektion, sowie auch post-Infektion). Auch fiel auf, dass die Anzahl der Plaque Forming Units um das Zwei- bis Vierfache geringer war, verglichen mit dem Wildtyp.  $\Delta$ III führte zur Unfähigkeit der viralen RNA-Synthese. Auch bei  $\Delta$ II konnte mittels Plaque Assay festgestellt werden, dass die RNA-Konstrukte bedeutend weniger infektiös waren als die des Wildtyps. Obwohl SL I für die RNA-Synthese am ehesten entbehrlich zu sein schien, wurde gezeigt, dass  $\Delta$ I eine große Bedeutung für die Pathogenität des Virus hat. Mäuse wurden intrakranial mit MV-Wildtyp infiziert und erkrankten, in Form von Lähmung der Extremitäten, bzw. starben nach 5 – 8 Tagen daran. Wurden sie allerdings mit  $\Delta$ I-Virus infiziert, so war die Sterbe- und Erkrankungsrate deutlich geringer [33].



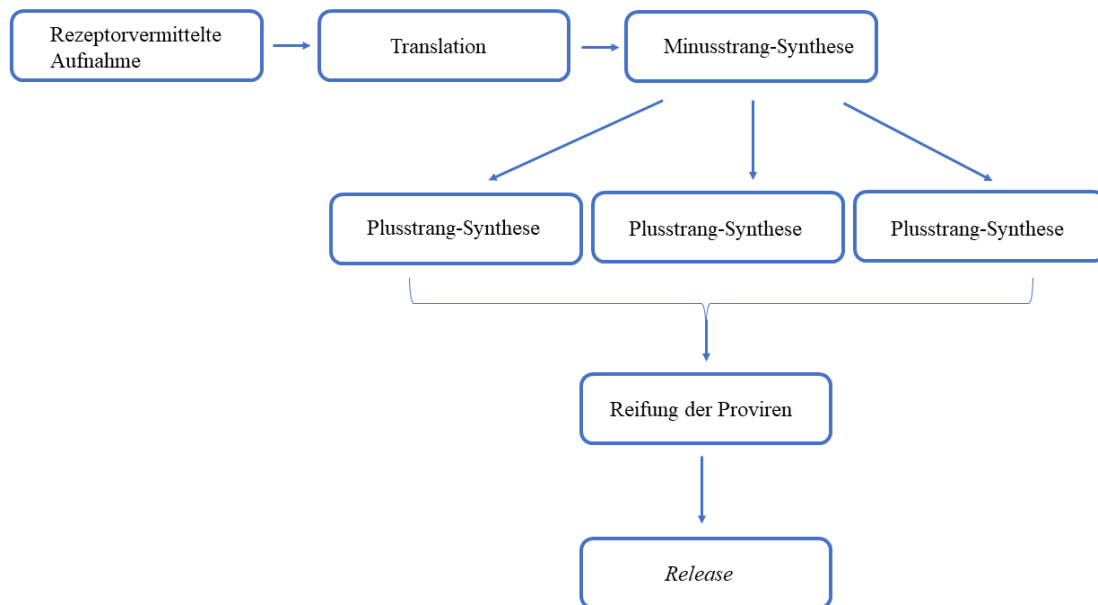
**Abbildung 4. 3'-UTR des Mengovirus.** Die hellblauen Sterne kennzeichnen die Stellen in der 3'-UTR des MV, die in der vorliegenden Arbeit mutiert wurden und somit die Bindung der GARS nicht mehr möglich machen. Verändert nach: [33] mit Genehmigung (s. Einverständniserklärungen).

In der vorliegenden Arbeit wurden im SL I vier Basen mutiert (Abbildung 4, Abbildung 8), das Konstrukt wird im Folgenden als MV-3'-UTR-Mutante bezeichnet.

### 1.3 Replikationszyklus

Zuerst bindet das Virion an einen extrazellulären Rezeptor, wobei für das MV Glykophorin A sowie VCAM-1 – ein Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie – auf Endothelzellen als Rezeptoren angesehen werden [6]. Durch die Interaktion der Kapsomere mit den extrazellulären Rezeptoren findet eine Konformationsänderung statt, die notwendig ist, damit das Kapsid endozytiert dissoziieren kann. Ist das Kapsid dissoziiert, so wird die virale RNA frei und über einen bisher unbekanntem Mechanismus vom Endosom in das Zytosol der Zelle eingeschleust. Viele Picornaviren, wie beispielsweise das Poliovirus, können ihre RNA mithilfe des niedrigen endosomalen pH-Werts, welcher die Kapsel des Virus auflöst, in die Zelle einschleusen. Dieser Mechanismus ist für Cardioviren

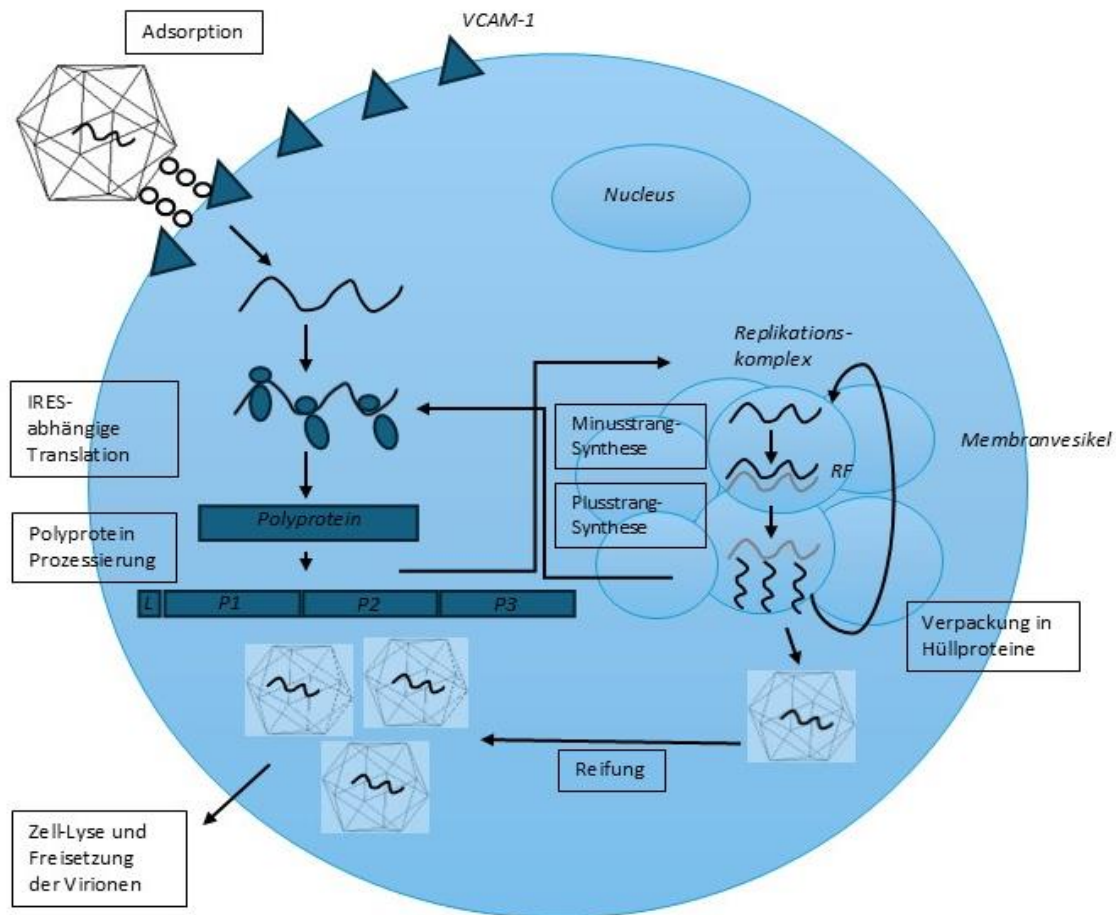
allerdings nicht bestätigt worden [34].



**Abbildung 5. Übersicht und Reihenfolge des viralen Infektionszyklus des Mengovirus.** Nach der rezeptorvermittelten Aufnahme des Virus in die Zelle erfolgt die Translation der viralen Proteine im Wirtszytosol. Sind die Virusproteine entstanden, so beginnt die RNA-Synthese, und es entstehen Minusstränge, aus welchen sich ein intermediärer Doppelstrang bildet. Diese Replikationsform wird als Matrize für die folgende Plusstrang-Synthese verwendet. Die neu entstandene Virus-RNA wird anschließend in die synthetisierten Kapseln verpackt und es erfolgt nun die Freisetzung aus der Wirtszelle (*Release*).

Es kommt zur Initiation der Translation in ein Polyprotein, da das virale Genom bereits in positiver Orientierung vorliegt und folglich als mRNA fungieren kann. An der Initiation der cap-abhängigen Translation sind viele eukaryotische Initiationsfaktoren (eIF) beteiligt, welche mit der 40S-Untereinheit des Ribosoms oder auch der Starter-tRNA (Methionyl-tRNA) interagieren. Der eIF-4E erkennt das 5'-Cap der mRNA und leitet mithilfe weiterer eIF die mRNA zum Ribosom. Bei der IRES-abhängigen – und somit cap-unabhängigen – Translation wird mithilfe der eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF3, eIF4A und eIF4B und ohne eIF4E eine Bindung an das Ribosom möglich gemacht und die 40S [2] Untereinheit des Ribosoms direkt zur viralen RNA rekrutiert, ohne dass ein 5'-Cap nötig ist. Bei der cap-abhängigen sowie auch bei der cap-unabhängigen Translation erfolgt anschließend die Bindung der 60S-Untereinheit des Ribosoms am AUG-Startcodon und die Loslösung der eukaryotischen Initiationsfaktoren.

Das virale Protein 3C, das als Protease (3C Pro) fungiert, wird direkt nach seiner Translation aktiv und prozessiert das entstandene Polyprotein [2]. Durch die Translation des Plusstrangs in das Polyprotein ist die RNA-Polymerase 3D Pol entstanden und strukturelle Proteine für den Aufbau neuer Virione. Einige der translatierten Proteine induzieren die Bildung von Membranvesikeln, an deren Oberfläche anschließend die Replikation stattfindet. Der erste Schritt der Replikation ist die Synthese eines komplementären Minusstrangs aus der Plusstrang-RNA und findet im Zytoplasma des Wirts statt. Hier bilden sich die Membranvesikel, an deren Oberfläche die Replikation stattfindet [35]. Die Polymerase benötigt zum Start der Replikation das VPg als Primer, das zuvor von der 3D Pol uridylyliert werden muss. Es entsteht VPg-pUpU, welches wahrscheinlich am 3'-Ende (entspricht dem Poly-A-Schwanz) andockt. Ist der Minusstrang synthetisiert, hat sich ein intermediärer RNA-Doppelstrang gebildet, der als Replikationsform (RF) bezeichnet wird und dem nun der Minusstrang als Matrize für die Synthese weiterer Plusstränge dient [2, 36]. Auf diesem Weg können viele weitere Plusstränge synthetisiert werden. Unklar ist jedoch, ob zur Plusstrang-Synthese das bereits uridylylierte VPg verwendet werden kann oder ob eine weitere Uridylylierung stattfinden muss [37]. Da das VPg sich stets am 5'-Ende eines Stranges befindet, gleich ob es ein Plus- oder ein Minusstrang ist [9], wird angenommen, dass es als eine Art Primer für die 3D Pol dient, welche strikt primer-abhängig synthetisiert [26]. Ist die neue virale Plusstrang-RNA synthetisiert, so muss sie in das Kapsid aus den strukturellen Proteinen der P1-Region verpackt werden. Anschließend erfolgt die Reifung der Proviren und die Freisetzung aus der Wirtszelle (Abbildung 6). Wie und wann genau die Freisetzung der Viren erfolgt, ist noch nicht hinreichend geklärt, sowie ob eine gewisse Zeit oder Konzentration an Virionen zur Zelllyse führt. Die antidefensiven Funktionen des L- und 2A-Proteins spielen wahrscheinlich eine bedeutende Rolle, da sie die Wirts-Transkription und -Translation stark beeinträchtigen. Ebenfalls wird beschrieben, dass HeLa-Zellen nach einer Infektion mit MV ihre Membranpermeabilität erhöhen und es zur Zellnekrose kommt, woraufhin die neu entstandenen Virionen freigesetzt werden [38].



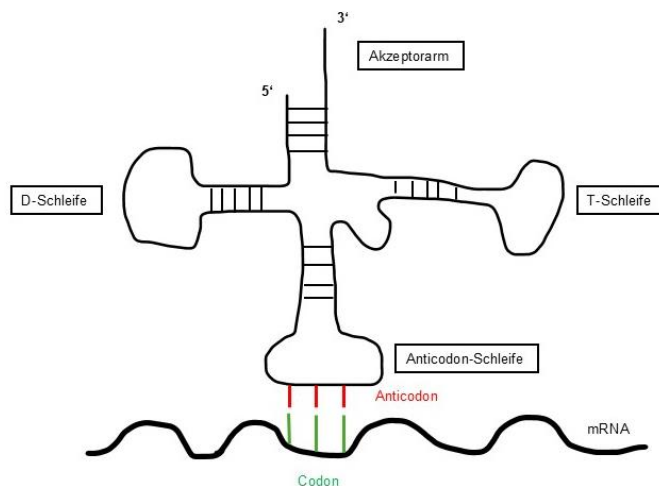
**Abbildung 6. Viraler Infektionszyklus von Picornaviren, schematisch.** Nach Binden des Mengovirus an einen zellulären Rezeptor (VCAM-1) wird über einen bisher nicht bekannten Mechanismus die RNA freigesetzt und sofort mit der IRES-abhängigen viralen Translation der RNA in ein Polyprotein begonnen. Einige der nun neu synthetisierten Proteine induzieren die Bildung von Membranvesikeln, an deren Oberfläche die Replikation stattfinden kann (Replikationskomplex). Nach Prozessierung und Modifizierung des Polyproteins entstehen in der Replikation von Plussträngen dann Minusstränge. Intermediär bildet sich aus einem Plus- und einem Minusstrang ein RNA-Doppelstrang (RF= Replikationsform), der als Matrize für die Plusstrang-Synthese dient. Es beginnt die Synthese von vielen Nachkommen-Plussträngen, die anschließend wieder translatiert werden oder in die viralen Hüllproteine verpackt werden, sodass dann Virionen reifen und durch Lyse der Zelle freigesetzt werden können.

#### 1.4 Die Glycyl-tRNA-Synthetase

Die Glycyl-tRNA-Synthetase (GARS, synonym: Glycyl-tRNA-Ligase) ist ein Enzym, das die Bindung der proteinogenen Aminosäure Glycin an ihre tRNA katalysiert. Sie gehört zur Klasse der Typ II Aminoacyl-tRNA-Synthetasen und kann in einer weiteren Reaktion auch die Bildung von Dinukleosid-Polyphosphaten katalysieren, welche eventuell einen Einfluss auf die Regulation

von Zellfunktionen haben [39]. Sie ist also ein Enzym, das in der Translation eine wichtige Rolle spielt und an der Proteinbiosynthese beteiligt ist. tRNAs haben eine kleeblattartige Sekundärstruktur (Abbildung 7) und besitzen an einer exponierten Stelle, nämlich im Loop des Anticodon-Stemloops, eine Sequenz, die komplementär zu einem Codon der mRNA ist, das sog. Anticodon. Für die Aminosäure Glycin (Gly) gilt für das Anticodon die Sequenz 5'-NCC-3'. Als Codon für Glycin kommen also die Sequenzen 5'-GGU-3', 5'-GGC-3', 5'-GGA-3', sowie 5'-GGG-3' in Betracht, da der genetische Code redundant ist.

Am 3'-Ende der tRNA, dem Akzeptorarm, befindet sich eine posttranskriptionell angefügte CCA-Sequenz, dessen Adenosin an der 3'-OH-Gruppe stets mit der zum Codon korrespondierenden Aminosäure kovalent verknüpft ist, in diesem Falle also Glycin [40].



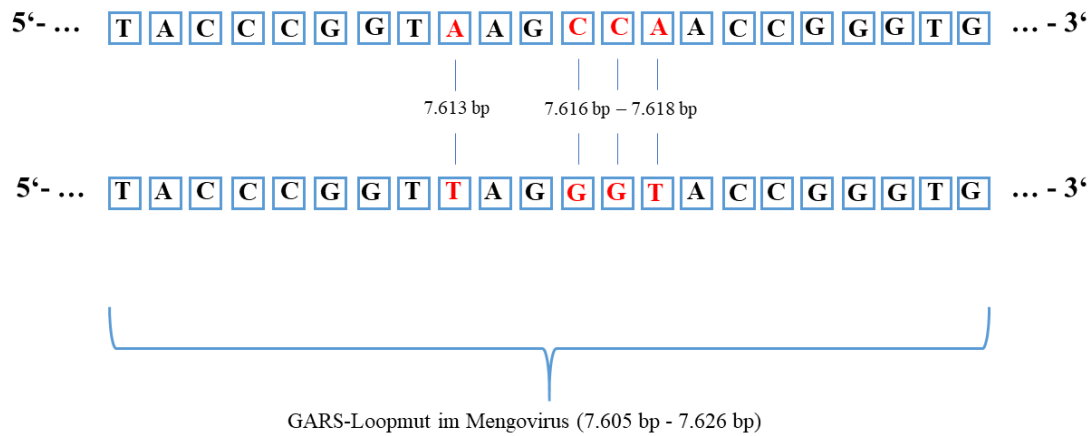
**Abbildung 7. Zweidimensionale Kleeblattstruktur einer tRNA.**

tRNAs bestehen aus ca. 70 – 80 Nucleotiden und haben vier komplementäre Abschnitte, an welchen sie über intramolekulare Wasserstoffbrückenbindungen Schleifen ausbilden. Durch die Basenpaarungen entstehen die T-Schleife, die Anticodon-Schleife und die D-Schleife. Der Akzeptorarm besteht aus dem 5'-Ende, sowie dem 3'-Ende. Das 3'-Ende enthält die Endsequenz CCA, die bei allen tRNAs gleich ist. An diesem 3'-OH-Ende findet die Veresterung mit der Aminosäure statt, welche gebunden werden soll. Dem Akzeptorarm gegenüberliegend befindet sich die Anticodon-Schleife, die die drei Nucleotide des Anticodons enthält, die komplementär zum Codon der mRNA sind. Die Sequenz des Anticodons der tRNA bestimmt maßgeblich, welche Aminosäure am Akzeptorarm gebunden wird, und somit dient die tRNA als „Dolmetscher“ der mRNA-Sequenz in die Aminosäuresequenz.

Wie bedeutend die GARS für den menschlichen Organismus ist wird deutlich, wenn man sich beispielsweise mit der Ätiologie der Charcot-Marie-Tooth-Disease

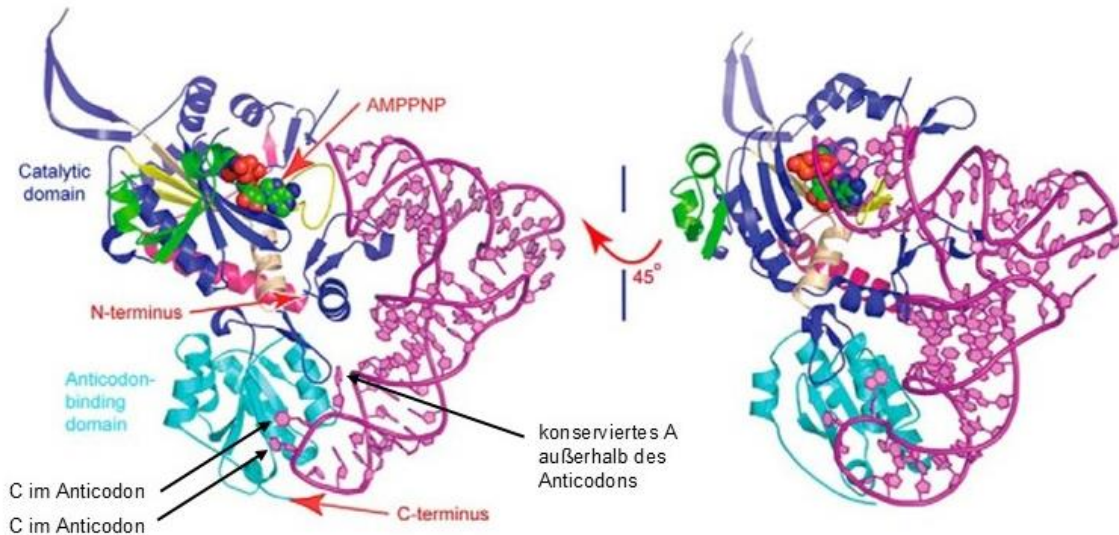
Typ II D (CMT2D) beschäftigt. Hier führen Mutationen in dem GARS-codierenden Gen zur ursächlichen Entstehung der Erkrankung [41]. Es gibt allerdings auch weitere Ursachen dafür, wie beispielsweise Mutationen in anderen Aminoacyl-tRNA-Synthetasen-codierenden Genen. Relevant sind hier besonders auch die Tyrosyl-tRNA-Synthetase, die Alanyl-tRNA-Synthetase, die Histidyl-tRNA-Synthetase, die Methionyl-tRNA-Synthetase, sowie die Tryptophanyl-tRNA-Synthetase [42, 43]. Die CMT2D ist eine der häufigsten vererbaren peripheren Neuropathien (Inzidenz: 1/2.500 – 5.000) und beginnt meist in der Adoleszenz [43]. Sie geht mit einer Atrophie der Muskulatur von Händen und Füßen einher und betrifft besonders die distalen Körperpartien [44]. Eine intakte Funktion der GARS scheint also besonders für die Motoneurone essentiell zu sein, da diese für die Versorgung der Muskelzellen verantwortlich sind. Es wird deutlich, dass bereits eine milde Defizienz der GARS zu komplizierten Krankheitsbildern führen kann und die GARS scheinbar auch neben der enzymatischen Funktion eine regulatorische Rolle zu haben scheint [42, 45, 46].

Bei einer viralen Infektion kommt es oft dazu, dass die Proteinbiosynthese des Wirts beeinträchtigt wird und die Ressourcen für die virale Vermehrung genutzt werden. Das Poliovirus scheint die GARS der Wirtszelle für die eigene Translation zu nutzen. Dem Enzym ist es möglich, sehr spezifisch an die Domäne V der IRES in der 5'-UTR des Poliovirus zu binden. Diese Spezifität wird dadurch erreicht, dass die Haarnadelstruktur der Domäne V der Poliovirus IRES das Anticodon (NCC) der Glycyl-tRNA nachahmt. Die Bindung der GARS an Domäne V der IRES von Poliovirus ist vermutlich essentiell für die richtige Platzierung und das Andocken der 40S-Untereinheit des Ribosoms an die IRES [27].



**Abbildung 8. Mutation in SL I der 3'-UTR des MV-Genoms.** Die obere Sequenz entspricht dem MV-Wildtyp. Die untere Sequenz entspricht der MV-Mutante. Die mutierten Nukleotide sind rot gekennzeichnet. Die Mutation ist von Dmitri Andreev so eingefügt worden, dass eine mögliche Bindung der GARS an diese Sequenz nicht mehr möglich ist, die Sekundärstruktur an dieser Stelle aber nicht verändert wird und somit die Schleifenbildung weiterhin besteht.

Beim MV wurde eine ähnliche GARS-Bindungsstelle in SL I der 3'-UTR vermutet, da dort ein konserviertes GARS-Signal gefunden wurde. Dieses GARS-bindende Element (GBE) wurde von Dmitri Andreev mutiert, sodass die Sekundärstruktur der Mutante sich nicht von der des Wildtyps unterscheidet und die Schleifenbildung an der Stelle des GARS-Signals erhalten bleibt (Abbildung 8).



**Abbildung 9. Bindung der tRNA an die Anticodon-Bindungsdomäne (engl. anticodon-binding domain) der GARS aus zwei Perspektiven. Rechts ist die linke Abbildung um 45° rotiert dargestellt.** Die katalytische Domäne (engl. catalytic domain) ist blau dargestellt. Lila dargestellt ist die tRNA. Mit roten Pfeilen markiert sind der C- und der N-Terminus, sowie das AMPPNP (= Adenylyl-imidodiphosphat Tetralithiumsalz Hydrat). Hellblau dargestellt die Anticodon-Bindungsdomäne. Mit schwarzen Pfeilen sind die beiden konservierten CC, welche sich innerhalb des Anticodons befinden, sowie ein konserviertes A, welches außerhalb des Anticodons ist und in engem Kontakt zur Synthetase steht. Verändert nach: [47], freies Verfügen dieser Abbildung ohne gesonderte Genehmigung möglich.

Im Anticodon-SL von der tRNA wird die Anticodon-Sequenz 5'-NCC-3' [35, 36, 37] dargestellt, diese entspricht dem komplementären Glycin-Codon (5'-GGN, wobei N für alle möglichen Nukleotide steht). Innerhalb der Anticodon-Schleife hinter dem konservierten CC – welches Teil des Anticodons ist – befindet sich ein konserviertes A [48, 49], dieses ist nicht mehr Teil des Anticodons. Dieses Adenin-Nukleotid steht in enger Interaktion mit der Anticodon-Bindungsdomäne der GARS [50] und hat offensichtlich engen Kontakt zur Synthetase. Deswegen beinhaltet die Anticodon-Schleife der Glycin-tRNA ein konserviertes CCA-Motiv in Position 4 – 6 [51].

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Das MV ist während seiner Translation und Replikation auf zelluläre Interaktionspartner angewiesen, bis heute sind jedoch nur wenige davon charakterisiert worden. Als möglicher Interaktionspartner des MV kommt die Glycyl-tRNA-Synthetase in Frage. In einer Studie von Dmitri E. Andreev konnte

gezeigt werden, dass GARS einen positiven Einfluss auf die Translation des Poliovirus hat, in dem es mit der Virus-RNA interagiert [27].

Ziel dieser Arbeit war es, zu analysieren, ob und inwieweit die GARS-Bindungsstelle in der 3'-UTR des MV einen Einfluss auf die Replikation und/oder Translation des Virus hat. Um diese Annahme zu prüfen, wurde von Dmitri E. Andreev eine Mutation in der 3'-UTR eingefügt, welche so eine potentielle Bindung der GARS an das RNA-Genom des Virus verhindern würde. In der vorliegenden Arbeit sollten Wildtyp und 3'-UTR-Mutante auf Unterschiede im Infektions-, Replikations- und Translationsverhalten getestet werden. Hierfür wurden Plaque Assays, Western Blots und Luciferase Assays durchgeführt.

Des Weiteren sollte die Virusproduktion der beiden MV-RNA-Genome in verschiedenen Zelllinien untersucht und eventuelle Differenzen analysiert werden. Da das MV v.a. neuropathogen ist, sollten in der vorliegenden Arbeit HeLa-Zellen als Beispiel für eine epitheliale Zelllinie verwendet werden, sowie SK-N-AS-Zellen und Neuro-2A-Zellen, um neuronale Zelllinien zu repräsentieren. SK-N-AS-Zellen stammen aus dem Menschen und sollten mit Neuro-2A-Zellen verglichen werden, da die Neuro-2A-Zelllinie aus der Maus stammt, die vom MV befallen werden kann.

## 2 Materialien

### 2.1 Materialien und Geräte

Verbrauchsmaterialien	Quelle
Avanti JXN-26 Centrifuge, Rotoren JA-25.50, JA-10	Beckman Coulter
Bakterien-Inkubator Certomat® H	Braun
Bi-Destille, Destamat	Heraeus
Blotapparatur, Fastblot B43/44	Biometra
Chromatographie Papier 3MM (Whatman)	VWR
CO <sub>2</sub> -Inkubator Serie CB	Binder GmbH
Cryo-Röhrchen	Sarstedt
Digitales pH-Meter 644	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG
Elektroporationsküvetten (4 mm)	Bio-Rad
Elektroporator, GenePulser Xcell™	Bio-Rad
Filmkassetten, Cronex Lightning Plus	Du Pont
Fluorometer Qubit™	Invitrogen
Geldokumentationssystem, GelDoc XR	Bio-Rad
Gel-Elektrophoresekamern	von Keutz
Heizblock, Akku Block™	Labnet
Heizblock, MBT 250	Kleinfeld Labortechnik
Heiz-Magnetrührer US 152	Stuart
Kippschüttler DuoMax 1030	Heidolph Instruments
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf
Luminometer Lumat LB 9501	Berthold Technologies
Mastercycler ep realplex2	Eppendorf
Mikroskop, Leica DM IL invers	Leica Microsystems
Petrischalen	Sarstedt
Pipetboy®	Integra
Pipetten (2 µl – 1.000 µl)	Gilson

Pipettenspitzen (10 µl – 1.250 µl)	Sarstedt
Platteninkubator B15	Thermo Scientific
PVDF Membran, Immobilon-P (0,45 µm)	Millipore
Reaktionsgefäße (200 µl–50 ml)	Sarstedt
Luminometer Röhrrchen	Sarstedt
Röntgenfilme, CL-XPosure™ (18 cm x 24 cm)	Thermo Scientific
Serologische Pipetten (5 ml–50 ml)	Sarstedt
Sterilbank, Lamin Air HA 2448 BS	Heraeus
Thermocycler, T1	Biometra
Thermocycler, TProfessional	Biometra
Tischzentrifuge, Centrifuge 5415C und 5417R	Eppendorf
Vortex Genie 2™	Bender & Hoben
Waage	Sartorius
Wasserbad julabo	Julabo
Zählkammer, Neubauer-improved (0,1 mm Tiefe)	Superior Marienfeld
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> –175 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt
Zellkulturplatten (6 well, 12 well)	Sarstedt
Zellkulturschalen (9 cm)	Sarstedt
Zentrifugationsröhrrchen (14 mm x 89 mm)	Sarstedt

## 2.2 Chemikalien

Allgemeine Laborchemikalien, die nicht in der Tabelle gelistet sind, wurden von den Firmen Thermo Scientific (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

<b>Spezielle Chemikalie/Reagenz</b>	<b>Quelle</b>
Agar	Carl Roth GmbH
Agarose	Carl Roth GmbH
Ammoniumpersulfat (APS)	Thermo Scientific
Ampicillin	Carl Roth GmbH
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu Biotechnik
Ethanol (96 % und 99 %)	Carl Roth GmbH
Fötales Rinderserum (FBS)	Life Technologies
Glycerol	Carl Roth GmbH
Glutathion (GSH)	Sigma Aldrich
Isopropanol	Carl Roth GmbH
Lipofectamine® 2.000	Invitrogen
Milchpulver	EDEKA Krenschker, Gießen
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH
Natriumacetat	Carl Roth GmbH
Penicillin-Streptomycin (100 x)	Life Technologies
Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol	Sigma-Aldrich
Phosphate Buffered Saline (PBS) 10 x	Carl Roth GmbH
Röntgenfilmentwickler und -fixierer	Agfa, Köln
Rotiphorese Bisacrylamidlösung 40 (29:1, 19:1)	Carl Roth GmbH
Tris	Carl Roth GmbH
Trypsin-EDTA (0,5 %, 10 x)	Life Technologies
Tween® 20	Sigma Aldrich

## 2.3 Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
0,5 M EDTA	Für 100 ml: 14,61 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	Für 100 ml: 10,16 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
1 M DTT	Für 10 ml: 1,5 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O Einfrieren
1 M NaOH	Für 1 l: 40 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
1 M Tris HCl	Für 1 l: 121,1 g pH-Wert einstellen mit HCl Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
3 M Natriumacetat	Für 50 ml: 20,41 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O
5 M NaCl	Für 500 ml: 146,1 g Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O

## 2.4 Puffer

### 2.4.1 Allgemein

Lösungen	Zusammensetzung
0,5 %-iges Trypsin-EDTA	Verdünnung von 10 x Trypsin-EDTA in ddH <sub>2</sub> O

3 %-iges PFA	Für 100 ml: 3 g Paraformaldehyd In 80 ml ddH <sub>2</sub> O 100 µl 5 M NaOH Alles auf 65 °C erhitzen und abkühlen lassen 10 ml 10 x PBS Mit 37 %-iger Salzsäure auf pH 7,4 einstellen Auffüllen mit ddH <sub>2</sub> O Lagerung bei -20 °C
Lyse-Puffer	Für 100 ml (10 x): 10 ml 10 mM Tris HCl, pH 8,0 8,2 g 140 mM NaCl 0,25 g 0,025 % NaN <sub>3</sub> 10 ml 1 %-iges Triton X-100 Vor Gebrauch mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 x verdünnen
PBS (1 x PBS)	137 mM NaCl  2,7 mM KCl  4,3 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>  1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Verdünnung von 10 x PBS in ddH <sub>2</sub> O)
1 % Kristallviolett	1 % Kristallviolett-Pulver  20 % Ethanol  Auffüllen mit 1 x PBS

### 2.4.2 Gelelektrophorese

Puffer	Zusammensetzung
50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
10 x TBE (Tris-Borat-Acetat)	108 g Tris 55 g Borsäure 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen

### 2.4.3 Probenpuffer für Nukleinsäuren

Puffer	Zusammensetzung
DNA-Probenpuffer	75 % Glycerin 50 mM EDTA (pH 7,5) Einige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol mit ddH <sub>2</sub> O auf 20 ml auffüllen Aufbewahrung erfolgt bei - 20 °C in 2 ml Aliquoten
RNA-Probenpuffer	80 % Formamid 10 % Glycerol 50 mM EDTA (pH 7,5)

	<p>Wenige Körner Bromphenolblau und Xylencyanol</p> <p>mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 ml auffüllen</p> <p>Aufbewahrung erfolgt bei - 20 °C in 2 ml Aliquoten</p>
--	---

#### 2.4.4 Puffer für Elektroporation

Puffer	Zusammensetzung
Zytomix	<p>120 mM KCl</p> <p>0,15 mM CaCl<sub>2</sub></p> <p>10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> / KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7,6)</p> <p>25 mM HEPES (pH 7,6)</p> <p>2 mM EGTA (pH 7,6)</p> <p>5 mM MgCl<sub>2</sub></p> <p>Mit ddH<sub>2</sub>O auf 475 ml auffüllen</p> <p>Sterilfiltration; kurz vor Gebrauch</p> <p>Zugabe von 2 mM ATP (pH 7,6)</p> <p>und</p> <p>5 mM Glutathion (pH 7,6)</p>

### 2.4.5 Probenpuffer für Proteine

Puffer	Zusammensetzung
2 x PPPC	100 mM Tris HCl (pH 6,8) 24 % Glycin 8 % SDS 0,02 % Coomassie-Blau 2 % $\beta$ -Mercaptoethanol Mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen

### 2.4.6 Puffer für SDS-Page

Puffer	Zusammensetzung
10 %-iges APS	1 g Ammoniumpersulfat (APS) mit ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml auffüllen
10 x SDS-Laufpuffer	10 g SDS 30 g Tris 144 g Glycin mit ddH <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen Für 1 x SDS-Laufpuffer 1:10 mit H <sub>2</sub> O verdünnen
12 %-iges Trenngel	1.800 $\mu$ l Bisacrylamid (29:1) 2.000 $\mu$ l Trizin-Puffer 650 $\mu$ l Glycerol 1.484 $\mu$ l ddH <sub>2</sub> O

	<p>60 µl APS 6 µl TEMED</p>
5 %-iges Sammelgel	<p>375 µl Bisacrylamid (29:1) 750 µl Trizin-Puffer 1.842 µl ddH<sub>2</sub>O 30 µl APS 3 µl TEMED</p>
Trizin-Gelpuffer	<p>3 M Tris 181,5 g 0,3 % SDS 15 ml (10 %) mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,45 einstellen und mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen</p>

#### 2.4.7 Puffer für Western Blot

Puffer	Quelle
1 x PBS-T	<p>1 x PBS 0,5 % Tween® 20</p>
Blocklösung	<p>1 x PBS-T 5 % Milchpulver</p>
Transferpuffer	<p>48 mM Tris-Base 39 mM Glycin 0,037 % SDS 20 % Methanol mit ddH<sub>2</sub>O auffüllen</p>

## 2.5 Enzyme

Enzym	Quelle
<i>Afl II</i>	New England Biolabs, Frankfurt
<i>Bam HI</i>	New England Biolabs, Frankfurt
DNase I	New England Biolabs, Frankfurt
SUPERaseIN®	Invitrogen
T7-RNA-Polymerase	Thermo Scientific, Darmstadt

## 2.6 Kit-Systeme

Kit	Quelle
GeneJet Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Scientific
GeneJet RNA Cleanup and Concentration Micro Kit	Thermo Scientific
Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System	Promega
Qubit™ Assay Kits	Thermo Scientific
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific

## 2.7 Nukleotide

Nukleotide	Quelle
Ribonukleosid-Triphosphate (NTPs)	Carl Roth

## 2.8 Antikörper

Antikörper	Quelle
Monoklonaler Anti-GAPDH (Maus)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Goat-anti-mouse IgG HOR	Life Technologies
Monoklonaler Mengo 3D Pol Antikörper (3B7; Maus)	Santa Cruz Biotechnology

## 2.9 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Quelle
<i>E.coli</i> TOP10F'	F- mcrA (mrr- hsdRMS- mcrBC) Φ80lacZ ΔM15 lacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu) 7697 ga/U ga/K rpsL (StrR) endA1 nupG	Invitrogen

## 2.10 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMC0	T7-Promoter, codierende Sequenz, beta-Laktamase	Ann Palmenberg, U. Madison, Wisconsin, USA
pMC0 3'-UTR-Mut	Basiert auf pMC0, mit Mutation in der 3'-UTR an der GARS-Bindungsstelle.	Dmitri E. Andreev
pMC0 mit HiBiT-Tag	Basiert auf pMC0, mit proteingekoppeltem HiBiT-Tag in P2-Region (Protein 2B).	Dimitar V. Nachev

pMC0 3'-UTR-Mut mit HiBiT-Tag	Basiert auf pMC0 3'-UTR-Mut, mit proteingekoppeltem HiBiT-Tag in P2-Region (Protein 2B).	Dimitar V. Nachev
pMC0 mit HiBiT-Tag und Polymerase-Defizienz	Basiert auf pMC0, mit proteingekoppeltem HiBiT-Tag in P2-Region (Protein 2B) und Mutation, welche die 3D Pol funktionsunfähig macht.	Dimitar V. Nachev
pMC0 3'-UTR-Mut mit HiBiT-Tag und Polymerase-Defizienz	Basiert auf pMC0 3'-UTR-Mut, mit proteingekoppeltem HiBiT-Tag in P2-Region (Protein 2B) und Mutation, welche die 3D Pol funktionsunfähig macht.	Dimitar V. Nachev

## 2.11 Marker

Marker	Größen	Quelle
HyperLadder® 1 kb	10.000, 8.000, 6.000, 5.000, 4.000, 3.000, 2.500, 2.000, 1.500, 1.000, 800, 600, 400, 200 [bp]	Bioline, Lichtenfels
PageRuler® Prestained Protein Ladder	180, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 [kDa]	Thermo Scientific, Darmstadt

## 2.12 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
HeLa	HeLa-Zellen sind humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms.	Bartenschlager Labor,

	Die Zellen waren vom HPV18 befallen.	Heidelberg, Deutschland
Neuro-2A (ATCC® CCL-131™)	Neuro-2A-Zellen sind Neuroblasten aus dem Gehirn einer Maus. Sie haben eine neuronale und amöboide Gestalt.	Merck
SK-N-AS	SK-N-AS-Zellen sind humane Neuroblasten, welche aus metastasiertem Knochenmark stammen. Ihre Morphologie ist epithelial.	Labor Till Acker, Gießen, Deutschland

## 2.13 Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Quelle
2 x DMEM	950 ml ddH <sub>2</sub> O 26,8 g DMEM-Pulver unter Rühren in ddH <sub>2</sub> O geben pH auf 4,1 mit HCl einstellen bei 121 °C für 20 min autoklavieren und dann auf RT abkühlen lassen 30 ml NaHCO <sub>3</sub> hinzugeben 1 % Penicillin/Streptomycin hinzufügen pH auf 7,2 bis 7,4 einstellen	Life Technologies
Kryomedium	DMEM 20 % FBS	Life Technologies

	10 % DMSO	
LB-Platten	400 ml LB-Medium 2 % Bacto Agar Sterilisation durch Autoklavieren	Carl Roth
Lennox Broth (LB) - Medium	Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 5 g/l Sterilisation durch Autoklavieren	Carl Roth
x % DMEM	DMEM x % Fetal Bovine Serum (FBS) 1 % Penicillin/Streptomycin	Life Technologies

### 3 Methoden

#### 3.1 Zellbiologische Methoden

##### 3.1.1 Auftauen von Zellen

Die gefrorenen Zellen werden in Kryomedium in Flüssigstickstoff bei - 196 °C gelagert. Will man die Zellen kultivieren, so lässt man sie im Wasserbad bei 37 °C auftauen und nimmt sie dann in ein Falcon mit 10 ml 10 % DMEM auf. Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 10 min mit ca. 250 rpm zentrifugiert. Das Medium wird abgenommen, man resuspendiert die Zellen in frischem Medium und überführt sie in eine sterile 25 cm<sup>2</sup> Kulturflasche. Jetzt werden sie im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> gelagert. Nach ungefähr 24 h wird das alte Medium entfernt, die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und neues Medium hinzugefügt, so kann man sicherstellen, dass der Großteil des toxischen DMSOs und die toten Zellen entfernt werden.

### **3.1.2 Einfrieren von Zellen**

Um eine beliebige Zelllinie zu erhalten, werden junge Passagen der in Kultur gehaltener Zellen eingefroren. Hierfür werden die Zellen zunächst mit 1 x PBS gewaschen dann mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst. Anschließend wird die Zell-Suspension in 10 % DMEM aufgenommen und in ein Falcon überführt. 10 µl werden zum Zählen (3.1.4) in der Neubauer-Zählkammer abgenommen und der Rest der Zell-Lösung wird bei 600 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen im Kryomedium (DMEM, 20 % FBS, 10 % DMSO) auf eine Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml gebracht. Je 1 ml wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einen auf 4 °C gekühlten Isopropanoltank bei - 40 °C über Nacht eingefroren. Am nächsten Tag konnten die Zellen in den Stickstofftank überführt werden und so bis zum Gebrauch bei - 196 °C gelagert werden.

### **3.1.3 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Die Zellen werden in sterilen Kulturflaschen im Inkubator gelagert, hier herrscht eine Temperatur von 37 °C und eine Kohlendioxidgehalt von 5 %. Regelmäßig sollte man die Zellen im Mikroskop betrachten, um zu entscheiden, ob sie neues Medium benötigen oder man sie in mehrere Kulturflaschen aufteilen sollte. Beträgt die Konfluenz ca. 80 – 90 %, sollten die Zellen in weitere Kulturflaschen aufgeteilt werden. So entfernt man tote Zellen und gibt den Lebenden die benötigten Nährstoffe für Wachstum und Vermehrung. Das Umsetzen der Zellen führt man durch, indem man das alte Medium abpipettiert, die Zellen mit 1 x PBS wäscht, sie dann mit 0,5 %-igem Trypsin-EDTA versetzt und sie für ca. 10 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen sollten sich nun vom Boden der Flasche lösen und es ist möglich sie in die Pipette aufzunehmen. Dies macht man, nachdem man die Wirkung des Trypsins mit 1 x DMEM (Verhältnis zu Trypsin sollte mindestens 1:1 sein) inhibiert hat. Nun kann man die Zellen in einem gewünschten Verhältnis separieren und sie in sterile Zellkulturflaschen überführen, diese werden dann mit 10 % DMEM aufgefüllt und wieder im Inkubator gelagert. Will man Zellen für ein Experiment aussäen, so löst man die Zellen wie oben beschrieben vom Boden der Kulturflasche ab, zählt sie aus (3.1.4) und pipettiert die vorher definierte Menge an Zellen auf die gewünschten

Platten. Auch jetzt wird 1 x DMEM und 10 % FBS hinzugefügt. Nach ungefähr 4 h kann man davon ausgehen, dass die Zellen wieder adhären sind.

### 3.1.4 Bestimmung der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer

Die Neubauer-Zählkammer hat eine Tiefe von 0,1 mm und lässt sich in vier große Quadrate unterteilen (rote Quadrate in Abbildung 10). Jedes dieser großen Quadrate hat ein Fassungsvermögen von 0,1 µl. Dieses Quadrat wiederum lässt sich in 16 kleine Quadrate unterteilen. Will man die Zellzahl einer Lösung bestimmen, so befestigt man ein Deckgläschen auf der Zählkammer und gibt 10 µl der Zellsuspension zwischen Deckglas und Neubauer Zählkammer. Die Zählkammer wird unter das Lichtmikroskop gelegt, man sucht sich ein großes Quadrat aus und zählt alle Zellen, die sich in den zugehörigen 16 kleinen Quadraten befinden. So geht man auch bei den übrigen drei großen Quadraten vor, addiert die Zellen und dividiert sie durch 4. Die resultierende Anzahl multipliziert man mit  $10^4$  und kommt so auf die Zellzahl pro Milliliter.

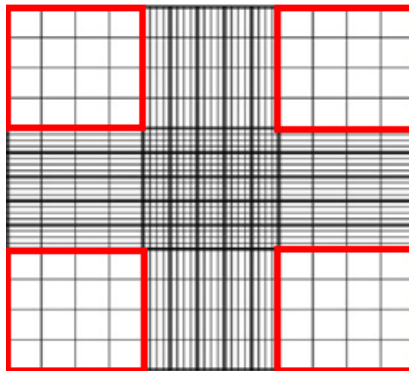


Abbildung 10. Schematische Darstellung der Neubauer-Zählkammer.

Verändert nach: <http://zaehlkammer.de/deutsch/neubauer.improved.html>

### 3.1.5 Elektroporation

Die Elektroporation nutzt man, um Zellen zu transfizieren. Durch einen kurzen Elektroimpuls wird die Membran der Zelle durchlässig und es ist nun möglich, dass eine Nukleinsäure in die Zelle eindringen kann. Die kultivierten Zellen werden mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin versetzt, dann für 5 min im Brutschrank inkubiert, vom Flaschenboden abgenommen und in 1 x DMEM aufgenommen. Nun zählt man mithilfe der Neubauer-Zählkammer die

Zellzahl. Für die Elektroporation von HeLa-Zellen sind  $10^7$  Zellen pro Milliliter nötig. Jetzt wird die ermittelte Menge der Suspension in ein 15 ml bzw. 50 ml Falcon überführt und für 5 min bei 700 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und auf das Pellet wird 1 x PBS gegeben. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 700 rpm. Das Pellet wird nun im Zytomix resuspendiert.

Je 400 µl des Zytomix-Zell-Mixes werden auf 1 pmol RNA gegeben, gemischt und dann in eine 4 mm Elektroporationsküvette überführt. Nun erfolgt die Elektroporation mit *square waves* für je 20 ms bei einer Spannung von 240 V. Direkt danach wird die Suspension in ein 15 ml Falcon überführt, welches 12 ml 1 x DMEM enthält. Von dieser Lösung werden je 1 ml in die Vertiefungen der 6-Well-Platte gegeben. Dann werden die Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Da viele Zellen die Elektroporation nicht überleben, gilt es, möglichst viele der toten Zellen zu entfernen. Dies erfolgt nach 6 h, indem man das Medium austauscht. Bis zur Zellyse werden die Zellen im Brutschrank inkubiert.

### 3.1.6 Lipofektion

Die Lipofektion stellt eine Alternative zur Elektroporation dar, um Nukleinsäuren in eine Zelle einzubringen. Ihr Vorteil ist es, dass man die Zellmembran nicht schädigt, ein Nachteil ist jedoch, dass man keinen Zeitpunkt Null bestimmen kann, zu dem man sicher sagen kann, dass zu diesem Zeitpunkt die Transfektion stattgefunden hat (3.1.5). Die RNA wird hier in Lipiden komplexiert und es entstehen Mizellen, diese können mit der Zellmembran verschmelzen und so kann die RNA ins Innere der Zelle gelangen. Für die Lipofektion säht man am Vortag 6-Well-Platten aus (3.1.3), sodass sie am Transfektionstag zu 90 % konfluent sind. Angepasst an die Verdopplungszeit der jeweiligen Zelllinien werden  $0,3 \times 10^6$  HeLa-Zellen,  $0,5 \times 10^6$  SK-N-AS-Zellen, sowie  $0,9 \times 10^6$  Neuro-2A-Zellen ausgesät. Pro 1 µg RNA verwendet man 3 µl Lipofectamine® und bereitet für jeden Ansatz zwei Lösungen wie folgt vor:

Lösung 1: 900 µl DMEM (0 % FBS) und 3 µl Lipofectamine® / 1 µg RNA

Lösung 2: 900 µl DMEM (0 % FBS) und RNA-Probe

Die beiden Lösungen werden gut durchmischt und anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann mischt man Lösung 1 mit Lösung 2 und inkubiert sie weitere 30 min, bevor man sie auf die am Vortag ausgesäten Zellen tröpfelt, welche bereits mit 1 x PBS gewaschen wurden. War die Transfektion erfolgreich, so beginnen die Zellen nun Viren zu synthetisieren, welche für weitere Experimente verwendet werden können. Da das bei der Lipofektion verwendete Medium kein FBS enthält, sollte nach ungefähr 3 h post-Transfektion das Medium durch DMEM (10 % FBS) ersetzt werden, um ein adäquates Wachstum zu gewährleisten. Nach 3 h kann man davon ausgehen, dass die Lipofektion zum größten Teil stattgefunden hat.

### **3.1.7 Infektionsreihe**

Die durch Lipofektion transfizierten Zellen produzieren virale Partikel, welches ins Medium freigegeben werden. 48 h nach der Transfektion kann man das Medium abnehmen und auf frisch ausgesäte Zellen pipettieren. Diese wurden am Vortag ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion zu 80 – 100 % konfluent sind. Vor der Infektion wird das Medium der Zellen entfernt und sie werden mit 1 x PBS gewaschen, um die lebenden von toten Zellen sowie auch von verbleibendem Medium zu befreien. In der Regel führt man bei einer Infektion eine Titration durch, indem man unterschiedliche Verdünnungsstufen verwendet.

### **3.1.8 Polymerüberschichtung**

Da die Zellen nach der Infektion Virionen synthetisieren und ins Medium freisetzen, würden diese Virionen überall weitere Zellen infizieren, und es würden keine definierten Plaques nach Fixieren und Färben der Zellen entstehen. Die Virionen sollen nur Zellen infizieren, welche zum Zeitpunkt der Infektion auf die Zellen pipettiert wurden, sowie direkt benachbarte Zellen. Um zu verhindern, dass während der Inkubationszeit der infizierten Zellen bis zum Zeitpunkt der Fixierung eine ungewollte Infektion durch neu entstandene Tochtervirionen im Kulturmedium stattfindet, werden die Zellen 2 h post-Infektion mit einem Polymer beschichtet. So wird sichergestellt, dass nur direkt benachbarte Zellen infiziert werden und dadurch definierte Plaques entstehen. Anwendung finden hier beispielsweise Agar und Agarose. Um trotzdem das Zellüberleben zu sichern, so wird dem Polymer 3 % FBS und 50 % 2 x DMEM beigefügt.

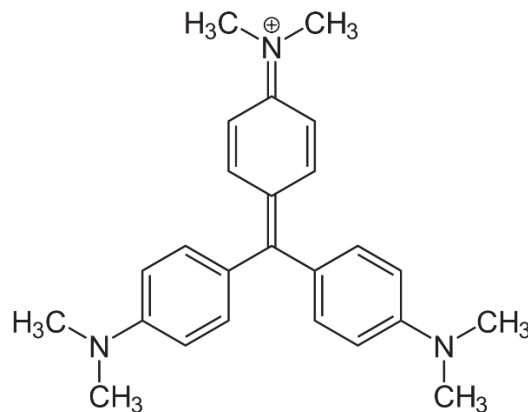
Für das Überschichten wird 2 %-iger Agar bzw. Agarose in der Mikrowelle erhitzt, die benötigte Menge in ein Falcon aliquotiert und dann im 55 °C vorgeheizten Wasserbad gelagert. So kann man sicherstellen, dass der Agar/die Agarose flüssig bleibt, dennoch nicht zu heiß ist, wenn man sie auf die Zellen gibt, sodass diese überhitzen und sterben. Hat der Agar/die Agarose eine Temperatur von ca. 55 °C, so mischt man sie im Verhältnis 1:1 mit 2 x DMEM und 3 % FBS, welches zuvor auf 37 °C erwärmt wurde. Nachdem die transfizierten bzw. infizierten Zellen gewaschen wurden, werden je 4 ml pro Well von der Agarose-Mischung vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Nach Inkubation im Brutschrank wird die nun festgewordene Schicht mithilfe eines sterilen Spatels abgenommen, ohne die am Boden befindlichen Zellen zu schädigen. Sofern Reste vorhanden sind, können diese mit 1 x PBS abgespült und entfernt werden. Nun kann mit der Fixierung und der Färbung der Zellen begonnen werden, um den Plaque Assay Test durchzuführen.

### **3.1.9 Plaque Assay**

Den Plaque Assay Test verwendet man, um eine Aussage über die Anzahl infektiöser viraler Partikel in einer zellfreien Lösung (Überstand) zu machen. Nach einer Infektion von Zellen mit Virionen kommt es zur Zellyse. Dies lässt sich auf einem konfluenten Zellrasen daran erkennen, dass nach anschließender Färbung freie Stellen, sog. Plaques, entstehen, welche nicht gefärbt wurden. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsstufen einer Infektionsreihe kann man beim Auszählen der Plaques auf die ungefähre Anzahl der viralen Partikel schließen. Dabei sollte man beachten, dass inaktivierte und nicht-infektiöse virale Partikel der Viruspopulation nicht erfasst werden und man folglich eher zu niedrige Werte durch Plaque Assays erfasst als zu hohe. Ab einer Verdünnungsstufe von 1:10.000 des MV kann man davon ausgehen, dass es sich bei jedem Plaque um ein Viruspartikel handelt.

Zur Fixierung der Zellen werden sie mit 3 %-igem PFA bedeckt und für 25 min inkubiert. Diese Fixierung ist notwendig, um die Zellen auf der 6-Well-Platte zu fixieren, damit sie beim Waschen nicht vom Untergrund gelöst werden. Des Weiteren sorgt man durch die Fixierung dafür, dass die Platte nicht mehr potentiell infektiös ist. Der Überstand an PFA wird anschließend wieder

abpipettiert und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen. Dann erfolgt die Färbung der Zellen mit Kristallviolett für weitere 10 min. Kristallviolett ist ein grüner Feststoff, der sich in polaren Lösungsmitteln intensiv lila löst. Es ist aus drei zentral verknüpften Benzolringen aufgebaut, die jeweils ein Amin gebunden haben (Abbildung 11). Es ist nicht fluoreszent und dient der Färbung von Nukleinsäuren. Dies macht man sich im Plaque Assay zunutze, um Zellen sichtbar zu machen.



**Abbildung 11. Chemische Strukturformel von Kristallviolett.** Zu erkennen sind drei zentral verknüpfte Benzolringe, die je eine tertiäre Amingruppe mit jeweils zwei Methylgruppen gebunden haben. Des Weiteren verfügt das Molekül über viele konjugierte Doppelbindungen und ist mesomeriestabilisiert. Verändert nach: [52]

Nach der Inkubation von Kristallviolett werden die Reste des Farbstoffs mittels 1 x PBS mehrmals abgewaschen, bis die Färbelösung vollständig entfernt wurde. Durch diese Färbetechnik ist es jetzt möglich, die entstandenen Plaques auf einer definierten Fläche auszuzählen.

### 3.2 Sequenzierung der Plasmid-DNA

Um zu überprüfen, ob es sich bei den eingesetzten Plasmiden wirklich um die MV-DNA handelt, werden sie von der Firma SeqLab in Göttingen sequenziert. Anhand der Vorgaben auf der Homepage von SeqLab wird das Plasmid auf eine Konzentration von 40 – 100 ng/μl verdünnt, sodass ein Volumen von 12 μl entsteht. Die Plasmide werden anschließend verschickt. Parallel werden auf der Homepage von SeqLab die entsprechenden Primer in einem Abstand von ca. 900 bp designed. Die Firma sendet die eingeschickte Sequenz in Form der Basenabfolge zurück und man kann die Reihenfolge nun mit der vorliegenden

Plasmidkarte vergleichen. Im Fall der eingeschickten MV-DNA aus unserem Labor konnte durch diese Verfahren bestätigt werden, dass es sich tatsächlich um MV-DNA handelt.

### 3.3 Mikrobiologische Methoden

#### 3.3.1 Bakterienkultivierung

Für die Standard Transformation der Plasmide wird der *E. coli* Stamm *TOP10F'* benötigt. Die Bakterien werden erst auf LB-Agarplatten kultiviert und dann im LB-Flüssigmedium herangezogen. Die Media enthalten 150 µg/ml Ampicillin, da die Plasmide eine Ampicillin-Resistenz tragen und man so nur die Bakterien, welche die Antibiotika-Resistenz besitzen, kultiviert.

#### 3.3.2 Standard Transformation

Eine Transformation beschreibt die Aufnahme eines kompetenten Bakteriums von „nackter“ DNA aus der Umwelt, also ohne virale Beteiligung. Bei gram-positiven Bakterien erfolgt die Bindung der DNA an ein sog. Kompetenzprotein. Bei gram-negativen Bakterien, also bei dem auch hier verwendeten Stamm von *E. coli*, erfolgt ein Import der DNA durch einen Sekretin-Kanal, der sich in der äußeren Membran befindet. Durch die innere Membran gelangt die DNA durch weitere Transporter. In der Natur findet sich dieser Mechanismus beispielsweise bei der Entstehung von Antibiotika-Resistenzen.

Zur Transformation der gereinigten Plasmid-DNA eignet sich die Standard Transformation, welche der Vervielfältigung der DNA dient. Dies geschieht, indem man die Nukleinsäure gezielt in kompetente Bakterien einbringt. Die *E. coli TOP10F'* werden auf Eis aufgetaut, davon werden 100 µl mit 1 µg der Plasmid-DNA gemischt. Es erfolgen eine 30 min Inkubation auf Eis und ein Hitzeschock für 2 min bei 42 °C. So wird gewährleistet, dass die Poren sich öffnen und die Nukleinsäure aufgenommen werden kann. Nach 1 min Abkühlung auf Eis, wird 1 ml LB-Medium hinzugegeben und die *TOP10F'* Bakterien werden bei 30 °C für eine Stunde auf dem Heizblock geschüttelt (ca. 160 rpm). Die Bakterien werden für 5 min bei 3.500 rpm abzentrifugiert, 900 µl des Überstands werden entfernt und mit dem Rest Medium wird das Pellet resuspendiert. Nun kann man von

dieser Suspension 100 µl auf eine Selektions-Agarplatte mit Ampicillin ausplattieren und über Nacht bei 30 °C inkubieren lassen.

### **3.3.3 Kultivieren der Bakterien im Flüssigmedium**

Zur Überführung der auf dem Nährmedium gewachsenen Klone in Flüssigmedium wird je ein Klon in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Dieses enthält 4 ml LB-Flüssigmedium und 150 µg/ml Ampicillin. Der Transfer erfolgt mithilfe einer 200 µl Pipettenspitze. Anschließend wird die angeimpfte Vorkultur bei 30 °C auf dem Schüttler und 140 rpm über Nacht inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass der Deckel nicht komplett geschlossen ist, damit eine Sauerstoffzufuhr gewährleistet ist. Danach wird die Hauptkultur angesetzt. Dafür wird die Vorkultur 1:1.000 bis 1:10.000 in 250 ml LB-Flüssigmedium, das ebenfalls 150 µg/ml Ampicillin enthält, überführt. Angesetzt wird die Hauptkultur in einer 500 ml Flasche mit Schikanen (nach innen gerichteten Vorsprüngen), damit das Medium gut durchmischt wird und so die sich vermehrenden Bakterien eine ausreichende Sauerstoffversorgung haben. Die Hauptkultur wird über Nacht bei 30 °C auf dem Schüttler inkubiert.

### **3.3.4 Plasmid-DNA-Maxipräparation**

Um große Mengen der Plasmid-DNA aus den zuvor transformierten Bakterien zu isolieren, verwendet man die Plasmid-Maxipräparation. Diese wird mit dem GeneJet Plasmid Maxiprep Kit von Thermo Scientific durchgeführt.

Im Anschluss an die Transformation erfolgte eine Inkubation der Bakterien über Nacht. Die Hauptkultur wird nun für 10 min bei 5.000 rpm zentrifugiert (4 °C), sodass anschließend der Überstand verworfen werden kann und ein Pellet übrigbleibt. Dieses Pellet wird in 6 ml der Resuspensionslösung, welche im Kit enthalten ist, durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Anschließend werden 6 ml der Lyse-Lösung hinzugefügt. Die Lyse Lösung enthält 5 mg/ml Lysozym und RNase I. Das Röhrchen wird mehrmals invertiert und dann für 3 min bei RT inkubiert. Die alkalische Lyse-Lösung sorgt chemisch dafür, dass die Zellwände der Bakterien sich auflösen und so die Plasmid-DNA frei wird. Das SDS, welches in der Lyse-Lösung enthalten ist, sorgt dafür, dass die doppelsträngige DNA denaturiert. Es ist darauf zu achten, dass die Inkubation nicht mehr als 3 min

erfolgt. Danach werden 6 ml Neutralisations-Lösung hinzugefügt und das Röhrchen ebenfalls mehrmals invertiert. Durch die Zugabe der Neutralisations-Lösung lagern sich die Plasmid-DNA-Einzelstränge wieder aneinander und die Proteine werden ausgefällt. Dieser Neutralisationsvorgang gewährleistet die Trennung von genomischer und Plasmid-DNA, da die Plasmid-DNA schneller renaturiert. Folglich wird die genomische DNA bei dem nachfolgenden Zentrifugationsschritt im Pellet verbleiben. Nun werden 0,8 ml Endotoxin-bindendes Reagenz in das Zentrifugenröhrchen pipettiert, mehrfach invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 20.000 rpm kann der nun entstandene Überstand in ein 50 ml Röhrchen überführt werden. Zurück bleibt ein Pellet, welches die Zellüberreste sowie die chromosomale DNA enthält und verworfen wird. Zum Überstand wird ein Volumen 96 %-iges Ethanol pipettiert und mehrmals invertiert. Das Gemisch wird in eine Aufreinigungssäule überführt und bei 2.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Diese Aufreinigungssäule enthält eine Matrix aus Kieselgel (engl. *silica membrane*), die bei hohem pH durch polare Wechselwirkungen die Plasmid-DNA bindet. So kann sichergestellt werden, dass die Plasmid-DNA in der Säule verbleibt, während alles andere durchgespült wird. Man entfernt die Flüssigkeit und gibt 8 ml der Waschlösung I auf die Aufreinigungssäule, zentrifugiert sie für 2 min bei ca. 3.000 rpm und entfernt die Flüssigkeit. Jetzt gibt man Waschlösung II auf die Säule, zentrifugiert auch diese für 2 min bei 3.000 rpm und entfernt die Lösung wieder. Dieser Waschschrift wird einmal wiederholt, bevor das Röhrchen mit der Aufreinigungssäule erneut für 5 min bei 3.000 rpm zentrifugiert wird. Dies führt dazu, dass die letzten Reste der Waschlösung aus der Säule entfernt werden. Die Säule wird nun in ein frisches Röhrchen überführt und mit 1 ml Elutionspuffer versetzt. Es erfolgt erst eine Inkubation bei RT für 2 min und dann eine 5-minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm. Der Elutionspuffer enthält einen leicht basischen Tris-EDTA-Puffer (TE-Puffer), der dafür sorgt, dass die DNA von der Matrix des Kieselgels abgelöst wird. Nun kann die Säule entfernt werden und man erhält im Eluat die reine Plasmid-DNA.

### 3.4 Molekularbiologische Methoden

#### 3.4.1 Verdau mit Restriktionsenzymen der Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, von denen viele an palindromischen Sequenzen schneiden. Entdeckt wurden sie erstmals in Bakterien, in denen sie als eine Art Immunsystem fungieren, indem sie Bakteriophagen-DNA nach einer Infektion schneiden und so unschädlich machen können. Durch diese Einschränkung (Restriktion) des Wachstums der Bakteriophagen ergab sich die Bezeichnung "Restriktions"-Enzym. Es besteht die Möglichkeit, dass *sticky ends* (Schnitte mit Sequenzüberhängen) oder *blunt ends* (glatte Schnitte) entstehen. Der Verdau mittels Restriktionsenzymen ermöglicht es, dass die DNA an einer spezifischen – uns bekannten – Stelle geschnitten wird. Dies erlaubt uns, die DNA zu identifizieren und Aussagen über ihre Sequenz zu machen, indem man die geschnittene DNA anschließend auf ein Agarose-Gel aufträgt und die Größe der Banden anhand eines ebenfalls aufgetragenen Markers bestimmt. Außerdem kann man so Plasmid-DNA linearisieren und den gewünschten Abschnitt, beispielsweise das Virus, aus dem Plasmid isolieren. Der Restriktionsendonukleasenverdau wurde nach den Herstellerangaben von New England Biolabs durchgeführt.

Bestandteil	Endkonzentration
Plasmid-DNA	1 µg
<i>Bam</i> HI HF & <i>Afl</i> II	20 U
Puffer (CutSmart 10 x für <i>Bam</i> HI & <i>Afl</i> II)	1 x
ddH <sub>2</sub> O	Auf 50 µl auffüllen

Tabelle 2. Bestandteile und Endkonzentrationen für den analytischen Restriktionsendonukleasen-Verdau von Plasmid-DNA.

Um das Virus aus dem Plasmid von den anderen Vektorsequenzen zu isolieren, wurde vor den *in vitro* Transkriptionen stromabwärts des Virus-Inserts eine Linearisierung mittels *Bam* HI durchgeführt.

Bestandteil	Endkonzentration
Plasmid-DNA	20 µg
<i>Bam</i> HI	20 U
CutSmart Puffer 10 x	1 x
ddH <sub>2</sub> O	Auf 50 µl auffüllen

Tabelle 3. Bestandteile und Endkonzentrationen für den Restriktionsendonukleasenverdau mittels *Bam* HI welche zur Linearisierung der Plasmid-DNA verwendet wurden.

### 3.4.2 Phenol-Chloroform-Extraktion und Alkoholfällung

Nach dem Restriktionsverdau mit *Bam* HI (3.4.1) sowie nach der *in vitro*-Transkription (3.4.3) erfolgt eine Aufreinigung der DNA bzw. RNA mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion. Phenol denaturiert Proteine, und ein Teil der Proteine löst sich auch in der Phenolphase und wird dadurch entfernt.

Zuerst füllt man den Ansatz auf ein Volumen von 200 µl auf. Dann gibt man ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol hinzu, dieser Schritt geschieht unter dem Abzug. Nun wird der Ansatz durch vortexen gut gemischt und anschließend bei Raumtemperatur und 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstehen im Eppendorf-Gefäß zwei Phasen. Die obere Phase besitzt eine geringere Dichte als die untere, es handelt sich um die wässrige Phase, in welcher sich die Nukleinsäure befindet. Dieser Überstand wird abpipettiert und in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die untere – organische – Phase kann verworfen werden, in dieser befindet sich ein Großteil der Proteine. Zu dem Überstand wird nun 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M) beigefügt sowie 2,5 Volumen 100 %-iges Ethanol. Nach gutem Mischen wird der Ansatz für mindestens 15 min im Gefrierschrank gelagert. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation bei 4 °C für 20 min bei 14.000 rpm. Nach der Zentrifugation lässt sich am Boden des Gefäßes ein weißes Pellet erkennen, da nach Zugabe von Salz und Alkohol Nukleinsäuren gefällt werden. Die Nukleinsäuren werden in Alkohol ausgefällt, da Alkohole weniger polar sind als Wasser und somit die Löslichkeit der Nukleinsäuren im Alkohol geringer ist als die in Wasser, somit

entzieht die Zugabe von Alkohol der DNA Wasser. Gibt man zusätzlich ein Salz (z.B. Natriumacetat) hinzu, so wird die Löslichkeit der DNA weiter gesenkt, da diese negativ geladen ist und teilweise durch die Natriumionen gebunden und so in einen ungeladenen und damit unlöslichen Zustand überführt werden kann. Man pipettiert den Überstand ab, verwirft ihn und gibt ca. 700 µl 70 %-iges Ethanol auf das Pellet, um es zu reinigen. Nach einer weiteren Zentrifugation (4 °C bei 14.000 rpm) wird die wässrige Phase verworfen und das nun entstandene Pellet getrocknet. Nach kurzer Zeit nimmt man es in 40 µl destilliertem Wasser auf und resuspendiert es. Anschließend wird mithilfe des Qubit (3.4.6) die Konzentration der nun weitgehend reinen Nukleinsäure gemessen.

### 3.4.3 Transkription – *in vitro*

Die Transkription dient dazu, die DNA-Sequenz in eine RNA-Sequenz umzuschreiben. Eine RNA-Polymerase synthetisiert eine einzelsträngige RNA aus NTPs. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte RNA-Polymerase ist eine T7-RNA-Polymerase, d.h. sie beginnt die Transkription spezifisch am T7-Promotor. Um die frisch transkribierte RNA vor RNasen zu schützen, benutzt man einen RNase-Inhibitor.

Der unten beschriebene Reaktionsansatz wird vorerst für 2 h bei 37 °C inkubiert, dann wird nochmals 1 µl T7-RNA-Polymerase hinzugefügt, so erhöht man die Transkriptionsrate und kann somit mehr RNA gewinnen. Nun wird der Ansatz weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Um zu überprüfen, ob RNA entstanden ist, kann man 3 µl der Probe mit einem Ladepuffer versetzen, sie auf ein 0,8 %-iges Agarosegel auftragen und die Bandenlängen mit einem Marker vergleichen. Sollte die Bande so groß sein, wie von der RNA zu erwarten ist, und undegradiert erscheinen, so kann man nun mit dem DNase I Verdau beginnen (3.4.4).

Bestandteil	Endkonzentration
rNTPs (ATP, GTP, UTP, CTP)	3,750 µM
Destilliertes Wasser	auf 100 µl mit ddH <sub>2</sub> O auffüllen
DNA-Template	20 µg/ml
DTT	10 µM

MgCl <sub>2</sub>	5 mM
Puffer (RNA-Polymerase-Reaction-Buffer)	1 x
RNase-Inhibitor (SUPERase In®)	1 µl
T7-RNA-Polymerase	1 U/µl

Tabelle 4. Bestandteile und Endkonzentrationen der *in vitro* Transkription.

#### 3.4.4 Verdau mit DNase I

Der Verdau mittels DNase I nach einer *in vitro* Transkription dient dazu, die DNA – welche man als Template verwendet hat – aus dem Ansatz zu entfernen. Die DNase I ist eine Endonuklease, die die Nukleotide des DNA-Templates abbaut und Di-, Tri- und Oligonukleotide schneiden kann. So erhält man schließlich die reine RNA. Dem Ansatz mischt man den DNase I Puffer und die DNase I bei und inkubiert ihn bei 37 °C für eine Stunde. Mittels der Phenol-Chloroform-Extraktion (3.4.2) kann man die RNA reinigen und dann mithilfe des Qubit® (3.4.6) die Konzentration dieser RNA bestimmen.

Bestandteil	Endkonzentration
DNase I	1 U/µl
Puffer (DNase I Buffer) 10 x	1 x

Tabelle 5. Bestandteile und Endkonzentrationen zum DNase I Verdau.

#### 3.4.5 Nachweis von Nukleinsäuren mittels Agarose-Gelelektrophorese

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese kann man Nukleinsäuren ihrer Größe nach auftrennen. Da die DNA negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode durch das Gel, welches als molekulares Sieb fungiert. Große Fragmente wandern langsamer als kleine, und so werden die Nukleinsäuren während ihrer Wanderung durch das Gel ihrer Größe nach aufgetrennt. Die Porengröße lässt sich variieren, indem man die Agarose-

Konzentration verändert. Ist die Konzentration der Agarose hoch, so kommt es zu einer stärkeren Vernetzung und die Poren sind kleiner. Man sollte sich also, wenn man ein Agarosegel herstellen will, daran orientieren, wie groß die verwendete Nukleinsäure ist und dementsprechend die Agarose-Konzentration anpassen.

Nach einer Transkription sowie nach einem Restriktionsverdau wird je ein 0,8 %-iges Agarose-Gel hergestellt, um die DNA bzw. RNA nachzuweisen. Um ein 0,8 %-iges Agarose-Gel herzustellen, verwendet man 0,4 g Agarose-Pulver und gibt 50 ml 1 x TBE hinzu. Dies wird in der Mikrowelle erwärmt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hat. Parallel bereitet man einen Gelschlitten vor und setzt einen geeigneten Kamm ein. Die Auswahl des Kammes orientiert sich an der Anzahl der Proben sowie an deren Volumen. Die flüssige Agarose wird nun in den Gelschlitten gegossen und erhärtet nach ca. 20 min bei Raumtemperatur vollständig. Ist die Agarose fest, so kann der Kamm entfernt und die jetzt entstandenen Taschen vorsichtig mit dem Puffer gespült werden, sodass alle Gelreste vollständig entfernt sind. Die Proben versetzt man nun mit einem Ladepuffer und füllt sie in die Taschen des Gels ein. Der Ladepuffer enthält Glycerin, welches die Probe beim Einfüllen in die Tasche absinken lässt. Zudem enthält er meist auch zwei blaue Farbstoffe, die eine Aussage darüber erlauben, wie weit die Elektrophorese nach Anlegen der Spannung fortgeschritten ist und der Orientierung dienen können. Eine Tasche befüllt man außerdem mit einem geeigneten Marker, um die später sichtbaren Banden anhand ihrer Lage mit dem Marker vergleichen zu können und so auf die ungefähre Länge der untersuchten Banden schließen zu können. Das Gel wird nun für ca. 45 min bei 120 V laufen gelassen und anschließend im Ethidiumbromid-Bad (400 ml 1 x TAE und 80 µl Ethidiumbromid) für 20 min inkubiert und so gefärbt. Ethidiumbromid ist ein interkalierender Farbstoff, der sich in die große Furche der Nukleinsäuren lagert und im UV-Licht fluoresziert. Dies macht man sich zu Nutze, um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen.

#### **3.4.6 Fluorometrische Bestimmung der Konzentration mittels Qubit®**

Der Qubit® macht es möglich, die Konzentration von Proteinen sowie auch von Nukleinsäuren zu bestimmen. Für DNA, RNA und für Proteine gibt es jeweils ein

spezifisches Qubit® Assay Kit, mit welchem man sicherstellt, dass der Fluoreszenzfarbstoff an das gewünschte Zielmolekül binden wird. Diese Konzentrationsbestimmung ist notwendig, um die genaue Menge an Protein, DNA oder RNA zu ermitteln, die für die nachfolgenden Versuche benötigt werden. Nach dem Mischen der Komponenten werden diese bei RT inkubiert und anschließend gemessen.

<b>Bestandteil</b>	<b>Menge</b>
Puffer	198 µl
Fluoreszenz-Farbstoff	1 µl
Probe	1 µl

**Tabelle 6. Bestandteile und Mengen zu den Bestimmungen der Konzentrationen von Nukleinsäuren und Proteinen mittels Qubit®.**

### **3.5 Proteinbiochemische Methoden**

#### **3.5.1 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot**

Der Western Blot dient der spezifischen Detektion von Proteinen. Er bezeichnet den Transfer der Proteine von einem Gel, das zuvor durch die Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt wurden, auf eine Trägermembran.

Für den Western Blot (WB) werden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät (3.1.3). Die adhärennten Zellen werden mit 1 x PBS gewaschen, anschließend wird 250 µl Lyse-Puffer hinzugegeben und für 20 min bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach nimmt man die Zellen mit dem Lyse-Puffer in ein Eppendorf-Gefäß auf. Um die Zellkerne und andere Zelltrümmer weitestgehend aus der Suspension zu entfernen, erfolgt eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 20 min und bei 4 °C. Nun wird der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufzutrennen, verwendet man die SDS-PAGE. Das anionische Detergenz SDS sorgt für ein gleichmäßiges Ladungs-Masse-Verhältnis, indem es sich an die denaturierten Proteine anlagert, sie weitgehend

entfaltet und ihnen negative Ladungen verleiht. Die Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgt dann im Molekularsieb des Gels durch Anlegung von Spannung. Das Polyacrylamid-Gel besteht aus Bisacrylamid und Acrylamid, welches durch die Reaktion mit N,N,N,N',N'-Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) polymerisiert. Das Gel besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel.

<b>Bestandteil</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>	<b>Trenngel (12 %)</b>
40 % Bisacrylamid (29:1)	375 µl	1.800 µl
Trizin-Puffer	750 µl	2.000 µl
Glycerol	-	650 µl
ddH <sub>2</sub> O	1.842 µl	1.484 µl
APS	30 µl	60 µl
TEMED	3 µl	6 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>3 ml</b>	<b>6 ml</b>

**Tabelle 7. Bestandteile zur Herstellung eines Trenngels, sowie eines Sammelgels für die SDS-PAGE.**

Nachdem man zwei saubere Glasplatten zwischen den Gelgießständern eingespannt hat, kann das Gel eingefüllt werden. Zuerst gießt man das frisch angesetzte Trenngel bis ca. 1 cm unter den Kamm. Damit die Oberfläche des Trenngels weitestgehend gleichmäßig ist, überschichtet man das Gel direkt nach dem Gießen mit Isopropanol. Ist das Trenngel polymerisiert, so kann das Isopropanol entfernt werden, das Sammelgel gegossen und anschließend der Kamm vorsichtig eingesetzt werden. Sobald das gesamte Gel vollständig ausgehärtet ist, kann der Kamm entfernt werden und das Gel mitsamt den umgebenden Glasplatten in die SDS-Gelelektrophorese-Kammer überführt werden, welche bereits mit SDS-Puffer gefüllt ist. Mit dem SDS-Puffer wäscht man nun auch die Taschen gründlich aus, sodass die Gelreste vollständig entfernt werden. Die Proben werden mit 1 x PPC gemischt, für 10 min bei 95 °C inkubiert (Denaturierung) und dann in die Taschen des Polyacrylamidgels gefüllt. Um die Proteingrößen vergleichen zu können, wird in die erste Tasche

5 µl eines Protein-Größenstandards gefüllt, z.B. Page Ruler®. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 120 V.

Um die Proteine, welche zuvor durch die SDS-Page aufgetrennt wurden, auf eine Membran zu übertragen, folgt anschließend an die Elektrophorese ein Western Blot. Diese Übertragung dient dazu, dass man die Proteine später immunochemisch nachweisen kann. Die Polyvinylidenfluorid-Membran bindet die Proteine durch hydrophobe Wechselwirkungen und mittels elektrischen Stroms. In der vorliegenden Arbeit wurde das „halb-trockene“ (engl. *semi-dry*) Verfahren angewendet. Die Membran wird dafür für 1 min in Methanol aktiviert, so wird gewährleistet, dass die Hydrophobie der Membran etwas abgeschwächt wird. Parallel werden die Filterpapiere (sog. *Whatman-Paper*; pro Gel sind vier Papiere nötig) in Transferpuffer eingelegt. Jetzt werden zwei Filterpapiere auf die Anode gelegt, dann die Membran, das Trenngel – das Sammelgel wurde vorher sorgfältig abgetrennt – sowie zwei weitere Filterpapiere. Es ist darauf zu achten, dass sich unter der Membran keine Luftblasen mehr befinden, um sicherzustellen, dass die gesamte Membran mit Puffer bedeckt ist und der Elektrotransfer der Proteine überall auf die Membran stattfinden kann. Nun kann der Kathodendeckel aufgesetzt werden und es wird eine Spannung von 43 mV pro Gel (ca. 0,8 mV pro cm<sup>2</sup>) für 90 min angelegt. In dieser Zeit werden die Proteine vom Trenngel auf die Membran übertragen („*geblottet*“).

Um die Proteine auf der Polyvinylidenfluorid-Membran spezifisch detektieren zu können, muss nun ein Nachweis mittels Chemilumineszenz erfolgen. Dafür wird die Membran so geschnitten, dass nur der Anteil der Membran übrigbleibt, auf dem sich die zu detektierenden Proteine befinden. Jetzt wird die Membran in einer 5 %-igen Blocklösung aus Milchpulver und 1 x PBS über Nacht bei 4 °C auf dem Schüttler inkubiert. Es wird eine 1 ml 5 %-ige Milchpulver-Lösung in 1 x PBS angesetzt, in welche die primären Antikörper pipettiert werden und gleichmäßig in der Lösung verteilt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden als primäre Antikörper der monoklonale GAPDH-Antikörper (Maus) von Sigma Aldrich, sowie der monoklonale Mengo 3D Pol Antikörper (3B7; Maus) von Santa Cruz Biotechnology verwendet. Ist die Inkubationszeit mit der Blocklösung vorbei, so kann diese verworfen werden und die Membran vorsichtig zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt werden. Nun wird die Milchpulverlösung, welche die

primären Antikörper enthält, auf die Oberseite der Membran pipettiert, die Folie wieder umgeklappt und sich eventuell gebildete Blasen sorgfältig zwischen der Folie und der Membran herausgestrichen. Es erfolgt eine weitere Inkubation bei RT für 1 h. Anschließend wird die Membran 3 x für 10 min in 1 x PBS-T gewaschen. Um auch den sekundären Antikörper inkubieren zu können, wird erneut eine 5 %-ige Blocklösung angesetzt und der sekundäre Antikörper hinzugefügt. Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich hier um den Goat-anti-mouse IgG HOR (engl. *horseradish peroxidase*, HOR) von Life Technologies. Die gewaschene Membran wird wieder zwischen zwei frische Klarsichtfolien gelegt und mit der angesetzten Lösung beträufelt. Die Inkubation erfolgt wie bei den primären Antikörpern beschrieben wurde, sowie auch das anschließende Waschen mit 1 x PBS-T. Um die Proteine mittels Chemilumineszenz detektieren zu können, wird SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate® nach Angaben des Herstellers auf die Membran pipettiert und für 5 min im Dunkeln bei RT luftblasenfrei inkubiert. Der sekundäre Antikörper (Goat-anti-mouse IgG HOR) enthält eine Meerrettichperoxidase. Dieses Enzym kann in der Anwesenheit von Peroxiden Luminol oxidieren, was dann zur Chemilumineszenz führt. SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate® enthält Luminol, und folglich kann das Chemilumineszenz-Signal mittels Röntgenfilmen detektiert werden.

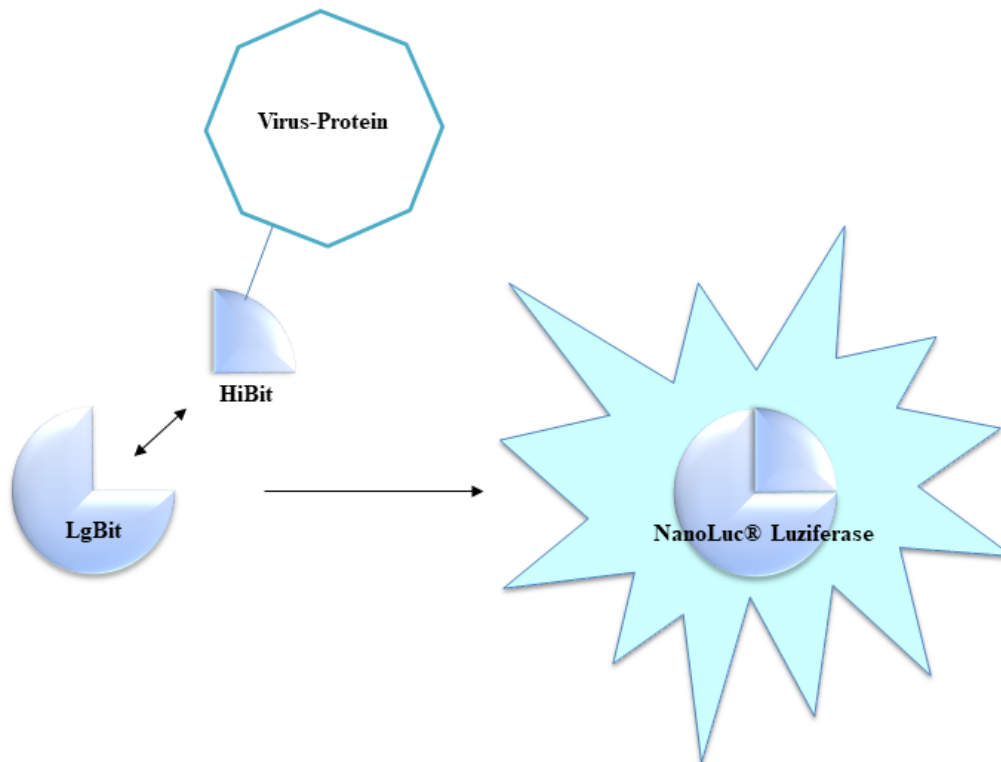
Die Flüssigkeit wird dann weitestgehend entfernt, und die Membran wird für 10 min mit einem Röntgenfilm unter Lichtschutz bedeckt. Nun wird der Röntgenfilm für 1 min in eine Entwicklerlösung getaucht, dann mit Wasser gespült und für 1 min in eine Fixierlösung überführt. Diese Schritte werden in einer Dunkelkammer durchgeführt, sodass man sicherstellen kann, dass der Röntgenfilm nur Rotlicht ausgesetzt wird. Nachdem der Film in der Fixierlösung inkubiert wurde, wird er ausgiebig mit Wasser gewaschen. Es ist nun möglich, ihn im Weißlicht zu begutachten und aufgrund der auftretenden schwarzen Banden Rückschlüsse auf das Vorhandensein und die Größe der Proteine zu ziehen. Auch kann man anhand der Dicke der Banden eine relative quantitative Aussage über die Proteine machen.

### 3.5.2 Luciferase Assay mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System

Mittels Luciferase Assays kann die Translationseffizienz von Proteinen quantitativ biolumineszent bestimmt werden. Luciferasen sind Enzyme, welche die Oxidation von Luciferinen mit Sauerstoff zu Dioxetanen bzw. Dioxetanonen katalysieren. Dioxetane und Dioxetanonen sind sehr energiereich und instabil, bei ihrem Zerfall kommt es zur Biolumineszenz. In der Natur werden Luciferine von verschiedenen Organismen, z.B. Glühwürmchen, zur Lichterzeugung genutzt. Dieses Reaktionssystem kann man sich auch in der Forschung zunutze machen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Translationseffizienz der viralen MV-Proteine in Abhängigkeit von Mutationen in der GARS-Bindungsstelle in der 3'-UTR des Genoms mit Hilfe von Luciferase-Assays analysiert werden. Hierfür wurde das High Binary Technology (HiBiT) System von Promega verwendet. Das duale System besteht aus einem 11 Aminosäuren langen Tag, welcher als Fusionsprotein in Zellen exprimiert werden kann. Zur Detektion wird ein Lyse-Reagenz auf die Zellen gegeben, welches u.a. das 156 Aminosäuren lange LargeBit Protein enthält.

Das LargeBit und das HiBiT haben eine sehr hohe Affinität ( $K_D = 190 \mu\text{M}$ ) zueinander und lagern sich bei Auftreffen ineinander. Zusammen formen die beiden Untereinheiten ein lumineszentes Enzym. Diese NanoLuc® Luciferase ist ein 19,1 kDa großes Enzym, welches für das System NanoLuc® Binary Technology (Nano-BiT®) entwickelt wurde [53, 54]. Die Lumineszenz, welche bei der Spaltung des im NanoGlo® HiBiT Lytic Detection Reagent enthaltenen Substrats frei wird, ist proportional zur Menge der mit dem HiBiT markierten viralen Proteine (Abbildung 12). Aufgrund dessen ist es möglich, eine sehr genaue quantitative Aussage über die Stärke der Protein-Expression mittels HiBiT-Detektionen zu machen.



**Abbildung 12. Schematische Darstellung des Prinzips des Luciferase-Assays.** LargeBit (LgBit), welches im NanoGlo® HiBiT Lytic Detection Reagent enthalten ist, bindet aufgrund der hohen Affinität an das HiBiT, welches an ein virales Protein gekoppelt ist. Zusammen formen sie ein funktionelles Enzym (katalytische Aktivität liegt größtenteils beim HiBiT), die NanoLuc® Luciferase. Spaltet sie das Substrat, welches ebenfalls im NanoGlo® HiBiT Lytic Detection Reagent vorhanden ist, so entsteht eine Lumineszenz, welche mittels Luminometer detektiert werden kann.

Eine für das HiBiT-Polypeptid codierende Sequenz bestehend aus 33 Nukleotiden wurde zunächst in die gewünschten Plasmide kloniert (Abbildung 39). Diese Klonierung wurde in der AG Niepmann von Dimitar V. Nachev durchgeführt. HiBiT wurde an die codierende Sequenz des viralen 2B-Proteins angehängt. Dabei ist darauf zu achten, dass die Insertion die Expression des Polyproteins nicht stört, sodass das Virus weiterhin replizieren kann.

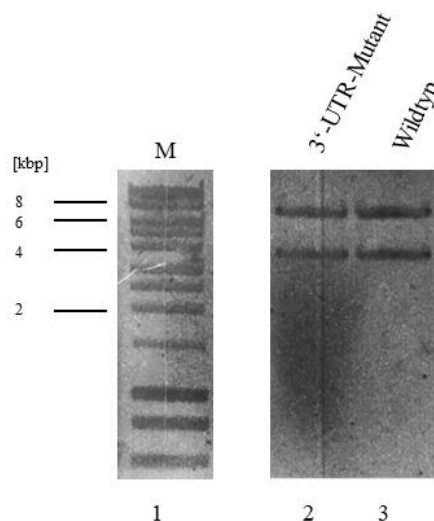
Für die Detektion werden Zellen am Vortag in 12-Well-Platten ausgesät (3.1.3), sodass sie zum Zeitpunkt der Transfektion zu fast 100 % konfluent sind. Es wurde  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen,  $2,1 \times 10^5$  SK-N-AS-Zellen, sowie  $3,8 \times 10^5$  Neuro-2A-Zellen ausgesät. Zur Probenentnahme (nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h) und Detektion wird das Medium der Zellen abpipettiert, und sie werden mehrfach mit 1 x PBS gewaschen. Da das hier verwendete Medium (DMEM)

Phenolrot enthält, welches eine schwache Lumineszenz zeigt (Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System, Instructions for Use of Products, S. 21) müssen die Zellen vor der Messung gründlich gewaschen werden. Die Luciferase-Aktivität ist stark temperaturabhängig, und es sollte daher darauf geachtet werden, dass die Zellen sowie auch das HiBiT Lytic Reagent zum Zeitpunkt der Messung annähernd Raumtemperatur besitzen. Pro Well werden 60 µl 1 x PBS und 60 µl Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent auf die Zellen pipettiert. Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent wird kurz vorher aus 1:100 LargeBit Protein, 1:50 Nano-Glo® HiBiT Lytic Substrate und Nano-Glo® HiBiT Lytic Puffer angesetzt. Es erfolgt eine Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Jetzt werden die lysierten Zellen mit dem Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagent in die Pipette aufgenommen und in ein Luminometer-Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird nun in die vorgesehene Öffnung des Luminometers gestellt, und es wird die Lumineszenz in relativen Lichteinheiten (engl. *relative light units*; RLU) der Proben gemessen. Die Messung erfolgt mit dem Luminometer Lumat 9501 (Berthold Technologies) für 2 s.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellen der MV-RNA

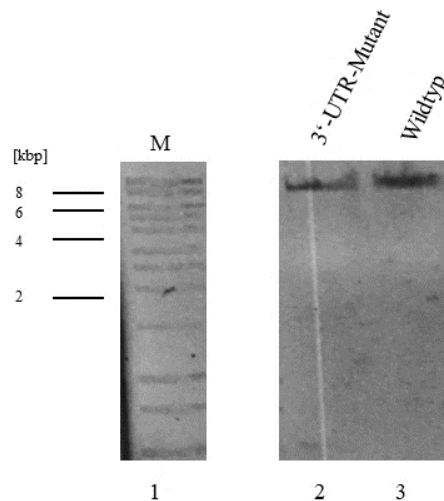
Die beiden MV-Plasmide (pMC0 und pMC0 3'-UTR-Mutante) lagen bereits in der AG Niepmann vor und wurden mit der Standard Transformation in *E. coli* TOP10'F Bakterien transformiert und anschließend mit dem Maxipräparations-Kit amplifiziert. Um die Plasmide zu kontrollieren, erfolgte ein analytischer Verdau mit den Restriktionsenzymen *Afl* II und *Bam* HI (3.4.1). Beide Restriktionsenzyme haben jeweils nur eine spezifische Erkennungssequenz im Mengo-Plasmid. Die Schnittstelle von *Afl* II liegt bei 4.078 bp und die von *Bam* HI bei 7.726 bp. Da das eingesetzte Plasmid eine Größe 10.906 bp hat, werden zwei DNA-Stücke erwartet, welche die Länge 3.648 bp und 7.258 bp haben (Abbildung 13).



**Abbildung 13. MV-Mutanten-DNA (2) und MV-Wildtyp-DNA (3).** 1 %-iges Agarosegel nach Restriktionsendonukleasenverdau der Plasmide mit *Afl* II und *Bam* HI. Als Marker wurde HyperLadder™ verwendet (1).

Da das Plasmid nicht nur für das Virusgenom kodiert, sondern noch eine beta-Laktamase und weitere Vektorsequenzen enthält, ist es notwendig, die Expression auf nur die Sequenzen des Virusgenoms aus dem Plasmid zu beschränken, also in den nachfolgenden Transkriptionen nur das reine MV-Genom zu transkribieren. Dies geschieht, indem man mithilfe eines Restriktionsenzym hinter dem Poly-A-Schwanz der Virusgenom-Sequenz

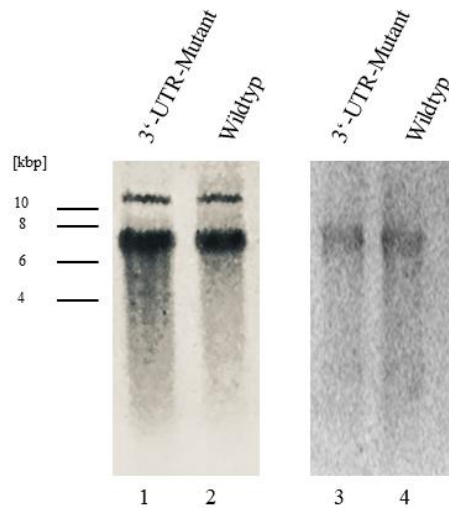
schneidet. Da sich der Poly-A-Schwanz über den Bereich von 7.701 bp bis 7.723 bp erstreckt, wurde in der vorliegenden Arbeit *Bam* HI für die Linearisierung der DNA verwendet und somit kurz hinter dem Poly-A-Schwanz geschnitten (Abbildung 14).



**Abbildung 14. MV-Mutanten-DNA (2) und MV-Wildtyp-DNA (3).** 1 %-iges Agarosegel nach Restriktionsendonukleasenverdau der jeweiligen Plasmide mit *Bam* HI. Die Banden der DNA befinden sich kurz über der ersten Bande des Markers HyperLadder™ (1).

Um die virale RNA zu generieren, erfolgt die *in vitro* Transkription (3.4.3). Man nimmt hierfür eine T7-RNA-Polymerase, die den T7-Promotor als Startpunkt nutzt. Der T7-Promoter befindet sich vor der 5'-UTR der Virusgenom-Sequenz. Nach fünfstündiger Inkubation wird ein 1 %-iges Agarose-Gel hergestellt, um die neu entstandene RNA nachzuweisen und auf ihre Länge hin zu überprüfen (Abbildung 15, 1 und 2). Im Bereich von ca. 11.000 bp ist eine Bande im Agarose-Gel zu erkennen. Hierbei handelt sich um das eingesetzte DNA-Template, welches eine Länge von 10.906 bp besitzt. Die zweite Bande, die zu erkennen ist, befindet sich etwas weiter unten bei ca. 7.000 bp. Hierbei handelt es sich um die MV-RNA. Die DNA-Bande ist im Vergleich zur RNA-Bande schmaler, was eine quantitative Aussage über das Mengenverhältnis der beiden Nucleinsäuren erlaubt. Das DNA-Template wird im Anschluss mittels des DNase I Verdau aus dem Ansatz entfernt (3.4.4). Dann erfolgt erneut eine Phenol-Chloroform-Reinigung und Ethanolfällung (3.4.2), um die DNase I und ihren Puffer wieder

aus dem Ansatz zu entfernen, sowie die Reste der degradierten DNA. Ein weiteres Gel wird zur Kontrolle der Integrität der RNA angefertigt (Abbildung 15, 3 und 4).



**Abbildung 15. MV-Mutanten-DNA und -RNA, sowie MV-Wildtyp-DNA und -RNA.** 1 %-iges Agarosegel nach *in vitro* Transkription ohne DNase I Verdau (1 und 2), sowie nach DNase Verdau (3 und 4). Als Marker wurde HyperLadder™ verwendet. Schmale DNA-Banden bei 10.906 bp und breitere RNA-Banden bei ca. 7.000 bp.

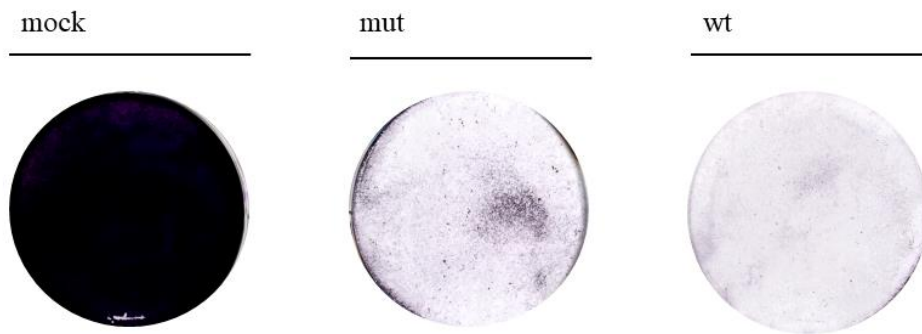
## 4.2 Nachweis der Produktion von viralen Partikeln in HeLa-Zellen

Um eventuelle Unterschiede zwischen dem Wildtyp und der 3'-UTR-Mutante in der Pathogenität des MV festzustellen, wurde unter anderem die Methode des Plaque Assays verwendet. Die HeLa-Zellen wurden zunächst mit der hergestellten RNA (4.1) transfiziert (0,5 µg pro Well) und nach 48 h Inkubation wurde der potentiell infektiöse Überstand auf frisch ausgesäte HeLa-Zellen gegeben (Infektion, 3.1.7). Anschließend erfolgten eine Fixierung und Färbung der Zellen (3.1.9). Zur Festigung der durch den Plaque Assay generierten Ergebnisse wurden nach Transfektion bzw. Infektion der HeLa-Zellen auch Western Blots durchgeführt, um viralen Proteine in den Zellen nachzuweisen. Des Weiteren wurde die Zelllinie auch mit MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Mutanten-RNA transfiziert, welche im Genom ein HiBiT enthalten. So konnten mittels Luciferase Assay die viralen Proteine (3.5.2, welche nun mit einem HiBiT markiert waren) quantifiziert und nachgewiesen werden.

## 4.2.1 Plaque Assays mit Mengoviren

### 4.2.1.1 Transfektion von HeLa-Zellen

Zu Anfang wurden die zwei Transfektionsmethoden parallel angewendet, um herauszufinden, welche die am besten geeignete Vorgehensweise ist, um HeLa-Zellen zu transfizieren. Zum einen wurde die Elektroporation (3.1.5) verwendet und zum andern die Lipofektion (3.1.6). Da viele HeLa-Zellen nach der Elektroporation gestorben sind und für die nachfolgenden Versuche kein exakter Zeitpunkt "Null" definiert werden musste, wurde in den nachfolgenden Transfektionen stets mit der Methode der Lipofektion gearbeitet. Um einen Referenzwert zu haben, wurden parallel HeLa-Zellen ausgesät, welche genau den gleichen Bedingungen ausgesetzt wurden wie die HeLa-Zellen, an welchen die Experimente durchgeführt wurden. Diese Referenzzellen wurden jedoch nicht mit viraler RNA behandelt und werden im Folgenden als „Mock“-Probe ("Schein-Probe") bezeichnet. 24 h vor der Transfektion wurden  $0,3 \times 10^6$  Zellen auf einen 6-Well-Platte ausgesät, sodass der Zellrasen am Tag des Experiments zu fast 100 % konfluent war. In der vorliegenden Arbeit wurden stets  $0,5 \mu\text{g}$  RNA pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert, analog zu Duque und Palmenberg [33]. 48 h nach der Transfektion wurde der Überstand für die Infektion (3.1.7) abgenommen, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und anschließend mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt (3.1.9). Färbte man die „Mock“-Probe, so waren immer alle Zellen angefärbt, und man erkannte über das ganze Well hinweg einen konfluenten Zellrasen (Abbildung 16). Wurde das Well gefärbt, welches 48 h zuvor mit MV-Mutanten-RNA transfiziert wurde, so konnte man deutlich erkennen, dass eine Virusproduktion stattgefunden hat, da nur wenige Zellen überlebt haben. Schaut man sich die Zellen an, welche mit MV-Wildtyp-RNA transfiziert wurden, so fällt auch hier auf, dass sehr wenige Zellen überlebt haben. Verglichen mit dem Mutanten ist der Zellrasen sogar noch weniger besiedelt.



**Abbildung 16. HeLa-Zellen, welche durch Lipofektion mit MV-Mutanten-RNA (mut) bzw. MV-Wildtyp-RNA (wt) transfiziert wurden.** Die Zellen wurden 48 h post-Transfektion mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

#### 4.2.1.2 Infektion von HeLa-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden  $0,3 \times 10^6$  HeLa-Zellen 24 h vor Infektion auf einer 6-Well-Platte ausgesät. Der (in der Regel virushaltige) Überstand der zuvor mit Lipofectamine® transfizierten Zellen wurde nach 48 h abgenommen, durch Zentrifugation von toten Zellen befreit und jeweils in verschiedenen Verdünnungsstufen auf die Zellen pipettiert (Titration).

Es wurden zwei verschiedenen Arten der Polymerüberschichtung getestet. Zuerst wurde 1 %-iger Agar verwendet, welcher durch Erhitzen verflüssigt und mit 50 % 2 x DMEM und einer Endkonzentration von 1,5 % FBS gemischt wurde. Parallel wurden die Experimente mit 0,5 %-iger Agarose und 1 x DMEM mit insgesamt 1,5 % FBS beschichtet.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommenen Zell-Überschichtung wurden zuerst 2 h nach Infektion mit 0,5 %-igem Agar, 1 x DMEM mit insgesamt 1,5 % FBS beschichtet. Die Infektion erfolgte pur, sowie in den Verdünnungsstufen 1:10, 1:100 und 1:1.000. 24 h, 48 h bzw. 78 h nach Beschichten der infizierten Zellen mit dem Overlay aus Agar wurden die Zellen mittels 3 %-igem PFA fixiert und mit Kristallviolett gefärbt. In Abbildung 17 sind HeLa-Zellen nach Infektion in der Verdünnung 1:100 dargestellt. Erneut waren viele gefärbte Zellen bei der „Mock“-Probe zu erkennen. Die Zellen, welche mit MV-Mutanten-RNA, sowie auch diese, welche mit der MV-Wildtyp-RNA infiziert wurden, zeigten keinerlei

Unterschiede zur „Mock“-Probe. In keinem der durchgeführten Experimente (min. 4 x pro Verdünnungsreihe und Konstrukt) waren Plaques bzw. Anzeichen der Zelllyse zu erkennen.

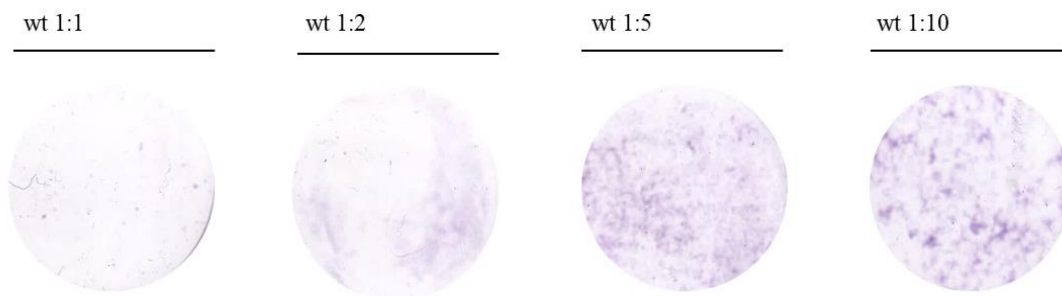


**Abbildung 17. Nach Infektion und Überschichtung von Agar von HeLa-Zellen mit MV-Wildtyp-RNA (wt) bzw. MV-Mutanten-RNA (mut).** Der Überstand von zuvor transfizierten HeLa-Zellen wurde in der Verdünnung 1:100 nach 48 h auf frische HeLa-Zellen pipettiert und nach 2 h Inkubation erfolgte eine Abdeckung mittels 0,5 %-igem Agar. Anschließend wurden die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

Da die Zusammensetzung des Polymers mit Agar wie in Abbildung 17 nie zu einer Entstehung von Plaques führte, wurde anstelle des Agars schließlich 0,5 %-iger Agarose verwendet. Die restliche Zusammensetzung des Polymers wurde jedoch nicht geändert und für die folgenden Experimente beibehalten. Unklar blieb, warum beim Verwenden von Agar keine Plaque-Bildung möglich war.

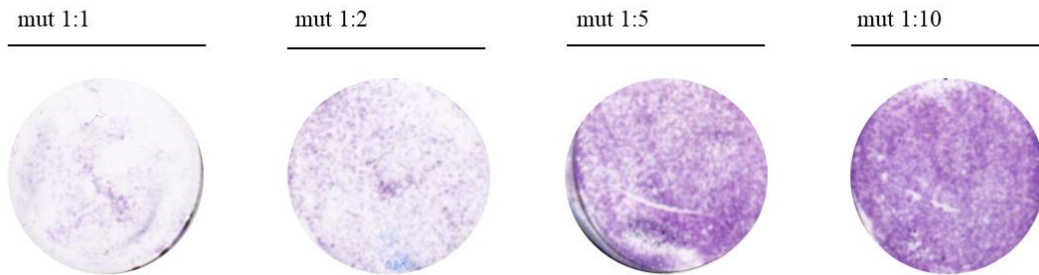
Zuerst wurde der Überstand 1:1, also pur, auf die HeLa-Zellen pipettiert. Da dies zur nahezu vollständigen Lyse der Zellen führte, wurden in den nachfolgenden Experimenten die Verdünnungsstufen 1:2, 1:5 und 1:10 angewendet. Nach zweistündiger Inkubationszeit der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> mit dem infektiösen Überstand, wurde das Medium abgenommen und die 0,5 %-ige Agarose-/1 x DMEM-/1,5 %-ige FBS-Mischung auf das Well gegeben. Nach 72 h wurde das nun fest gewordene Polymer mithilfe eines flachen Spatels entfernt und mit 1 x PBS gewaschen. Nach anschließendem Fixieren mit 3 %-igem PFA und Färben der Zellen mit 1 %-igem Kristallviolett wurde die nun entstandenen Plaques ausgezählt. Das Ergebnis für den MV-Wildtyp ist exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt. Gibt man den Überstand der transfizierten Zellen in der Verdünnung 1:1 auf die frischen Zellen, so war bei

dem MV-Wildtyp-RNA deutlich zu erkennen, dass alle Zellen nach 72 h infiziert worden waren und lysiert sind. Nach dem Plaque Assay waren nahezu keine Zellen mehr nachweisbar. Wurde die Verdünnungsstufe auf 1:2 erhöht, so waren wenige Zellen nach der Färbung erkennbar. In der Verdünnung 1:5 war das Well zu ca. 15 % mit Zellen bedeckt und es war ein fleckiges Muster sichtbar. Wurde die Infektion in der Verdünnungsstufe 1:10 durchgeführt, so wurde dieses fleckige Muster noch ausgeprägter und es konnten noch mehr Zellen angefärbt werden. Da dennoch keine einzelnen Plaques abgrenzbar waren, sondern in der Verdünnung 1:10 flächig ineinander verliefen, wurden in der vorliegenden Arbeit noch höhere Verdünnungsstufen gewählt, um bei dem MV-Wildtyp mehr lebende Zellen zu erhalten und Plaques definieren zu können.



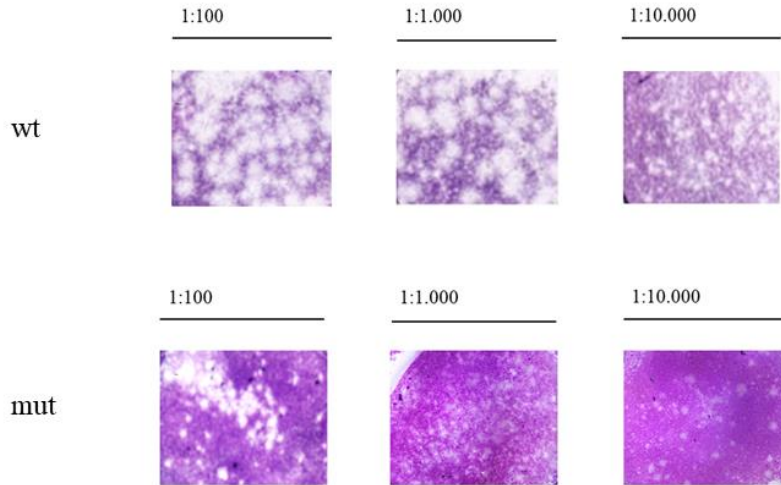
**Abbildung 18. Infektion von HeLa-Zellen mit MV-Wildtyp (wt) in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10.** Die Infektion erfolgte mit viralen Partikeln, welche 48 h nach Transfektion im Überstand von HeLa-Zellen mit MV-Wildtyp-RNA entstanden waren. 2 h nach Infektion mit MV-Wildtyp-RNA wurde das Medium entfernt und ein Polymer aus Agarose auf die Zellen pipettiert. Nach 72 h wurden das Polymer entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

Die HeLa-Zellen, welche mit dem Überstand der mit MV-Mutanten-RNA transfizierten HeLa-Zellen infiziert worden waren, waren auch größtenteils lysiert, wenn man eine Verdünnung von 1:1 und 1:2 vornahm. Es waren dennoch deutlich mehr lebendige Zellen als beim Wildtyp zu erkennen. In der Verdünnung 1:5 waren weitaus weniger HeLa-Zellen lysiert als bei den Verdünnungsstufen 1:1 und 1:2. Verdünnte man die Infektion 1:10, so überlebten noch mehr der Zellen und nur einige lysierten. Die lysierten Zellen waren als Plaques nach der Färbung zu erkennen (Abbildung 19). Da die Zellen beim Wildtyp bei der Verdünnungsstufe allerdings nahezu vollständig lysierten, wurden, um einen Vergleich zu erhalten, auch höhere Verdünnungsstufen für die Mutante gewählt.



**Abbildung 19. Infektion von HeLa-Zellen mit MV-Mutante (mut) in den Verdünnungsstufen 1:1, 1:2, 1:5 und 1:10.** Die Infektion erfolgte mit viralen Partikeln, welche 48 h nach Transfektion im Überstand von HeLa-Zellen mit MV-Mutanten-RNA entstanden waren. 2 h nach Infektion mit MV-Mutanten-RNA wurde das Medium entfernt und ein Polymer aus Agarose auf die Zellen pipettiert. Nach 72 h wurden das Polymer entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

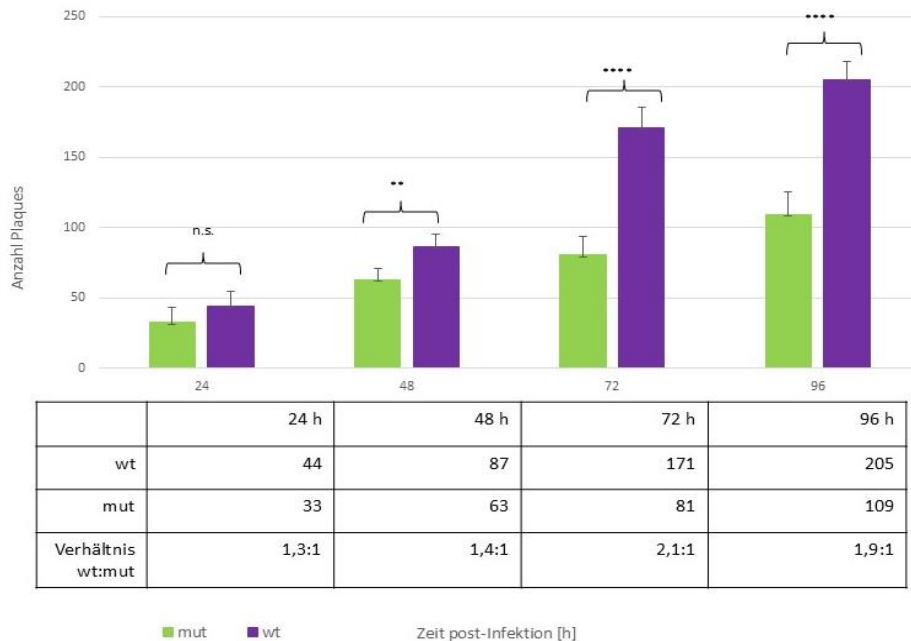
Bei einer Verdünnungsstufe von 1:100 waren sowohl beim Wildtyp als auch bei der Mutante deutlich Plaques zu erkennen (Abbildung 20). Die Plaques des MV-Wildtyps waren größer und zahlreicher als die der MV-Mutanten. Die Plaques der Mutanten waren allerdings deutlicher gegeneinander abgrenzbar als beim Wildtyp. In der Verdünnung 1:100 waren in den weißen Flächen trotz gründlichem Waschen nach der Färbung noch Zellen zu erkennen, was vermuten ließ, dass es sich bei diesen Flächen nicht um ein singuläres Plaque handelte, sondern um eine Mehrzahl an Plaques, welche aufgrund ihrer Häufigkeit ineinander übergangen. Diese Annahme bestätigte sich, als man um eine bzw. zwei weitere Potenzen stärker verdünnte.



**Abbildung 20.** Infektion von HeLa-Zellen mit MV-Wildtyp (wt) sowie MV-Mutante (mut) in den Verdünnungsstufen 1:100, 1:1.000 und 1:10.000. Die Infektion erfolgte mit viralen Partikeln, welche 48 h nach Transfektion im Überstand von HeLa-Zellen mit MV-Wildtyp-RNA entstanden waren. 2 h nach Infektion wurde das Medium entfernt und ein Polymer aus Agarose auf die Zellen pipettiert. Nach 72 h wurden das Polymer entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt. Die Ausschnitte betragen 4 cm<sup>2</sup> einer 6-Well-Platte.

In Abbildung 21 sind die Ergebnisse der Plaque Assays graphisch dargestellt. Es wurden stets die Plaques einer vorher definierten Fläche (2 cm x 2 cm) des Wells ausgezählt und auf die Gesamtoberfläche einer 6-Well-Platte hochgerechnet (8,87 cm<sup>2</sup>). Da man bei einer Verdünnungsstufe von 1:10.000 davon ausgehen kann, dass es sich bei jedem Plaque um ein einzelnes Viruspartikel handelt, wurden die Plaques dieser Verdünnungsstufe ausgezählt. 24 h post-Infektion konnten beim Wildtyp durchschnittlich 44 Plaques und bei der 3'-UTR-Mutante 33 gezählt werden. Aus den Experimenten beider Konstrukte ergab sich allerdings eine Standardabweichung von über 10 Plaques, sodass hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte ( $p = 0,17$ ). 48 h nach der Infektion wurde das Verhältnis der beiden Konstrukte zueinander stärker unterschiedlich, beim Wildtyp und der Mutante wurden die Plaques häufiger. Die Differenz der Plaquezahl war nach 48 h signifikant mit  $p = 0,007$ . Nach 72 h manifestierte sich der größte Unterschied zwischen den beiden Konstrukten, das Verhältnis des Wildtyps zur Mutante betrug  $\sim 2:1$ . Auch dieser Unterschied ist mit  $p = 0,00008$  hoch signifikant. Das Verhältnis relativiert sich wieder sehr leicht nach 96 h post-Infektion, bleibt aber dennoch statistisch signifikant ( $p = 0,00008$ ).

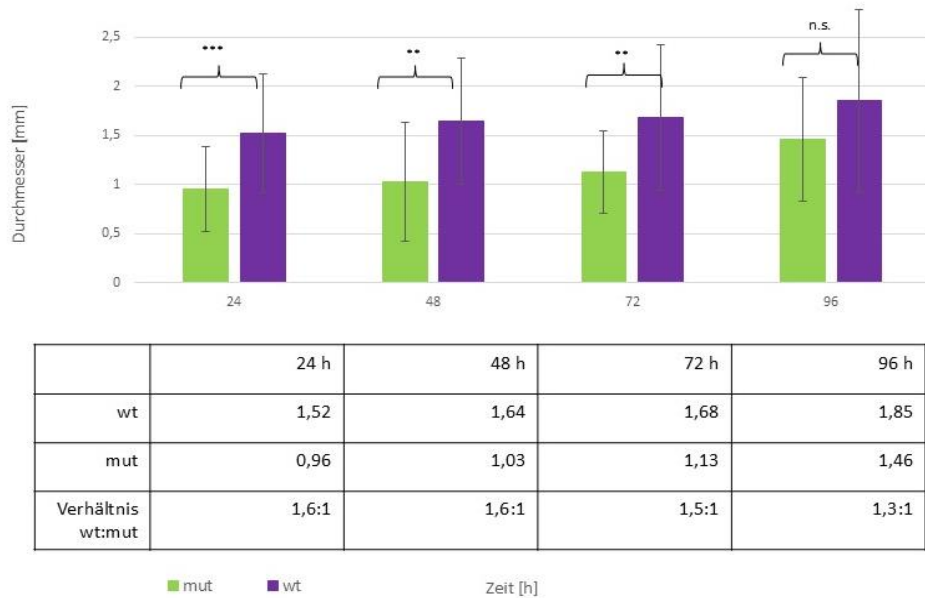
Beim Wildtyp sind ~ 205 Plaques zählbar, während man beim Mutanten ~ 109 Plaques zählt. Tendenziell steigt die Anzahl der Plaques mit der Zeit. Beim Wildtyp wurden zu jedem Zeitpunkt mehr Plaques gezählt als bei der Mutante.



**Abbildung 21. Plaquantzahl. Ergebnisse des Plaque Assays über die Plaquebildung von HeLa-Zellen, welche mit MV-Wildtyp (wt) bzw. MV-Mutante (mut) infiziert wurden.** 48 h post-Transfektion von HeLa-Zellen wurde das virushaltige Medium für die Infektion abgenommen und in der Verdünnung 1:10.000 auf frische Zellen pipettiert. 2 h später erfolgte nach Entfernen des Mediums eine Beschichtung der Zellen mit einem Agarose-Polymer. Nach 24 h, 48 h, 72 h bzw. 96 h wurde das Polymer vorsichtig entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt. Anschließend wurden die Plaques auf 4 cm<sup>2</sup> ausgezählt. Auf der Abszisse ist die Zeit post-Infektion abgebildet, zu welcher die Zellen fixiert und gefärbt wurden. Die Ordinate stellt die Anzahl der Plaques dar, welche zu dieser Zeit pro Well gezählt werden konnten. Als Fehlerindikatoren (schwarze Balken) wurden hier die Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind, verwendet. Mit Sternchen sind die Signifikanzen gekennzeichnet. Die Experimente wurden mindestens viermal wiederholt. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den Proben, mit \* (p > 0.05), \*\* (p > 0.01), \*\*\* (p > 0.001) und \*\*\*\* (p > 0.0001); n.s. = nicht signifikant (p > 0.05)

Des Weiteren wurden die Durchmesser der Plaques von Wildtyp und 3'-UTR-Mutante 24 h, 48 h, 72 h und 96 h post-Infektion betrachtet (Verdünnung 1:10.000) und ausgemessen (Abbildung 22). Die 6-Well-Platten wurden eingescannt, und es wurde eine Fläche von 2 cm x 2 cm ausgeschnitten. Die

Durchmesser der auf dieser Fläche vorhandenen Plaques wurden ausgemessen. 24 h post-Infektion mit MV-Wildtyp waren die Plaques durchschnittlich 1,5 mm groß, wobei der größte gemessene Durchmesser 3 mm und der kleinste 0,7 mm betrug. Mit der MV-Mutante infizierte HeLa-Zellen zeigten 24 h post-Infektion Plaques, welche durchschnittlich einen Durchmesser von 0,96 mm aufwiesen. Diese Differenz zwischen Wildtyp und Mutante war bereits nach 24 h statistisch hoch signifikant mit  $p = 0,0007$ . Auch 48 h post-Infektion der Zellen ließ sich ein signifikanter Unterschied der beiden Konstrukte in Bezug auf die Durchmesser der Plaques feststellen ( $p = 0,002$ ). 72 h nach der Infektion wurden die Durchmesser der entstandenen Plaques nach Fixieren und Färben erneut gemessen und es ergab sich wieder ein signifikanter Unterschied der beiden Konstrukte mit  $p = 0,003$ . Der durchschnittliche Durchmesser der Plaques des Wildtyp-Konstrukts hatte sich von 1,64 mm (48 h post-Infektion) auf 1,68 mm (72 h post-Infektion) nur minimal vergrößert, sowie auch der der Mutanten-Konstrukte von 1,1 mm (48 h post-Infektion) auf 1,13 mm (72 h post-Infektion). 96 h post-Infektion der HeLa-Zellen vergrößerte sich der durchschnittliche Durchmesser der beiden Konstrukte, die Differenz war jedoch nicht mehr signifikant ( $p = 0,1$ ). Deutlich war, dass die Plaques, welche sich nach Infektion von HeLa-Zellen mit infektiösem Wildtyp-Medium gebildet hatten, zu jedem Zeitpunkt durchschnittlich größer waren als jene, welche mit 3'-UTR-Mutant-Medium entstanden waren. Auch wurde der Durchmesser der Plaques größer, je länger die Infektion zurücklag (24 h < 48 h < 72 h < 96 h).



**Abbildung 22. Plaquegröße. Ergebnisse des Plaque Assays über die Plaquebildung von HeLa-Zellen, welche mit MV-Wildtyp (wt) bzw. MV-Mutante (mut) infiziert wurden.** 48 h post-Transfektion von HeLa-Zellen wurde das virushaltige Medium für die Infektion abgenommen und in der Verdünnung 1:10.000 auf frische HeLa-Zellen pipettiert. 2 h später erfolgte nach Entfernen des Mediums eine Beschichtung der Zellen mit einem Agarose-Polymer. Nach 24 h, 48 h, 72 h bzw. 96 h wurde das Polymer vorsichtig entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt. Anschließend wurden die Plaques auf 4 cm<sup>2</sup> ausgemessen. Auf der Abszisse ist die Zeit post-Infektion abgebildet, zu welcher die Zellen fixiert und gefärbt wurden. Die Ordinate stellt die Größe der Plaques in Millimetern dar, welche zu dieser Zeit pro Well gemessen werden konnten. Als Fehlerindikatoren (schwarze Balken) wurden hier die Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind, verwendet. Die Experimente wurden mindestens viermal wiederholt und es wurden min. 20 verschiedene Plaques pro Konstrukt ausgemessen. Die Sternchen markieren signifikante Unterschiede zwischen den Proben, mit \* ( $p > 0.05$ ), \*\* ( $p > 0.01$ ), \*\*\* ( $p > 0.001$ ) und \*\*\*\* ( $p > 0.0001$ ); n.s. = nicht signifikant ( $p > 0.05$ ).

**Fazit:**

Die Mutation des GARS-bindenden Elements führt zur Ausbildung von weniger und kleineren Plaques. Die Bindung von GARS hat also Einfluss auf die Effizienz der Translation des viralen Genoms und/oder auf die Geschwindigkeit seiner Replikation.

**4.2.2 Proteinbiochemischer Nachweis der 3D Pol mittels Western Blot**

48 h nach Transfektion mittels Lipofektion (3.1.6) wurde ein Western Blot (3.5.1) gemacht, um virale Proteine in den Zellen nachzuweisen. Der Western Blot diente hier als Kontrolle der Transfektion von HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen

wurden lysiert, das Lysat mittels SDS-PAGE aufgetrennt und dann auf eine Membran geblottet (3.5.1). Bei dem hier verwendeten primären Antikörper handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper gegen die RNA-abhängige RNA-Polymerase des MV, die Mengo 3D Pol. Zusätzlich wurde als primärer Antikörper ein Antikörper gegen die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, da die GAPDH eine hohe und v.a. konstitutive Expression in Zellen aufweist (sog. Haushaltsgen; engl. *housekeeping gene*). Das Molekulargewicht beträgt 36 kDa und lässt sich folglich im Western Blot gut von der 52 kDa großen 3D-Pol-Bande differenzieren. Als sekundärer Antikörper wird der Goat-anti-mouse IgG HOR verwendet.

Bei allen durchgeführten Western Blots war – wie zu erwarten – eine Bande bei ca. 36 kDa zu erkennen, welche dem zellulären Protein GAPDH entspricht. Bei der „Mock“-Probe waren die Banden der GAPDH in größerer Menge vorhanden, die Banden erschienen dichter und breiter. Bei den transfizierten Zellen war die GAPDH-Bande stets schmaler. Dennoch produzieren auch die transfizierten Zellen nach wie vor GAPDH. Deutlich ist, dass Zellen, welche mit der 3'-UTR-Mutante transfiziert worden waren, eine dickere GAPDH-Bande zeigten als jene, die mit dem Wildtyp transfiziert wurden. Trotz mehrmaliger Wiederholung des Experiments konnte zu keiner Zeit eine manifeste Bande im Bereich der 3D Pol (bei ca. 52 kDa) sichtbar gemacht werden. Es waren ganz schwach beim Wildtyp Banden im Bereich von ~ 50 kDa zu erkennen. Diese waren sehr hell und nicht zu intensivieren, so konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Banden nur um Hintergrund handelte. Da 3D Pol nicht im Western Blot zu identifizieren war, musste die virale Expression auf eine andere Art nachgewiesen und quantifiziert werden.

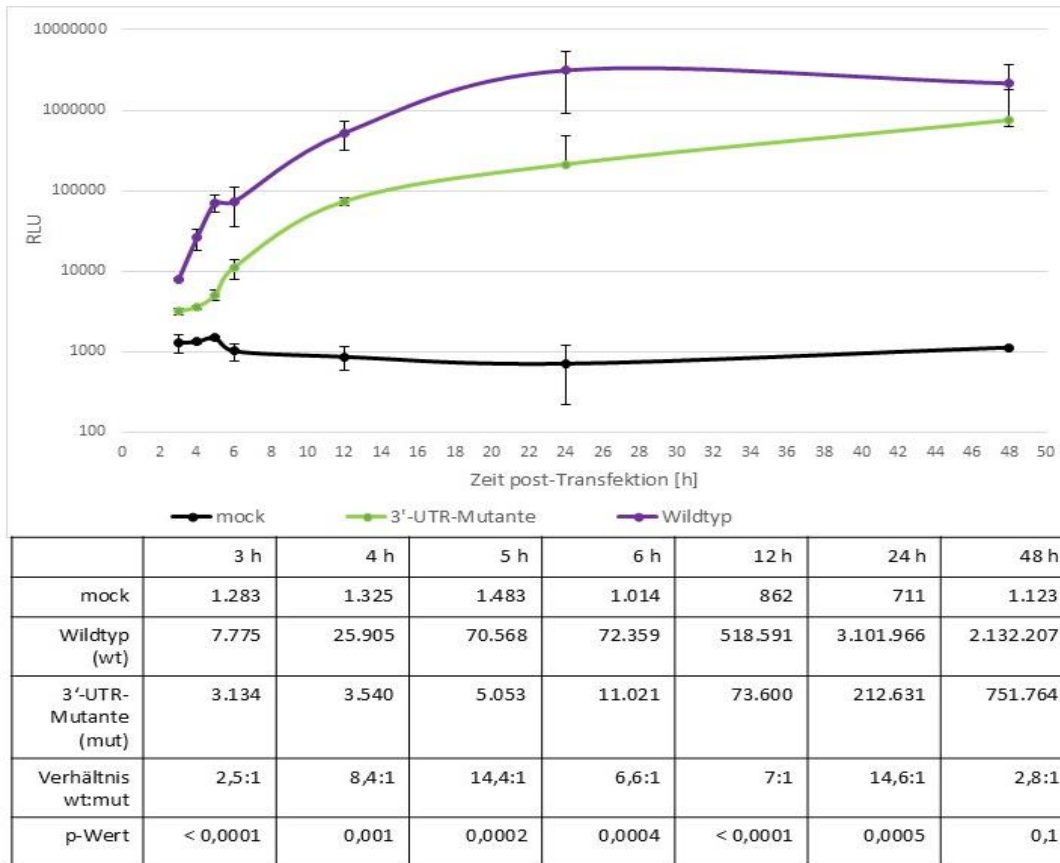
Fazit:

Mithilfe des Western Blots ließ sich die Stärke der Translation viraler Proteine am ehesten aus Gründen der technischen Sensitivität nicht nachweisen. Daher muss ein sensitiveres System zur Detektion der Translations-Effizienz verwendet werden.

### 4.2.3 Lumineszenznachweis mittels HiBiT-Tags (Luciferase Assay)

Das MV-Wildtyp-Plasmid sowie das Plasmid, welches eine Mutation in der 3'-UTR an der GARS-Bindungsstelle enthält, wurden in der AG Prof. Niepmann von Dimitar V. Nachev mit einem HiBiT-Tag versehen. Dieses HiBiT ist proteingekoppelt und befindet sich in der P2-Region am Protein 2B, ist also im gleichen Leseraster in die Sequenz für das Polyprotein eingefügt (Abbildung 39). Die Kopplung des HiBiT an ein virales Protein macht es möglich, die Anzahl an viralen Proteinen luminometrisch zu messen und sie so quantifizieren zu können.

$1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in 12-Well-Platten ausgesät, sodass sie am Tag der Transfektion zu fast 100 % konfluent waren. Mittels Lipofektion erfolgte die Transfektion von 0,3 µg RNA pro Well einer 12-Well-Platte der HeLa-Zellen. 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h post-Transfektion wurden die Zellen lysiert. Nach Hinzufügen von 50 µl 1 x PBS und 50 µl Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagenz pro 12-Well wurden die Proben für 10 min auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Anschließend wurden sie in ein Röhrchen überführt und im Luminometer für 2 s gemessen (3.5.2). Da als Methode zur Transfektion die Lipofektion gewählt wurde, wurde der erste Zeitpunkt der Messung auf 3 h festgelegt. Der Vorgang der Lipofektion per Endozytose benötigt ca. 3 h, bevor man davon ausgehen kann, dass die RNA weitgehend vollständig in die Zellen gelangt ist. Die Transfektion von mit HiBiT-markierten RNA-Genomen diente einerseits zur Bestätigung der im Plaque Assay generierten Ergebnisse, andererseits zur genauen Quantifizierung der Viren. Es wurde hier v.a. auf die Unterschiede zwischen 3'-UTR-Mutante und Wildtyp geachtet, um weiter zu analysieren, wie bedeutend der Effekt der GARS-Bindung an das Genom des MV für den viralen Vermehrungszyklus ist.



**Abbildung 23. Logarithmische Darstellung (Basis: 10) der nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h post-Transfektion mittels Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) von HeLa-Zellen, welche mit MV-Mutanten-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA transfiziert wurden (alle enthalten ein HiBiT).** Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach der Transfektion angegeben. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der HeLa-Zellen gemessen wurden. Hier dargestellt sind alle erhobenen Zeitpunkte der beiden Konstrukte. Bei den gezeigten Daten handelt es sich um Mittelwerte, welche aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurden. Die angegebenen Fehlerindikatoren entsprechen den Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.

Das Experiment wurde mindestens 6 x durchgeführt, und die aus den Ergebnissen resultierenden Mittelwerte wurden in Abbildung 23 aufgetragen. Deutlich ist, dass die „Mock“-Probe zu jedem gemessenen Zeitpunkt sehr niedrig ist. Zwischen dem ersten Zeitpunkt (3 h) und dem letzten Zeitpunkt (48 h), zu welchem Proben genommen wurden, bleiben die gemessenen RLU stets in einem Bereich zwischen 1.500 und 700. Die Zellen, welche mit der Wildtyp-RNA transfiziert wurden, weisen bereits 3 h post-Transfektion ca. 6 x so hohe Werte wie die „Mock“-Probe auf. Auch jene Zellen, welche mit der 3'-UTR-Mutanten-RNA transfiziert wurden, zeigten nach 3 h deutlich höhere Werte als die „Mock“-

Probe, blieben jedoch stets unter den Werten der Wildtyp-Proben. Das Verhältnis der Mittelwerte der detektierten Wildtyp-Proben zu den Mutant-Proben betrug nach 3 h 2,5:1, und der Unterschied war signifikant ( $p < 0,0001$  bei  $\alpha = 0,05$ ). Nach 4 h sind beim Wildtyp im Durchschnitt  $\sim 25.000$  RLU messbar, beim Mutanten jedoch nur  $\sim 3.500$  RLU, was ebenfalls eine signifikante Differenz der Konstrukte darstellt ( $p = 0,001$ ). Das Verhältnis der Expression der beiden Konstrukte ist nun deutlich größer geworden (8,4:1), was dadurch zustande kommt, dass der Anstieg der RLU der Wildtyp-Proben deutlich größer ist als der der Mutanten-Proben. 5 h post-Transfektion wird das Verhältnis der beiden Konstrukte zueinander weiterhin größer (14,4:1), da die Mutante nach 5 h nur einen leichten Anstieg zeigt, der Wildtyp hingegen aber einen bedeutend größeren. Auch nach 5 h ist der Unterschied zwischen Wildtyp und 3'-UTR-Mutante signifikant ( $p = 0,0002$ ). Nach 6 h jedoch gibt es keinen besonders großen Anstieg der Wildtyp-Proben mehr, während sich die detektierten RLU der Mutant-Proben verdoppelt haben. Dies führt dazu, dass sich 6 h post-Transfektion das Verhältnis von Wildtyp zur Mutante nicht mehr so groß ist (6,6:1) wie nach 5 h. Trotzdem lässt sich auch hier ein p-Wert von 0,0004 ermitteln und somit wird ein signifikantes Ergebnis erzielt. Die nächsten Proben wurden nach 12 h geerntet, nun verzeichneten beide Konstrukte einen deutlichen Anstieg der RLU. Beim Wildtyp sind nun  $\sim 520.000$  RLU messbar und beim Mutanten  $\sim 74.000$  RLU. Der Unterschied der beiden Konstrukte ist weiterhin hoch signifikant ( $p < 0,0001$ ). Das Verhältnis ist annähernd so geblieben (7:1) wie 6 h post-Transfektion. 24 h nach der Transfektion werden erneut HeLa-Zellen lysiert und die Lumineszenz detektiert. Immer noch steigen die RLU der beiden Konstrukte an und das Verhältnis der beiden zueinander erreicht nun ihr Maximum (14,6:1). Auch hier manifestiert sich ein signifikantes Ergebnis mit einem p-Wert von 0,0005. Der letzte Zeitpunkt zu welchem Proben genommen wurden, war 48 h nach der Transfektion. Während die mit 3'-UTR-Mutant-RNA transfizierten Zellen noch einen Anstieg verzeichneten, so sanken die Werte der Wildtyp-Konstrukte leicht. Das Verhältnis der beiden näherte sich folglich auf 2,8:1 an und die Differenz der Konstrukte war statistisch nicht mehr signifikant ( $p = 0,1$ ). Hinzuzufügen ist, dass bei Betrachten der Zellen unter dem Mikroskop deutlich war, dass beim Wildtyp 48 h post-Transfektion der Zellrasen lediglich zu

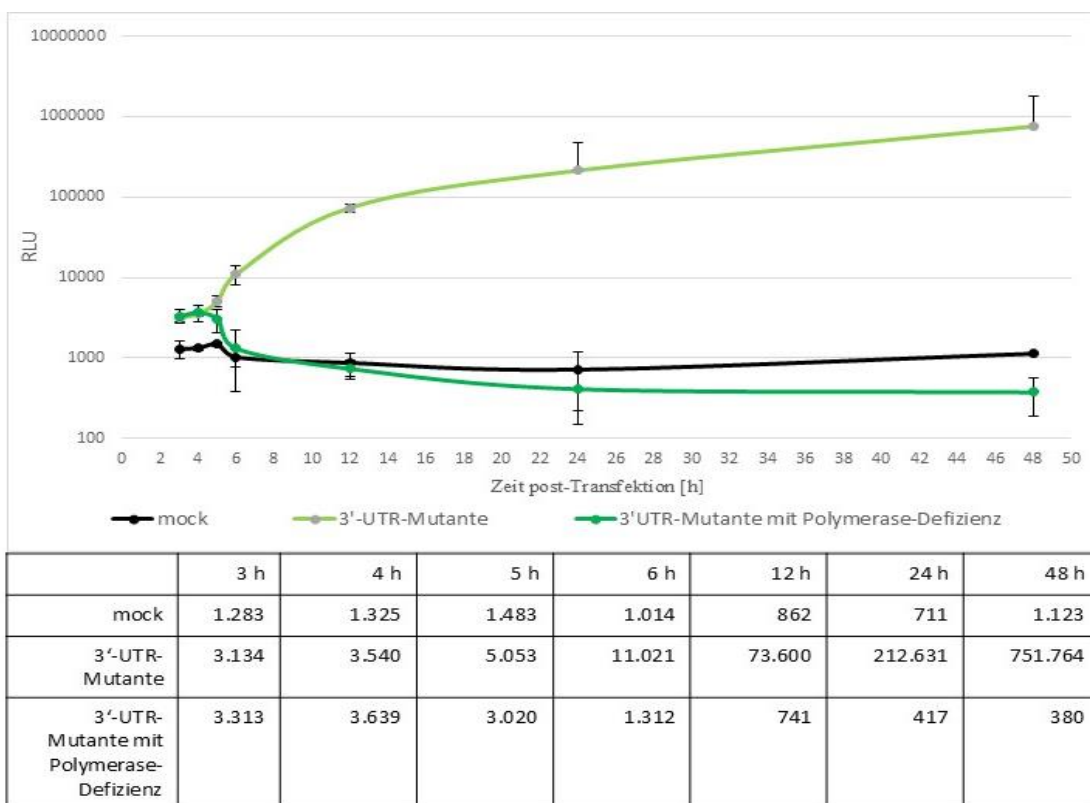
schätzungsweise 10 % konfluent war, der des Mutanten zu ~ 20 % (Abbildung 16).

### 4.3 Lumineszenznachweis von replikationsunfähigen Konstrukten

Da man aus den in 4.2.2 beschriebenen Ergebnissen nur die Unterschiede in der Virusproduktion zwischen MV-Wildtyp und MV-3'-UTR-Mutante ableiten kann, jedoch keine Aussage treffen kann, ob die GARS-Bindung an die 3'-UTR des MV die Translation oder die Replikation positiv beeinflusst, wurden zusätzlich die gleichen Experimente mit viraler RNA durchgeführt, die durch Mutation der 3D Pol replikationsunfähig gemacht wurden. So konnte durch diese replikationsunfähigen Konstrukte die Translation isoliert dargestellt werden. Auch hier wurde in der AG Niepmann von Dimitar V. Nachev an Protein 2B ein HiBiT eingefügt, welches äquivalent zur Virusproduktion synthetisiert wird.

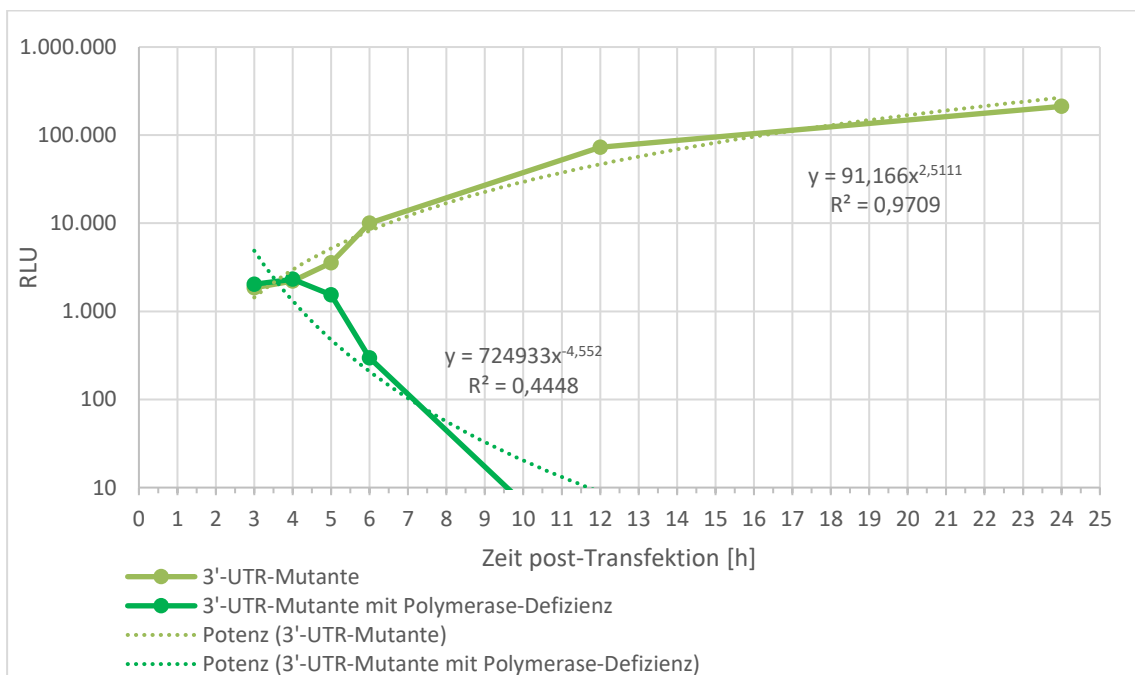
In Abbildung 24 sind die Werte aus HeLa-Zellen gezeigt, die mit 0,3 µg / Well MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz transfiziert wurden, den schon oben gezeigten Werten der MV-Mutante mit intakter Polymerase gegenübergestellt. Dargestellt sind die RLU auf der Ordinate, logarithmiert zur Basis 10, welche 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h post-Transfektion nach dem oben beschriebenen Verfahren geerntet und anschließend im Luminometer gemessen wurden. Das Experiment wurde mindestens 6 x durchgeführt, und aus den resultierenden Ergebnissen wurden die Mittelwerte aufgetragen. Die „Mock“-Probe weist konstant einen Wert um die 1.300 RLU auf. Betrachtet man die 3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz, so ist nach 3 h bereits ein dreimal so hoher Wert erkennbar als bei der „Mock“-Probe. Zwischen 3 h und 4 h bleibt dieser Wert relativ konstant. Die 3'-UTR-Mutante, welche eine intakte Polymerase-Funktion besitzt, zeigt nach 3 h und 4 h ähnlich hohe Werte wie die Mutante, welche keine Polymerase-Aktivität hat. 4 h post-Transfektion fällt nun der RLU-Wert der 3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz leicht ab, sodass nach 5 h noch ~ 3.000 RLU detektiert werden. Hier manifestiert sich erstmals ein Unterschied zwischen Mutante ohne und Mutante mit Polymerase-Defizienz, da 5 h post-Transfektion der detektierte Wert der replikationsfähigen Mutante auf ~ 5.000 RLU steigt. 6 h post-Transfektion wird die Differenz der beiden Mutanten noch größer, was eher durch den Anstieg der Werte der replikationsfähigen

Mutante bedingt ist als durch den Abfall der replikationsunfähigen Mutante. Der Wert der 3'-UTR-Mutante ist also 6 h nach der Transfektion auf ähnlichem Level wie die „Mock“-Probe. Die replikationsunfähige 3'-UTR-Mutante sinkt sogar ab 12 h post-Transfektion unter die Werte der „Mock“-Proben. Nach 48 h werden nur noch ~ 400 RLU bei der 3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz detektiert. Die Translationseffizienz der 3'-UTR-Mutante hingegen, welche die normale Polymerase-Aktivität besitzt, steigt weiterhin stark an. 12 h post-Transfektion werden ~ 74.000 RLU detektiert, 24 h post-Transfektion ~ 215.000 RLU und 48 h post-Transfektion wird ein Maximum von ~ 752.000 RLU gemessen.



**Abbildung 24. Logarithmische Darstellung (Basis: 10) der nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h, 24 h und 48 h post-Transfektion mittels Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) von HeLa-Zellen, welche mit MV-Mutante-RNA bzw. MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz transfiziert wurden (alle enthalten ein HiBiT).** Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach der Transfektion angegeben. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der HeLa-Zellen gemessen wurden. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um Mittelwerte, die jeweils aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurden. Die angegebenen Fehlerindikatoren (schwarze Balken) entsprechen den Standardabweichungen, die pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.

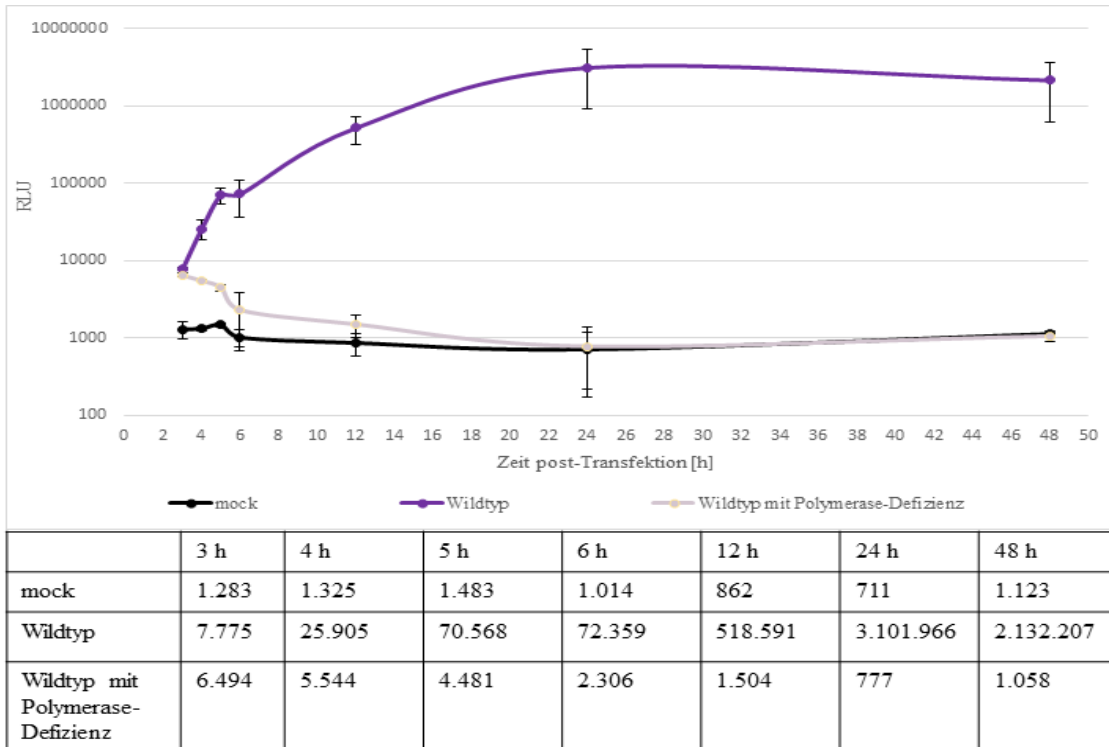
Abbildung 25 stellt logarithmisch zur Basis 10 die Werte der 3'-UTR-Mutante und die der 3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h und 24 h post-Transfektion dar. Die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen „Mock“-Werte wurden stets von den RLU der Proben subtrahiert. Es wurde hier eine Regressionskurve erstellt, um den Startpunkt der Replikation graphisch zu bestimmen. Die gestrichelten Linien entsprechen den Regressionsgeraden der jeweiligen Konstrukte. Die Funktion der 3'-UTR-Mutante lässt sich mit  $y = 91,166 * x^{2,5111}$  beschreiben und die des replikationsunfähigen Konstrukts mit  $y = 724.933 * x^{-4,552}$ . Der Schnittpunkt der beiden Geraden lässt sich errechnen, indem man die beiden Funktionen gleichsetzt und nach x auflöst. So erhält man den x-Achsenwert, welcher der Zeit entspricht, zu welchem bei beiden der Konstrukte die gleiche Anzahl an RLU gemessen wurden. Dieser Schnittpunkt – und somit der vermutete Startpunkt der Replikation – befindet sich bei den beiden 3'-UTR-Mutant-Konstrukten bei  $x = 3,6$  h.



**Abbildung 25. Logarithmische Darstellung (Basis: 10) der nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h und 24 h post-Transfektion mittels Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) von HeLa-Zellen, welche mit MV-Mutanten-RNA bzw. MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz transfiziert wurden (alle enthalten ein HiBiT) nach Abzug der Mock-Werte zur Bestimmung des Replikationsstartpunktes.** Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach der Transfektion angegeben. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der HeLa-Zellen gemessen wurden. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um Mittelwerte, welche aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurden. Die Mittelwerte der gemessenen RLU sind mit einem Punkt dargestellt. In gestrichelten

Linien sind jeweils die Regressionskurven eingezeichnet. Der Schnittpunkt der beiden Geraden auf der x-Achse liegt bei 3,566 h.

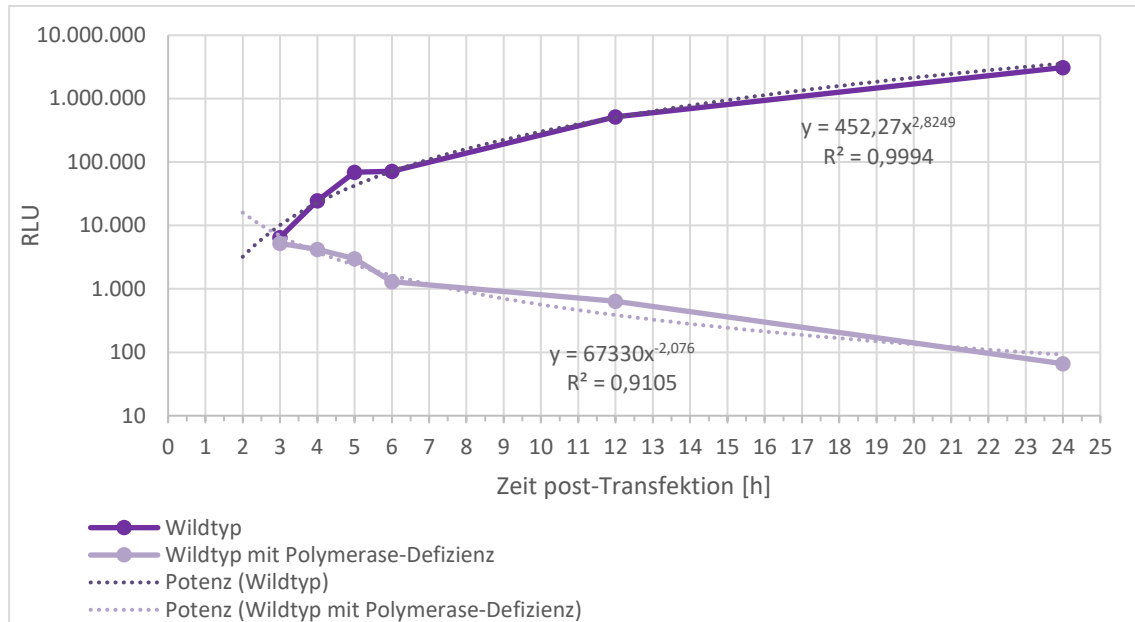
Abbildung 26 stellt die Ergebnisse von HeLa-Zellen, welche mit 0,3 µg MV-Wildtyp-RNA mit Defizienz der Polymerase transfiziert wurden, den schon oben gezeigten Werten des Wildtyps mit intakter Polymerase gegenüber. Dargestellt sind die RLU auf der y-Achse, logarithmiert zur Basis 10, welche post-Transfektion nach dem o.g. Verfahren geerntet und anschließend gemessen wurden. Das Experiment wurde mindestens 6 x durchgeführt und aus den resultierenden Ergebnissen wurden je die Mittelwerte aufgetragen. Die „Mock“-Probe entspricht jener, welche auch in Abbildung 23 und Abbildung 24 dargestellt ist. Auch die Zellen, welche mit Wildtyp-RNA transfiziert wurden, zeigen bereits 3 h post-Transfektion deutlich höhere Werte (6-fach) als die „Mock“-Probe. Zellen, welche mit dem replikationsunfähigen Wildtyp transfiziert wurden, zeigten ebenfalls höhere Werte. Bereits nach 4 h post-Transfektion manifestiert sich auch zwischen den beiden Wildtyp-Konstrukten ein Unterschied der gemessenen Lichteinheiten. Während die RLU des replikationsfähigen Wildtyps stark ansteigen, verzeichnen die replikationsunfähigen Wildtyp-Proben bereits einen leichten Abfall auf 5.535 RLU. Auch im weiteren Verlauf steigt der replikationsfähige Wildtyp weiter, während der replikationsunfähige sinkt. Die Differenz der beiden Konstrukte wächst immer weiter, so dass nach 6 h beim Wildtyp ~ 72.000 RLU gemessen werden und beim replikationsunfähigen Wildtyp ~ 2.000 RLU. Betrachtet man den replikationsunfähigen Wildtyp, so wird deutlich, dass die Werte im Verlauf der Zeit weiter sinken. Nach 12 h ist das Level der „Mock“-Probe nahezu erreicht. Die Expression des replikationsfähigen Wildtyps hingegen steigt weiterhin an, sodass nach 24 h sogar circa 3.000.000 RLU detektiert werden können. 48 h post-Transfektion kommt es zu einem Abfall der gemessenen Lichtintensität.



**Abbildung 26. Logarithmische Darstellung (Basis: 10) der nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h und 48 h post-Transfektion mittels Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) von HeLa-Zellen, welche mit 0,3 µg MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA mit Polymerase-Defizienz pro 12-Well transfiziert wurden (alle enthalten ein HiBiT).** Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach der Transfektion angegeben. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der HeLa-Zellen gemessen wurden. Hier dargestellt sind alle erhobenen Zeitpunkte für die o.g. Konstrukte. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um Mittelwerte, welche aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurden. Die angegebenen Fehlerindikatoren entsprechen den Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.

Abbildung 26 stellt logarithmisch zur Basis 10 die Werte des Wildtyps und die des Wildtyps mit Polymerase-Defizienz post-Transfektion dar. Die zum jeweiligen Zeitpunkt gemessenen „Mock“-Werte wurden stets von den RLU der Proben subtrahiert. Die gestrichelten Linien entsprechen den Regressionsgeraden der jeweiligen Konstrukte. Die Funktionsgleichung der Regressionsgeraden des Wildtyps ist  $y = 452,27 * x^{2,8249}$  und die des replikationsunfähigen Konstrukts  $y = 67.330 * x^{-2,076}$ . Der Schnittpunkt der beiden Geraden lässt sich errechnen, indem man die beiden Funktionsgleichungen gleichsetzt und nach x auflöst. So erhält man den x-Achsenwert, welcher der Zeit entspricht, zu welchem bei beiden

der Konstrukte die gleiche Anzahl an RLU gemessen werden. Dieser Schnittpunkt befindet sich bei den beiden Wildtyp-Konstrukten bei  $x = 2,8$  h.



**Abbildung 27. Logarithmische Darstellung (Basis: 10) der nach 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 12 h und 24 h post-Transfektion mittels Luminometer gemessenen relativen Lichteinheiten (RLU) von HeLa-Zellen, welche mit 0,3 µg MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA mit Polymerase-Defizienz pro 12-Well transfiziert wurden (alle enthalten ein HiBiT) nach Abzug der Mock-Werte.** Auf der Abszisse ist die Zeit in Stunden nach der Transfektion angegeben. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der HeLa-Zellen gemessen wurden. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um einen Mittelwert, welcher aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurde. Die Mittelwerte der gemessenen RLU sind mit einem Punkt dargestellt. In gestrichelten Linien sind jeweils die Regressionsgeraden eingezeichnet. Der Schnittpunkt der beiden Geraden auf der x-Achse liegt bei circa 2,8 h.

Vergleicht man nun Abbildung 24 und Abbildung 26 abschließend miteinander (in Abbildung 23 sind die replikationsfähigen Konstrukte im Vergleich dargestellt) um auf die Unterschiede zwischen Wildtyp und 3'-UTR-Mutante einzugehen, so fällt auf, dass die beiden replikationsfähigen Konstrukte einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Beim Wildtyp werden stets höhere Werte gemessen als bei der 3'-UTR-Mutante. Auffällig ist, dass der Anstieg des Wildtyp bereits 3 h post-Transfektion beginnt, während die 3'-UTR-Mutante erst nach 4 h eine leichte Steigung verzeichnet. Auch sind die Ausgangswerte, welche 3 h post-Transfektion detektiert wurden, beim Wildtyp höher. Während der Wildtyp sich bereits nach 3 h auf einem Level von 7.700 RLU befindet, liegt die Mutante mit

~ 3.000 RLU deutlich darunter. Dieser Unterschied der Ausgangswerte wird auch bei den replikationsunfähigen Konstrukten sichtbar, welche nach 3 h ungefähr die gleichen Werte aufweisen wie ihre korrespondierenden replikationsfähigen Konstrukte. Während die beiden Wildtyp-Konstrukte sich nur nach 3 h post-Transfektion auf einem ähnlichen Level befinden und sich nach 4 h post-Transfektion bereits ein deutlicher Unterschied manifestiert, so befinden die 3'-UTR-Mutant-Konstrukte nach 3 h und nach 4 h noch in einem ähnlichen Bereich. Erst nach 5 h post-Transfektion unterscheiden sich die beiden 3'-UTR-Mutanten sichtbar. Vergleicht man nur die beiden replikationsunfähigen Konstrukte miteinander und berechnet mithilfe eines zweiseitigen t-Tests (unter der Annahme, dass die hypothetische Differenz 0 beträgt und bei  $\alpha = 0,05 = 5\%$ ) den p-Wert zu allen gemessenen Zeitpunkten, so ergibt sich für den Zeitpunkt 3 h post-Transfektion ein p-Wert von 0,0001 und somit eine statistisch signifikante Differenz zwischen dem replikationsunfähigen Wildtyp und der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante. Auch nach 4 h ( $p = 0,004$ ), sowie nach 5 h post-Transfektion ( $p = 0,03$ ) lässt sich ein signifikanter Unterschied feststellen.

Fazit:

Bei sehr frühen Zeitpunkten ist die Stärke der Expression abhängig von der Funktionalität des GARS-bindenden Elements (GBE), nicht von der Funktionalität der Polymerase. Dies deutet darauf hin, dass das GBE Einfluss auf die Regulation der Translation des Mengovirus-Genoms hat.

#### **4.4 Nachweis der Produktion von viralen Partikeln in neuronalen Zelllinien**

Neben HeLa-Zellen wurden die Plaque Assays auch mit neuronalen Zellen durchgeführt. Da das MV in Primaten zu Lähmungserscheinungen führt [3], liegt die Vermutung nahe, dass das Virus vor allem neuropathogen ist und neuronale Zellen befällt. Ziel dieser Arbeit war es, zu analysieren, ob sich die Synthese viraler Proteine in neuronalen Zellen von der in epithelialen Zellen unterscheidet. Es wurden einerseits Neuroblasten aus dem Menschen (SK-N-AS-Zelllinie) und andererseits Neuroblasten aus der Maus (Neuro-2A-Zelllinie) verwendet.

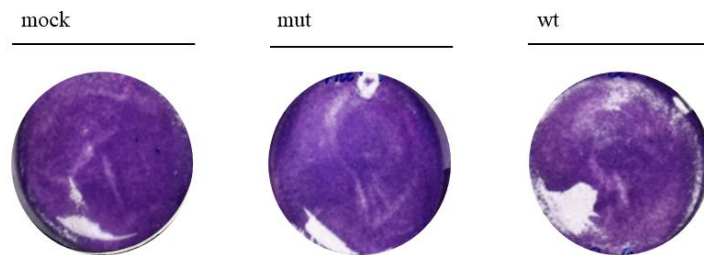
SK-N-AS-Zellen sind epitheliale menschliche Neuroblasten und haben eine polygonale Morphologie. Sie exprimieren einen Rezeptor für den Insulin-like-growth-factor I (IGF-I) sowie für Vimentin. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 39 h. Ergänzend wurden auch Neuro-2A-Zellen verwendet, da diese nicht menschlichen Ursprungs sind, sondern aus der Hausmaus (lat. *mus musculus*) stammen und das MV v.a. für Nager hoch pathogen ist (1.1). Sie haben eine amöboide Morphologie und bilden zum Teil lange Ausläufer. Neuro-2A-Zellen haben eine Verdopplungszeit von ca. 70 h. Diese Zelllinie wurde gewählt, da bereits bekannt ist, dass sie vom MV infiziert werden kann [55]. Da unter dem Mikroskop festgestellt werden konnte, dass Neuro-2A-Zellen zu keinem Zeitpunkt einen konfluenten Zellrasen bildeten, sondern in Türmen aufeinander wuchsen, wurde es nicht für sinnvoll gehalten, einen Plaque Assay mit dieser Zelllinie durchzuführen. Da stets leere Felder auf dem Zellrasen der Neuro-2A-Zellen entstanden, hätte man diese nicht von einer eventuellen Plaque-Bildung differenzieren können. Aufgrund dessen wurden Neuro-2A-Zellen nach dem o.g. Schema ebenfalls transfiziert bzw. infiziert, virale Partikel sollten dann aber mittels Luciferase Assay nachgewiesen werden. Plaque Assays wurden daher nur mit den SK-N-AS-Zellen durchgeführt.

#### **4.4.1 Plaque Assay mit SK-N-AS-Zellen**

##### **4.4.1.1 Transfektion**

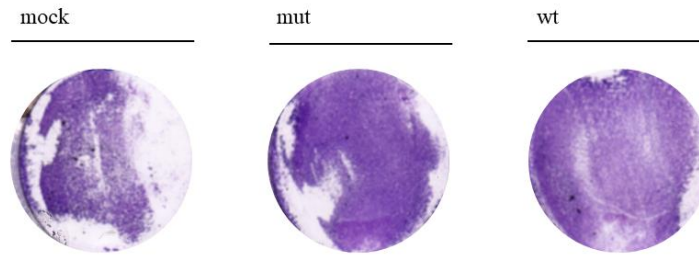
24 h vor der Transfektion mittels Lipofektion wurden  $0,5 \times 10^6$  SK-N-AS-Zellen auf eine 6-Well-Platte ausgesät, sodass der Zellrasen am Tag der Transfektion zu fast 100 % konfluent war. Im Vergleich zu HeLa-Zellen wurden mehr SK-N-AS-Zellen am Vortag ausgesät, da die Verdopplungszeit von HeLa-Zellen circa 22 h beträgt, die von SK-N-AS-Zellen jedoch nur ungefähr 39 h. Die Zellen wurden nicht mit Polymer überschichtet. 48 h nach der Transfektion von  $0,5 \mu\text{g}$  RNA wurde der Überstand für die Infektion (3.1.7) abgenommen, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und anschließend mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt. Nach Färbung der „Mock“-Probe war ein nahezu vollständig konfluenten Zellrasen sichtbar, was auch zu erwarten war, da die Zellen nicht in Kontakt mit MV-RNA gekommen waren (Abbildung 28). Vereinzelt war der Zellrasen vom Boden des Wells durch das anschließende Waschen flächig gelöst und weggespült worden.

Bei den Zellen, welche mit MV-Mutanten-RNA transfiziert worden waren, ließ sich kein nennenswerter Unterschied zur „Mock“-Probe erkennen. Auch hier war ein konfluenter Zellrasen mit einigen flächigen Ablösungen erkennbar. Gleiches konnte für die Zellen, die mit MV-Wildtyp-RNA transfiziert worden waren, beobachtet werden.



**Abbildung 28.** SK-N-AS-Zellen nach Transfektion mit MV-Wildtyp- (wt) bzw. MV-Mutanten-RNA (mut). 48 h post-Transfektion wurden die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und anschließend mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

Parallel wurden 24 h vor der Transfektion  $0,5 \times 10^6$  Zellen auf eine 6-Well-Platte ausgesät und ebenso mittels Lipofektion transfiziert. Hier wurde dann bereits 5 h post-Transfektion mit  $0,5 \mu\text{g}$  RNA und anschließender Inkubation im Brutschrank das Medium entfernt und die Zellen – im Gegensatz zum vorigen Experiment – mit Polymer, bestehend aus 1 %-iger Agarose und 1 x DMEM mit insgesamt 1,5 % FBS überschichtet. Nach 48 h wurde diese Schicht vorsichtig entfernt, die Zellen am Boden des Wells mit PFA fixiert und mit Kristallviolett gefärbt (Abbildung 29).

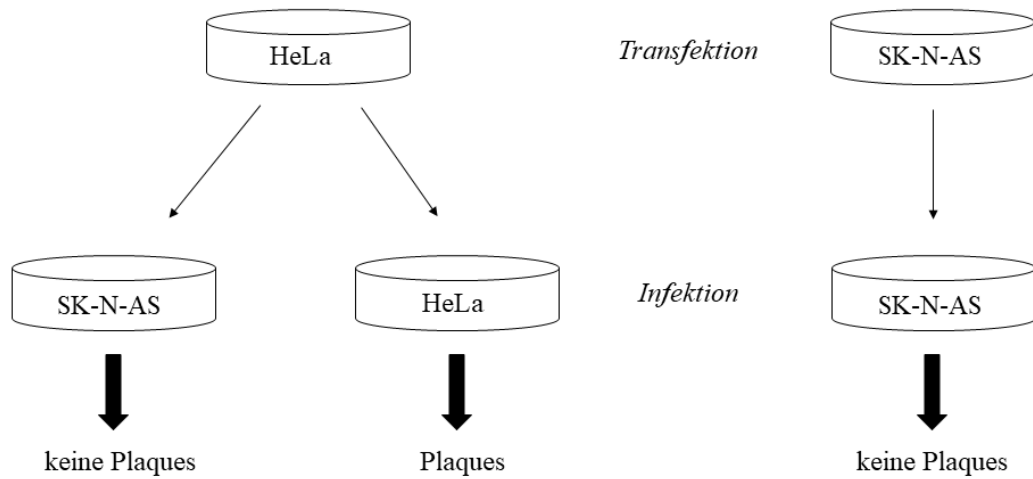


**Abbildung 29. SK-N-AS-Zellen nach Transfektion mit MV-Wildtyp- (wt) bzw. MV-Mutanten-RNA (mut).** Nach fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Medium abgenommen und ein Polymer aus Agarose auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 48 h Inkubation wurde das Polymer entfernt, die Zellen mit 3 %-igem PFA fixiert und mit 1 %-igem Kristallviolett gefärbt.

Im Vergleich zu den SK-N-AS-Zellen, die 48 h post-Transfektion fixiert und gefärbt jedoch nicht mit einem Overlay beschichtet wurden, kann man erkennen, dass die Zellzahl sich verringert hat. Die Flächen, an denen keine Zellen mehr sichtbar sind, sind größer und häufiger zu beobachten. Zwischen der „Mock“-Probe, Mutante und Wildtyp lässt sich jedoch kein nennenswerter Unterschied feststellen. Die Überschichtung der Zellen mit dem Polymer scheint den Zellen also in einem gewissen Ausmaß zu schaden. Plaques ließen sich aber aus unbekanntem Gründen nicht darstellen. Das oben beschriebene Experiment wurde fünfmal wiederholt und führte immer zu den gleichen Ergebnissen.

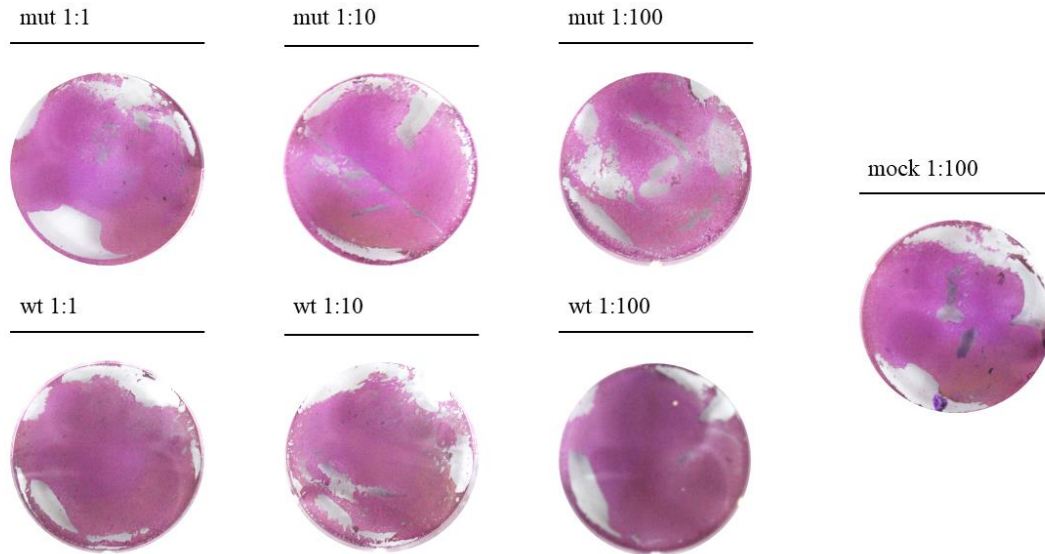
#### 4.4.1.2 Infektion

Nach Infektion der SK-N-AS Zellen mit viralen Partikeln, welche 48 h nach Lipofektion mit MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Mutanten-RNA gewonnen wurden, konnte zwei Stunden später eine Überschichtung mit Agarose angefertigt werden. Nach 72-stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die Zellen fixiert und gefärbt werden (3.1.9). Wie in Abbildung 30 vereinfacht dargestellt ist, wurden HeLa-Zellen transfiziert, mit deren potentiell infektiösen Überstand 48 h post-Transfektion frische HeLa-Zellen, sowie frische SK-N-AS-Zellen infiziert werden konnten. Zudem wurden SK-N-AS-Zellen mit RNA transfiziert, deren potentiell infektiöser Überstand für die Infektion von frischen HeLa- bzw. SK-N-AS-Zellen verwendet wurde.



**Abbildung 30.** Schematische Darstellung des Transfektions- und Infektionsmusters von HeLa- und SK-N-AS-Zellen, sowie die daraus resultierenden Ergebnisse.

HeLa- und SK-N-AS-Zellen wurden 24 h vor der Infektion auf 6-Well-Platten ausgesät, sodass sie am Tag der Infektion zu 100 % konfluent waren. Das Medium der transfizierten SK-N-AS-Zellen wurde pur und in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 auf die frisch ausgesäten Zellen gegeben. Die infizierten SK-N-AS-Zellen zeigten weder pur noch in einer der eingesetzten Verdünnungsstufen Unterschiede zur „Mock“-Probe. Der Zellrasen war nach wie vor konfluent, und es waren keine Merkmale der Zelllyse erkennbar (Abbildung 31). Teilweise waren Zellen jeder Verdünnungsstufe unspezifisch vom Boden des Wells gelöst worden. Dies war allerdings auch bei der „Mock“-Probe zu beobachten.



**Abbildung 31. SK-N-AS-Zellen, welche 72 h nach Infektion mit PFA fixiert und mit Kristallviolett gefärbt wurden.** Sie wurden mit dem Überstand von, mit MV-Mutanten-RNA (mut) bzw. MV-Wildtyp-RNA (wt) transfizierten SK-N-AS-Zellen pur bzw. mit den Verdünnungsfaktoren 1:10 und 1:100 infiziert. Dieser Überstand wurde 48 h post-Transfektion entnommen.

Um auszuschließen, dass die fehlende Plaque-Bildung auf mangelnde virale Partikel im transfizierten Medium der SK-N-AS-Zellen zurückzuführen ist, wurde das oben beschriebene Vorgehen auch mit Medium von transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Frische HeLa- und SK-N-AS-Zellen wurden pur und in den Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100 mit dem potentiell infektiösen Medium von den transfizierten HeLa-Zellen infiziert. Die HeLa-Zellen zeigten, wie zu erwarten, die bereits beschriebene Plaque-Bildung. Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass das Medium, welches für die Infektion verwendet wurde, virale Partikel enthielt. Dennoch zeigten die SK-N-AS-Zellen keine Plaque-Bildung nach Infektion mit dem infektiösen Medium der HeLa-Zellen. Es konnte keine Reduktion der Zellzahl im Vergleich zur „Mock“-Probe beschrieben werden. Die SK-N-AS-Zellen lösten sich flächig vom Boden des Wells ab, unabhängig davon, ob es sich um „Mock“-Probe, Wildtyp oder Mutante handelte.

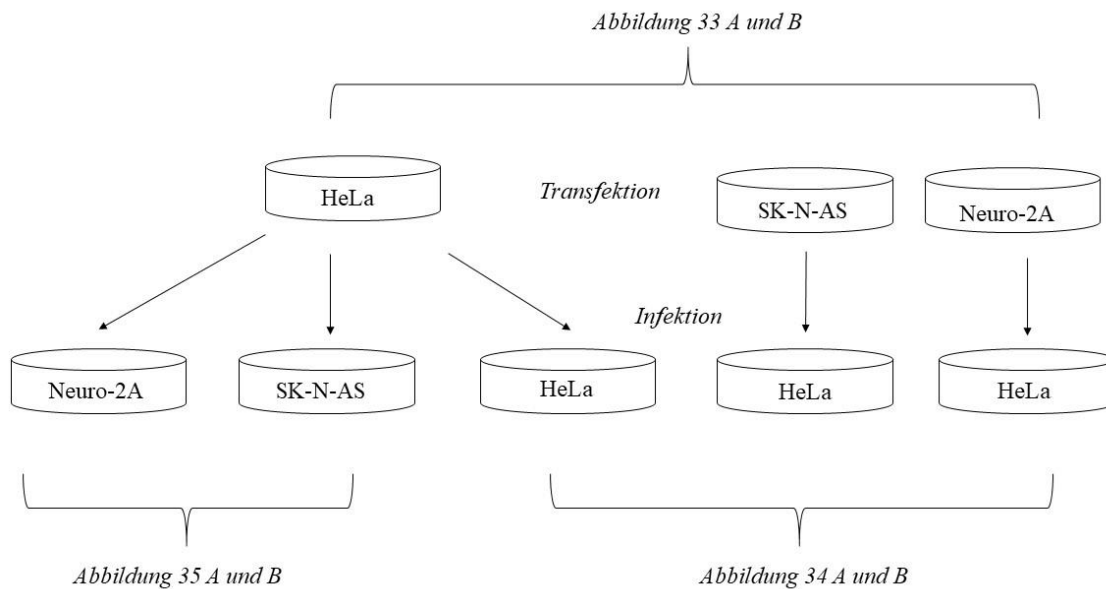
Fazit:

Aus unbekanntem Gründen konnten trotz verschiedener verwendeter Methoden mit den neuronalen Zelllinien – im Gegensatz zu den HeLa-Zellen – keine

Plaques im Zellrasen visualisiert werden. Daher musste die MV-Expression in den neuronalen Zellen mithilfe des HiBiT-Assays analysiert werden.

#### 4.4.2 Lumineszenznachweis SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen

Da ein Plaque Assay mit Neuro-2A-Zellen aus den o.g. Gründen nicht für sinnvoll erachtet wurde und diese Tests mit SK-N-AS-Zellen keine Aussage darüber treffen ließen, ob SK-N-AS-Zellen sich transfizieren und/oder infizieren lassen bzw. einen Rezeptor für das MV besitzen, wurden weitere Versuche mit diesen Zelllinien gemacht, diesmal unter Verwendung des HiBiT-Assays.



**Abbildung 32.** Schematische Darstellung des Transfektions- und Infektionsmusters von HeLa-, SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen, sowie die Erläuterung zur Zusammenfassung in den Abbildungen 33, 34 und 35.

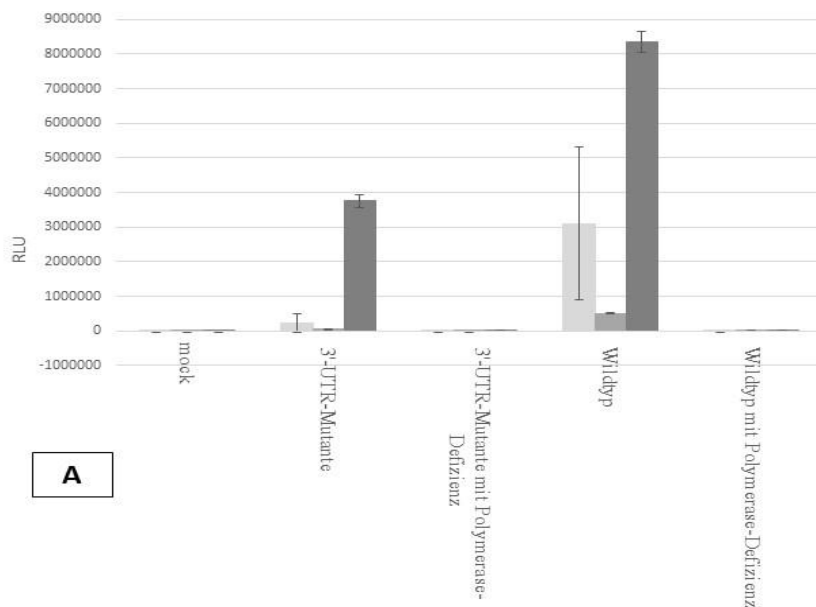
Am Tag vor der Transfektion wurden  $1,2 \times 10^5$  HeLa-Zellen,  $2,1 \times 10^5$  SK-N-AS-Zellen, sowie  $3,8 \times 10^5$  Neuro-2A-Zellen pro 12-Well ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit  $0,3 \mu\text{g}$  RNA pro Konstrukt und Well. Es wurden in diesem Experiment MV-Wildtyp, MV-Wildtyp mit Polymerase-Defizienz, MV-3'-UTR-Mutante und MV-3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz verwendet, alle Konstrukte waren mit einer HiBiT-Sequenz versehen (3.5.2). 24 h post-Transfektion wurden die ebenfalls am Vortag frisch ausgesäten, HeLa-Zellen pur mit dem Überstand der

transfizierten HeLa-, SK-N-AS- bzw. Neuro-2A-Zellen infiziert. Die HiBiT-Expression in den Zellen, die dieses potentiell infektiöse Medium produziert hatten, wurde anschließend mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System und Luminometer gemessen (Abbildung 33 A und B). Auch die HeLa-Zellen wurden 24 h post-Transfektion auf ihre Lumineszenz hin untersucht.

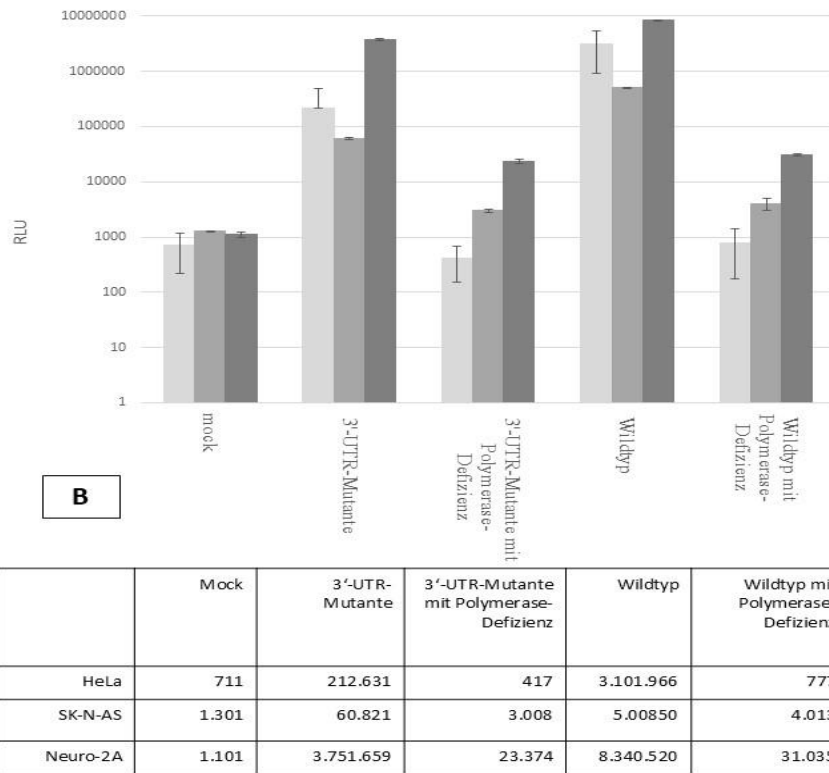
Die anschließende Infektion von HeLa-Zellen mit dem nach Transfektion entstandenen Medium, das von den drei verschiedenen Zelllinien gewonnen wurde, diente dazu, zu prüfen, ob die neuronalen Zelllinien auch infektiöse Viren freisetzen können. Eine Infektion von HeLa-Zellen mit dem HeLa-Zellen-Überstand erfolgte, um zu analysieren, ob auch Zellen, welche mit HiBiT-gekoppelter RNA transfiziert wurden, Virionen freisetzen können, oder ob das Einfügen eines HiBiTs ins virale Genom einen Einfluss auf deren Freisetzung hat (Abbildung 34 A und B).

In Abbildung 33, B sind die gemessenen RLU im Zehnerlogarithmus auf der Ordinate dargestellt, die nach 24 h post-Transfektion der beiden neuronalen Zelllinien gemessen wurden. Zum Vergleich sind zusätzlich die durchschnittlichen RLU von HeLa-Zellen hinzugefügt worden, welche bereits in 4.3 erläutert wurden. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Konstrukte abgebildet, die alle ein HiBiT enthalten, welches an das virale Protein 2B gekoppelt ist. Die Transfektion erfolgte 24 h nach Aussäen von SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen mittels Lipofektion. 24 h post-Transfektion wurde der Überstand abgenommen und für die Infektion kurz in Röhrchen aufbewahrt. Nach Waschen mit 1 x PBS und Hinzufügen des Nano-Glo® HiBiT Lytic Reagenz wurden die Zellen für 10 min bei RT inkubiert, sodass sie lysierten und sich vom Boden des Wells lösen konnten. Anschließend erfolgte die luminometrische Bestimmung des Lysats. Die "Mock"-Proben weisen bei SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen ähnlich niedrige Durchschnittswerte auf. Betrachtet man die 3'-UTR-Mutante, welche eine intakte Funktion der 3D Polymerase besitzt, so wird deutlich, dass Neuro-2A-Zellen eine viel höhere Virusproduktion haben als SK-N-AS-Zellen und 18-fach höhere als HeLa-Zellen. Die Messungen der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante, welche die virale Translation isoliert darstellt, zeigen, dass auch die Translation der Neuro-2A-Zellen 24 h nach Transfektion höhere Werte aufweist als die der SK-N-AS-Zellen sowie der HeLa-Zellen. Vergleicht man die

gemessenen RLU der drei Zelllinien miteinander, welche mit der MV-RNA transfiziert wurden, so fällt auch hier auf, dass die Neuro-2A-Zellen die höchsten Werte aufweisen. SK-N-AS-Zellen hingegen verzeichnen nach Transfektion ca. 1/16 der Lichteinheiten, HeLa-Zellen ungefähr die Hälfte der Neuro-2A-Zellen. Gleiches zeigt sich bei dem replikationsunfähigen Wildtyp. In Abbildung 33, B wurde bewusst die logarithmische Darstellung gewählt, damit auch die niedrigeren Werte der "Mock"-Probe und den replikationsunfähigen Konstrukten ersichtlich sind. Um die Differenz zwischen der Neuro-2A-Zelllinie und den anderen Zelllinien zu betonen (Abbildung 33, A), wurde zusätzlich eine nicht logarithmische Darstellung von Abbildung 33, B beigefügt.



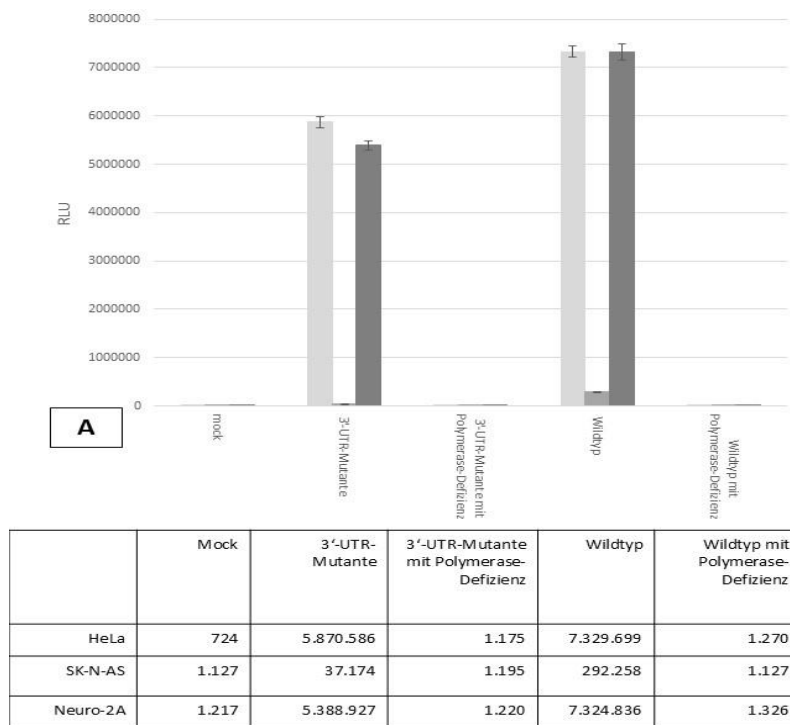
	Mock	3'-UTR-Mutante	3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz	Wildtyp	Wildtyp mit Polymerase-Defizienz
HeLa	711	212.631	417	3.101.966	777
SK-N-AS	1.301	60.821	3.008	5.00850	4.013
Neuro-2A	1.101	3.751.659	23.374	8.340.520	31.035

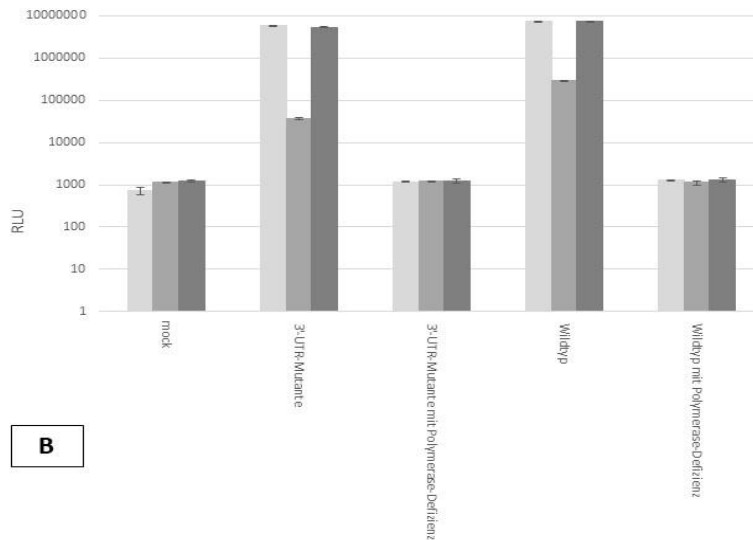


**Abbildung 33.** Nicht-logarithmische (A) bzw. logarithmische (B) Darstellung (Basis: 10) der Transfektion von HeLa- (hellgrau), SK-N-AS- (grau) bzw. Neuro-2A-Zellen (dunkelgrau) mit MV-Mutanten-RNA, MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz, MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA mit Polymerase-Defizienz (alle enthalten ein HiBiT). 24 h post-Transfektion wurden die Zellen mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System lysiert und mittels Luminometer auf ihre Lumineszenz hin gemessen. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der Zellen gemessen wurden. Hier dargestellt sind alle erhobenen Zeitpunkte für die o.g. Konstrukte. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um einen Mittelwert, welcher aus mindestens sechs Experimenten gebildet wurde. Die angegebenen Fehlerindikatoren entsprechen den Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.

In Abbildung 34, B sind die RLU logarithmisch dargestellt, welche 24 h post-Infektion von HeLa-Zellen gemessen wurden. Die Infektion erfolgt pur mit Medium, welches 24 h post-Transfektion von HeLa-, SK-N-AS- bzw. Neuro-2A-Zellen produziert wurde. Die mit Überstand der HeLa-, SK-N-AS- bzw. Neuro-2A-Zellen (zuvor mit 3'-UTR-Mutant-RNA transfiziert) infizierten HeLa-Zellen zeigten deutlich höhere Werte als die der "Mock"-Proben. Wurde zur Infektion das Medium der Neuro-2A-Zellen verwendet, so konnten beim 3'-UTR-Mutant-Konstrukt mehr als 10-mal so hohe Werte gemessen wie bei den SK-N-AS-Zellen. Ähnlich hohe Werte weisen die HeLa-Zellen auf, wenn sie mit dem 3'-

UTR-Mutant-Medium von HeLa-Zellen infiziert wurden. Betrachtet man das Wildtyp-Konstrukt, so sind die Werte in jeder Zelllinie höher als jene der 3'-UTR-Mutante. Bei Infektion mit potentiell infektiösem Medium von SK-N-AS-Zellen wird ungefähr das Achtfache der 3'-UTR-Mutante detektiert. Unabhängig davon, ob die HeLa-Zellen mit dem Medium der Neuro-2A-Zellen oder mit dem der HeLa-Zellen infiziert werden, so werden  $\sim 7.000.000$  RLU gemessen. Wurden die HeLa-Zellen mit Medium von replikationsunfähigen Konstrukten infiziert, so machte es keinen Unterschied, von welcher der drei Zelllinien das Medium verwendet wurde. Es wurden stets Werte im Bereich von ca. 1.000 RLU gemessen. Diese Werte waren also den Werten der "Mock"-Probe sehr ähnlich. Abbildung 34, A entspricht Abbildung 34, B, jedoch ohne logarithmische Darstellung der Ordinate. Diese Darstellung wurde gewählt, um die Differenz zwischen 3'-UTR-Mutante und Wildtyp darzustellen, da diese Unterschiede in der logarithmischen Darstellung nicht unmittelbar ersichtlich sind.





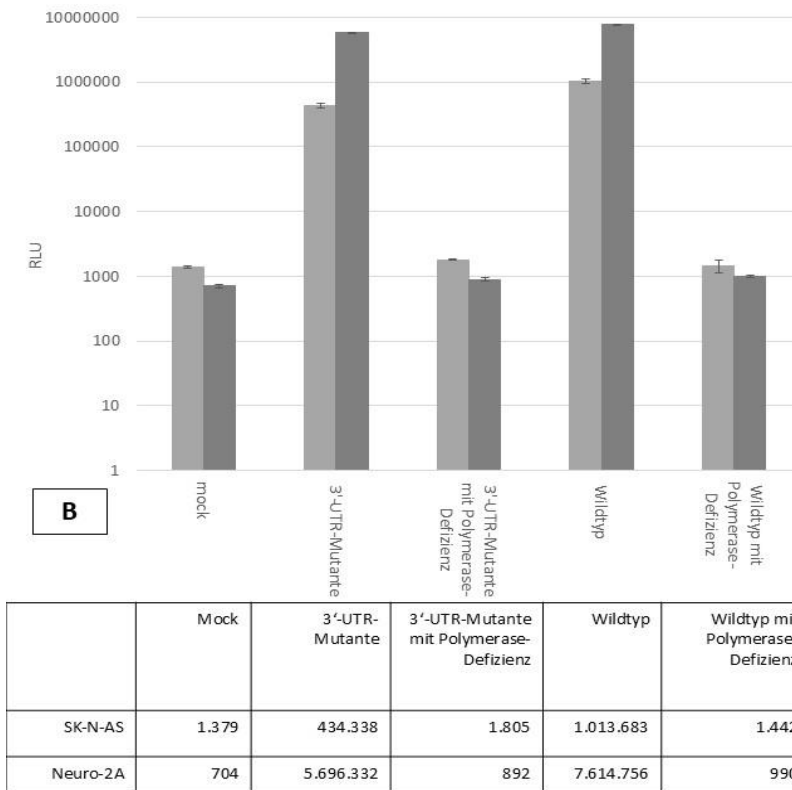
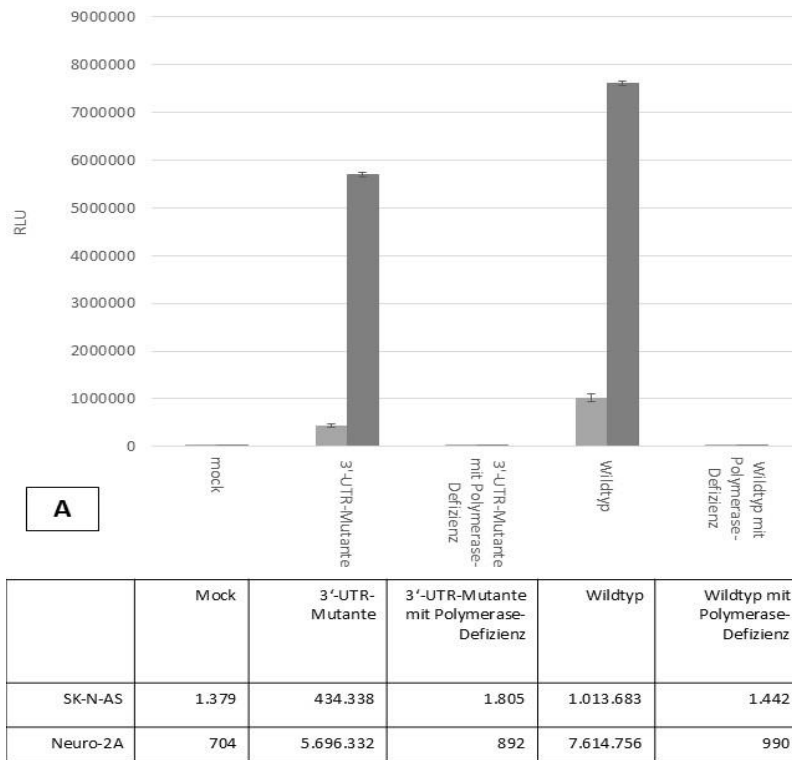
	Mock	3'-UTR-Mutante	3'-UTR-Mutante mit Polymerase-Defizienz	Wildtyp	Wildtyp mit Polymerase-Defizienz
HeLa	724	5.870.586	1.175	7.329.699	1.270
SK-N-AS	1.127	37.174	1.195	292.258	1.127
Neuro-2A	1.217	5.388.927	1.220	7.324.836	1.326

**Abbildung 34. Nicht-logarithmische (A) bzw. logarithmische (B) Darstellung (Basis: 10) der Infektion von HeLa-Zellen mit potentiell infektiösem Überstand, welcher 24 h post-Transfektion von HeLa- (hellgrau), SK-N-AS- (grau) bzw. Neuro-2A-Zellen (dunkelgrau) mit MV-Mutanten-RNA, MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz, MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA mit Polymerase-Defizienz (alle enthalten ein HiBiT) gewonnen wurde. Der Überstand wurde pur auf die Zellen gegeben. 24 h post-Infektion wurden die Zellen mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System lysiert und mit dem Luminometer auf ihre Lumineszenz hin gemessen. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der Zellen gemessen wurden. Hier dargestellt sind alle erhobenen Zeitpunkte für die o.g. Konstrukte. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um einen Mittelwert, welcher aus mindestens vier Experimenten gebildet wurde. Die angegebenen Fehlerindikatoren entsprechen den Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.**

Des Weiteren wurden auch HeLa-Zellen mit den vier o.g. HiBiT-Konstrukten transfiziert, nach 24 h luminometrisch bestimmt und der produzierte Überstand pur auf am Vortag ausgesäte SK-N-AS- bzw. Neuro-2A-Zellen gegeben. Es wurde der Überstand von HeLa-Zellen verwendet, da aus vorangegangenen Experimenten bereits davon auszugehen war, dass dieser Überstand infektiös ist. 24 h nach der Infektion der neuronalen Zellen wurden auch diese Zellen gewaschen und dann mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System lysiert und mit dem Luminometer untersucht. Sinn dieses Experiment war es, zu

analysieren, ob die neuronalen Zellen sich vom Mengovirus infizieren lassen, also einen passenden Oberflächenrezeptor besitzen.

In Abbildung 35, B sind die gemessenen RLU im Zehnerlogarithmus auf der Ordinate aufgetragen, welche 24 h post-Infektion bei SK-N-AS-Zellen bzw. Neuro-2A-Zellen gemessen wurden. Auch hier wurde Abbildung 35, A als nicht-logarithmische Darstellung von Abbildung 35, B hinzugefügt um den Unterschied von 3'-UTR-Mutante und Wildtyp nach Infektion zu verdeutlichen. Betrachtet man die Zellen, die mit Überstand infiziert wurden, welcher von HeLa-Zellen mit transfizierter 3'-UTR-Mutant-RNA produziert wurde, so werden bei den Neuro-2A-Zellen ~ 11 x so hohe Werte gemessen wie bei den SK-N-AS-Zellen. Die Infektion mit MV-Wildtyp-Medium zeigte bei beiden Zelllinien höhere Werte, als die mit Mutanten-Medium infizierten. Eine Inkubation der neuronalen Zellen mit dem Medium der HeLa-Zellen, die mit den replikationsunfähigen RNA-Konstrukten transfiziert wurden, führte zu ähnlich niedrigen Werten, wie die der "Mock"-Proben. Dabei war es gleich, ob es sich um den replikationsunfähigen Wildtyp oder die 3'-UTR-Mutante handelte.



**Abbildung 35. Nicht-logarithmische (A) bzw. logarithmische (B) Darstellung (Basis: 10) der Infektion von SK-N-AS- (grau) bzw. Neuro-2A-Zellen (dunkelgrau) mit infektiösem Überstand, welcher 24 h post-Transfektion von HeLa-Zellen mit MV-Mutanten-RNA, MV-Mutanten-RNA mit Polymerase-Defizienz, MV-Wildtyp-RNA bzw. MV-Wildtyp-RNA mit Polymerase-Defizienz pro 12-Well (alle enthalten ein HiBiT) gewonnen wurde. Der Überstand wurde pur auf die Zellen gegeben. 24 h post-Infektion wurden die Zellen gewaschen, mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System lysiert und mit dem**

Luminometer auf ihre Lumineszenz hin untersucht. Die Ordinate beschreibt den Zehnerlogarithmus der RLU, welche mittels Luminometer nach Lyse der Zellen gemessen wurden. Hier dargestellt sind alle erhobenen Zeitpunkte für die o.g. Konstrukte. Bei den verwendeten Daten handelt es sich um einen Mittelwert, welcher aus mindestens vier Experimenten gebildet wurde. Die angegebenen Fehlerindikatoren entsprechen den Standardabweichungen, welche pro Konstrukt und Zeitpunkt aus den Messungen entstanden sind.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich alle drei verwendeten Zelllinien vom MV transfizieren lassen (Neuro-2A > HeLa > SK-N-AS; Abbildung 33, B). Außerdem wird deutlich, dass das Medium aller Zelllinien infektiös ist (Abbildung 34, B) und sich HeLa-, Neuro-2A-, sowie SK-N-AS-Zellen vom MV infizieren lassen (Abbildung 34, B und Abbildung 35, B). Eine Plaque-Bildung konnte aus technischen Gründen jedoch nur in HeLa-Zellen detektiert werden.

Fazit:

Wie in HeLa-Zellen, ist die Virusproduktion der MV-Wildtyp auch in neuronalen Zellen höher als die Mutante. Die oben aus den Experimenten mit HeLa-Zellen gezogenen Schlüsse über den Einfluss der GARS-Bindung für die Replikation und die Translation des MV-Genoms können daher auch als repräsentativ für neuronale Zellen betrachtet werden.

## 5 Diskussion

Das MV besteht aus einer einzelsträngigen und positiv-orientierten Ribonukleinsäure (ssRNA) und gehört zur Familie der *Picornaviridae* [56]. Es befällt v.a. Nager, kann aber auch andere Säugetiere infizieren [6, 7]. In der Publikation von Andreev et al. 2012 konnte gezeigt werden, dass die Bindung der Glycyl-tRNA-Synthetase (GARS) an die 5'-UTR-des Poliovirus – welches ebenfalls zur Familie der *Picornaviridae* gehört – die Bildung des 48S-Initiationskomplexes fördert und so die Translation positiv beeinflusst [27]. Ziel dieser Arbeit war es, die GARS als möglichen Interaktionspartner des MV-RNA-Genoms zu charakterisieren und zu analysieren, da im SL I der 3'-UTR ein konserviertes GARS-bindendes Element gefunden wurde.

### 5.1 Methodische Diskussion

#### 5.1.1 Einfluss der Transfektion auf die Infektion

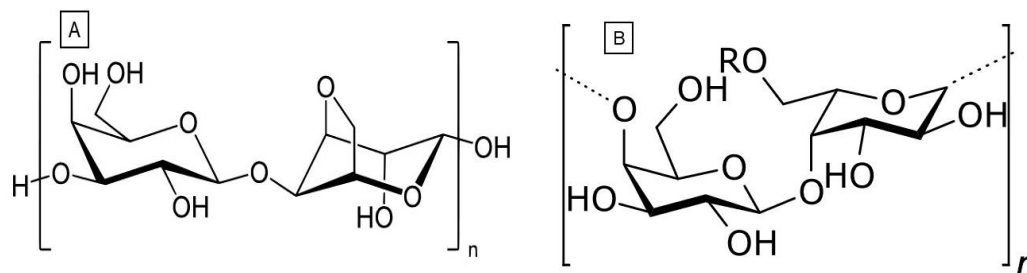
Zu bedenken ist, dass bereits in den Plaque Assays (Abbildung 16) deutlich wurde, dass nach Transfektion mit MV-Wildtyp-RNA mehr Zellen lysiert waren als nach Transfektion mit 3'-UTR-Mutant-RNA. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch im Überstand der mit MV-Wildtyp-RNA transfizierten Zellen mehr virale Partikel enthalten sind als in jenen, die mit der Mutant-RNA transfiziert wurden. Dies bedeutet jedoch, dass bei den anschließenden Infektionen (Abbildung 20) die Zellen unterschiedliche Konzentrationen an virushaltigem Medium ausgesetzt wurden und es bereits durch diese Ausgangssituation nicht möglich ist einen direkten Vergleich zwischen den beiden Versuchen ziehen zu können. Bei den nachfolgenden Titrationsen potenziert sich dieser Effekt, sodass die niedrigeren RLU-Werte/Plaques der mit 3'-UTR-Mutant infizierten Zellen nicht ausschließlich auf die erfolgte Infektion zurückzuführen sind, sondern bereits auch durch die niedrigere Konzentration an viralen Partikeln im Überstand beeinflusst werden.

Um diesen Effekt zu verhindern, müsste man nach der Entnahme des Mediums, welches post-Transfektion entstanden ist, die viralen Partikel auszählen und anschließend entsprechend titrieren. So könnte man gewährleisten, dass die Medien, welche zur Infektion der frischen Zellen genutzt werden bei dem Wildtyp, sowie bei der Mutante die gleiche Anzahl an viralen Partikeln enthalten. Folglich

wäre ein direkter Vergleich der Plaques post-Infektion möglich und nicht durch vorherige Ergebnisse der Transfektion beeinflusst.

### 5.1.2 Inhibitionsfaktoren im Agar verhindern die Plaque-Entstehung

Im Agar befinden sich die beiden Polysaccharide Agarose und Agaropektin. Agarose macht mit 70 % den größten Anteil des Agars aus, besteht aus  $\beta$ -D-Galactopyranose und  $\alpha$ -L-Galactopyranose und enthält einige wenige geladene Gruppen. Agaropektin hingegen ist stark sulfatiert [57] und enthält zudem D-Glucuronsäure sowie Pyruvatsäure ([40], Abbildung 36, B).



**Abbildung 36. Chemische Struktur von den Untereinheiten von Agar, Agarose (A) und Agaropektin (B).** Agar besteht aus 70 % Agarose und 30 % Agaropektin. R = einer Sulfatgruppe des Agaropektin. Quelle Abb. 37, A: [58], Quelle Abb. 37, B: [59]

Die negativ geladenen Gruppen im Agar, welche vor allem auf Agaropektin (Abbildung 36, B) zurückzuführen sind, können die Entstehung von Plaques inhibieren [60, 61]. Auch in der vorliegenden Arbeit bestätigt sich diese Aussage (4.2.1), da zu keiner Zeit Plaques erkennbar waren, sofern die Übersichtung mit Agar vorgenommen wurde. Es wird angenommen, dass bestimmte Anionen die initiale Virus-Zell-Interaktion verhindern können und somit die Plaque-Entstehen inhibieren [62]. Es besteht die Möglichkeit, diesen inhibitorischen Effekt teilweise zu kompensieren, wenn man Polykationen hinzufügt. Exemplarisch hierfür wurden DEAE-Dextran oder Protaminsulfat hinzugefügt [63]. Möglich ist, dass die hinzugefügten Polykationen die Anionen im Agar neutralisieren können, indem sie diese abpuffern. Da Protaminsulfat jedoch einen hemmenden Einfluss auf die Zell-Virus-Interaktion hat [64] und DEAE-Dextran die Expression von IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  verstärkt [65], scheint die Zugabe dieser

Polykationen keine gute Wahl zu sein. Zudem wird aufgrund der Ergebnisse die Annahme gemacht, dass der inhibitorische Effekt der Anionen im Zusammenhang mit deren Molekulargewicht steht. Sulfatierte Polysaccharide mit geringerem Molekulargewicht als ca. 20 kDa scheinen sogar die Plaque-Bildung verstärken zu können. Ein Beispiel dafür ist Heparin, welches ein Molekulargewicht von ungefähr 11 kDa hat [62]. Da als Rezeptoren für das MV VCAM-1 und Glykophorin A beschrieben wurden [5], stellt sich die Frage, ob die sulfatierten Gruppen im Agar die Rezeptoren, an welche das MV andockt, an der Zielzelle blockieren bzw. besetzen kann. VCAM-1 ist ein Sialoglykoprotein [66], welches zur Immunoglobulin-Superfamilie gehört. Sind die zellulären Rezeptoren des Virus blockiert, so kann keine Zell-Virus-Interaktion stattfinden, und es kommt nicht zur Infektion der Zellen. Dies ist eine mögliche Erklärung dafür, dass Agar die Infektion der HeLa-Zellen in der vorliegenden Arbeit verhindert hat (4.2.1) und sich keinerlei Unterschiede zwischen der „Mock“-Probe und der mit infektiösem Medium behandelten Proben nachweisen ließen. Wurden die Übersichtungen jedoch mit Agarose durchgeführt (4.2.1), so war eine Zellyse möglich und es konnte Plaques entstehen. Dies bestätigt die o.g. Hypothese, da Agarose keine Sulfatgruppe enthält und somit im Gegensatz zu Agar keine anionischen Eigenschaften aufweist.

### **5.1.3 Fragliches Plateau des Luminometers**

Bemerkenswert ist, dass das Verhältnis von 3'-UTR-Mutante zum Wildtyp sich post-Infektion im Vergleich zu post-Transfektion relativiert zu haben scheint. Es ist zwar immer noch deutlich, dass die mit MV-Wildtyp infizierten Zellen stets auffällig höhere RLU aufweisen, es aber nicht mehr so große Unterschiede zur Mutante gibt wie nach der Transfektion. Fraglich ist, ob die Wildtyp-Proben noch höhere Werte aufweisen würden und lediglich ein Plateau des Luminometers erreicht ist. Dies könnte man in weiterführenden Experimenten testen, indem man die Probe aufkonzentriert und anschließend im Luminometer misst oder die Proben sehr stark verdünnt und diese Verdünnungsreihen vermisst. Sollte auch dann der am höchsten messbare Wert ca. 8.000.000 RLU entsprechen, so ist allem Anschein nach ein Plateau erreicht. Dies würde eine genauere Quantifizierung des Unterschiedes zwischen Mutante und Wildtyp erlauben.

## 5.2 Limitationen

### 5.2.1 GARS-Bindung hat positiven Einfluss auf die Virusproduktion

Die MV-Mutante enthält eine Mutation in der 3'-UTR an der vermuteten Bindungsstelle der Glycin-tRNA-Synthetase (Abbildung 8). Diese Mutation wurde eingefügt, um zu prüfen, ob und wenn ja, inwieweit, die Bindung der GARS an die GBE der 3'-UTR des MV möglich ist und einen Einfluss auf die Replikation und/oder die Translation des Virus hat.

Wurden die HeLa-Zellen wie in 4.2.1.1 beschrieben transfiziert und nach 48 h fixiert und gefärbt, so war deutlich, dass eine Virusproduktion stattgefunden hat, da der Zellrasen bei den mit MV-RNA-transfizierten Zellen deutlich weniger besiedelt war, als jener, welcher mit der „Mock“-Probe behandelt wurde (Abbildung 16). Da es sich beim MV um ein lytisches Virus handelt, nekrotisieren die Zellen nach der Virusproduktion und die Virionen werden frei [38]. Es wurde beobachtet, dass die mit Wildtyp-RNA transfizierten Platten weniger besiedelt waren (Abbildung 18) im Vergleich zu den mit der Mutante transfizierten. Man kann also davon ausgehen, dass die Virusproduktion beim Wildtyp größer ist als bei der Mutante, oder, dass die mit MV-Wildtyp transfizierten Zellen schneller lysieren. Die Beobachtung, dass HeLa-Zellen sich mit dem MV transfizieren lassen, wurde bereits beschrieben [33]. Dort wurden HeLa-Zellen ebenfalls mit der MV-Wildtyp-RNA transfiziert, und es kam zu einer Plaque-Bildung (3.1.9). Während in der vorliegenden Arbeit nur vier Basen im SL I mutiert wurden (Abbildung 8), so wurde im o.g. Paper der komplette SL I deletiert. SL I schien für die RNA-Synthese des MV nicht unabdingbar zu sein, da trotz der Deletion Plaques nach Transfektion und Färbung der Zellen entstanden sind. Die Plaques waren allerdings kleiner und die Zahl der PFUs betrug ca. nur 25 % von denen des Wildtyps [33]. Um diese Annahme weiter zu überprüfen und auch genauer zu quantifizieren, wurden in der AG Niepmann in die RNA-Genome des Wildtyps und der Mutante HiBiT-Tags eingebaut (Abbildung 39), die mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System (3.5.2) nachgewiesen werden können. Auch die hier beschriebenen Ergebnisse (Abbildung 23) bestätigten, dass die Virusproduktion und/oder die Stabilität des Wildtyps größer ist als die der 3'-UTR-Mutante und somit die GARS-Bindung an die 3'-UTR eine wichtige Rolle in der

Vermehrung des MV zu spielen scheint. Jedoch ist die Bindung der GARS nicht unabdingbar für die Virusvermehrung, da die 3'-UTR-Mutante zwar langsamer und geringere Mengen Virus produziert, es aber trotzdem zur Produktion von Viren kommt. Deutlich ist, dass die detektierten RLU zu jedem gemessenen Zeitpunkt beim Wildtyp bedeutend höher sind als die der 3'-UTR-Mutante. Bereits nach dem ersten gemessenen Zeitpunkt (3 h post-Transfektion) manifestierte sich diese Differenz zugunsten des Wildtyps. Das Maximum wurde nach 24 h detektiert und zeigte, wie groß die Unterschiede der Virusproduktion der beiden Konstrukte sind, da hier die gemessenen Werte des Wildtyp 15 x so hoch waren wie die der Mutante.

Mittels Transfektionen konnte bereits nachgewiesen werden, dass, sofern man die HeLa-Zellen transfiziert, sie anschließend lysieren und somit vermutlich in der Lage sind, Virus zu produzieren und freizusetzen. Da aber auch überprüft werden sollte, ob sich die Zellen auch mit dem Virus infizieren lassen, also einen Rezeptor für das MV an ihrer Oberfläche besitzen, wurden anschließende Infektionsreihen durchgeführt. Dass HeLa-Zellen sich vom MV-Wildtyp infizieren lassen, wurde bereits bestätigt [33]. In der Veröffentlichung wurden zur Infektion der HeLa-Zellen zwei Plaques der transfizierten HeLa-Zellen ausgewählt und amplifiziert. 31 h post-Infektion konnte gezeigt werden, dass HeLa-Zellen sich vom MV infizieren lassen, da Plaques entstanden sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die mithilfe der Transfektion produzierten Virionen in unterschiedlichen Konzentrationen auf die Zellen gegeben (Titration). Deutlich zu erkennen war, dass HeLa-Zellen sich vom MV nicht nur transfizieren, sondern auch infizieren lassen (Abbildung 19, Abbildung 20). Es ist also anzunehmen, dass sie einen Oberflächenrezeptor besitzen, an welchen die Viren andocken können und es folglich zum Virus-Entry in die Zelle kommt. In [5] wurden VCAM-1 und Glykophorin A als Oberflächenrezeptoren des MV identifiziert. HeLa-Zellen, welche mit MV-Wildtyp-RNA infiziert wurden, bildeten zu jedem gemessenen Zeitpunkt mehr Plaques als jene, welche mit der Mutante infiziert wurden (Abbildung 21). 48 h, 72 h, sowie 96 h post-Infektion ließ sich ein statistisch signifikanter Unterschied der beiden Konstrukte nachweisen. Die Plaques der MV-Mutante waren klarer abgrenzbar und in geringerer Anzahl auf dem konfluenten Zellrasen zu erkennen. Das Ausmaß der Virus-Produktion scheint

also abhängig zu sein von der GARS-Bindung an die 3'-UTR des MV. Möglich wäre auch, dass durch die Mutation der vier Basen im SL I (Abbildung 8) die Primärsequenz des Virus so gestört wird, dass die Vermehrung dadurch beeinträchtigt wird. Des Weiteren fiel auf, dass die Plaques der mit MV-Wildtyp infizierten Zellen 24 h, 48 h und 72 h post-Infektion signifikant größere Durchmesser aufwiesen als die der 3'-UTR-Mutante (Abbildung 22). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Polymer-Überschichtung bewusst gewählt, da so sichergestellt werden konnte, dass eine Infektion nur der infizierten Zelle direkt benachbarten Zellen stattfindet, nicht aber andere Zellen durch Viren infiziert werden, die sich durch das Flüssigmedium ausgebreitet haben. Trotz dieser Maßnahme kann man die Plaques nicht sicher quantifizieren, da man u.a. inaktivierte Viren nicht erfasst. Des Weiteren ist es möglich, dass Plaques, die nahe beieinander liegen, optisch ein großes Plaque formen und es folglich nicht mehr möglich ist, diese zu voneinander abzugrenzen.

### **5.2.2 GARS-Bindung beeinflusst Translation**

Da aufgrund der Ergebnisse der Plaque Assays (4.2.1.2) sowie durch die Ergebnisse des Lumineszenz Assays (4.2.2) stark davon auszugehen ist, dass die Bindung der Glycyl-tRNA-Synthetase an die GBE der 3'-UTR des MV mittels Anticodon-Mimicry einen positiven Einfluss auf die Produktion von viralen Partikeln hat, stellte sich nun die Frage, welchen Schritt in der Virus-Produktion die GARS-Bindung fördert und ab wann sich erstmals ein Unterschied zwischen den beiden Konstrukten manifestiert. Eine Möglichkeit, um zu überprüfen, ob die Replikation oder die Translation beeinflusst wird, ist es, gezielt eine Mutation in das Virus einzuführen, welche die Replikation unmöglich macht. So kann man isoliert die virale Translation betrachten. D. Nachev klonierte in der AG Niepmann das MV-Wildtyp-Genom sowie das MV-3'-UTR-Mutant-Genom so, dass die 3D Polymerase funktionsunfähig war. Es ist also lediglich eine Translation der RNA möglich, jedoch keine Replikation, um neue virale RNA zu synthetisieren, welche wiederum translatiert werden würde. Wird die virale RNA in die Zelle transfiziert, so wird diese RNA in das Polyprotein translatiert. Das Polyprotein enthält folglich auch das proteingekoppelte HiBiT-Tag und kann mittels Nano-Glo® HiBiT Lytic Detection System detektiert werden. Die nun mithilfe des Luminometers

gemessenen relativen Lichtintensitäten sind also äquivalent zur entstandenen Proteinmenge und spiegeln somit quantitativ die Translation des Virus wider.

Aus den obigen Ergebnissen wurde deutlich ist, dass beide replikationsunfähigen Konstrukte nach der Transfektion translatierten. Dies kann man daran erkennen, dass mit diesen replikationsunfähigen viralen Genomen 3 h post-Transfektion stets höhere RLU-Werte gemessen werden als bei der „Mock“-Probe. Dies spiegelt also die virale Translation der transfizierten RNA in Polyproteine wider (Abbildung 24, Abbildung 26). Der Hintergrund, also die RLU-Werte, die bei den „Mock“-Proben detektiert wurden, lässt sich zum einen durch die geringe Autolumineszenz des Furimazine Substrats und der Zellen sowie durch maschinellen Hintergrund des Luminometers erklären. Da die Konstrukte replikationsunfähig sind, konnte sichergestellt werden, dass die entstanden viralen Proteine, welche mittels Luminometer detektiert wurden, nur auf die Translation, nicht aber auf die Replikation zurückzuführen sind.

Es fällt auf, dass die 3'-UTR-Mutante, die eine intakte Polymerase-Funktion enthält, sich erst nach ca. 3,6 h post-Transfektion von dem replikationsunfähigen Konstrukt zu unterscheiden scheint (Abbildung 24). Diese Differenz könnte Ausdruck der beginnenden viralen Replikation sein, welche mittels Regressionsgerade ermittelt wurde (Abbildung 25). Während die replikationsfähige 3'-UTR-Mutante 5 h post-Transfektion einen Anstieg verzeichnet und sich so vom Level abhebt, auf welchem die replikationsfähige und -unfähige 3'-UTR-Mutante nach 3 h und 4 h post-Transfektion waren, so manifestiert sich auch 5 h nach der Transfektion ein tendenzieller Abfall der detektierten RLU der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante. Dieser progrediente Abfall lässt sich durch die Degradation der durch Translation der transfizierten RNA entstandenen Proteine sowie der eingebrachten RNA erklären. Betrachtet man auch die späteren Zeitpunkte, so wird deutlich, dass eine weitere Degradation der Proteine stattfindet, sodass die replikationsunfähige 3'-UTR-Mutante nach 12 h post-Transfektion sogar unter die Werte der „Mock“-Probe abfällt. Als mögliche Erklärung dafür wäre denkbar, dass in den Zellen, die mit der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante transfiziert wurden, nachweislich virale Translation stattgefunden hatte und die entstandenen viralen Proteine zur Lyse einiger Zellen geführt haben. Da bei der „Mock“-Probe keine Zellen durch

virale Partikel lysiert werden, blieben mehr Zellen übrig, welche auf Grund der Autolumineszenz höhere Werte verzeichneten als die Zellen der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante. Auch der Anstieg der replikationsfähigen 3'-UTR-Mutante, welcher sich nach 5 h post-Transfektion manifestierte, ist zu den späteren Zeitpunkten messbar, er wird sogar noch steiler.

Bei den Wildtyp-Konstrukten ist jedoch das Level der RLU-Werte des replikationsfähigen und -unfähigen Konstrukts nur 3 h post-Transfektion ähnlich. Bereits nach 4 h manifestiert sich eine nennenswerte Differenz zwischen den beiden Konstrukten. Zwischen 3 h und 4 h post-Transfektion verdreifacht sich die Menge an gemessenen RLU des replikationsfähigen Wildtyps, während der replikationsunfähige Wildtyp bereits einen leichten Abfall verzeichnet. Die Replikation des Wildtyps scheint also bereits nach 2,78 h post-Transfektion begonnen zu haben, was mithilfe einer Regressionsgeraden ermittelt wurde (Abbildung 27). Daraus kann man schließen, dass die GARS-Bindung an die 3'-UTR des MV auch einen Einfluss auf den Zeitpunkt des Beginns der viralen Replikation zu haben scheint. Denkbar ist, dass die GARS-Bindung wichtig für den Start der Replikation ist, welche bei Bindung der GARS ca. eine dreiviertel Stunde früher beginnt. Zum Start der Replikation muss das VPg von der 3D Pol uridylyliert werden und kann dann als VPg-pUpU als Primer dienen [36]. Wahrscheinlich ist, dass die uridylylierte Form anschließend an das 3'-Ende des MV andockt [2, 36]. Somit könnte eine Bindung der GARS an der 3'-UTR einen positiven Effekt darauf haben, dass der Vorgang des Andockens des VPg-pUpU beschleunigt wird oder es zu einer effizienteren Bindung kommt und somit die Replikation früher und/oder schneller beginnen kann. Wie zu erwarten, steigen die detektierten RLU des Wildtyps mit der Zeit weiter an, was sich mit Replikationen und anschließenden Translationen erklären lässt. Ebenfalls fällt auf, dass zwischen 24 h und 48 h post-Transfektion kein weiterer Anstieg, sondern ein Abfall der gemessenen RLU stattfindet. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nach 24 h bereits eine so große Virusproduktion stattgefunden hat, dass bereits sehr viele Zellen lysiert sind, welche mit dem Luminometer nicht mehr erfasst werden können. Diese Annahme lässt sich mit den Plaque Assays stützen (Abbildung 16), denn auch hier wurde deutlich, dass im Vergleich zur 3'-UTR-Mutante beim Wildtyp 48 h post-Transfektion weitaus mehr Zellen lysiert

waren. Aufgrund der Unfähigkeit des Wildtyp-Konstruktes mit Polymerase-Defizienz zu replizieren, kommt es zu keiner weiteren Proteinsynthese und die Werte fallen weiter ab.

Bereits nach 3 h waren die Werte des replikationsunfähigen Wildtyps mehr als doppelt so hoch, als die der replikationsunfähigen 3'-UTR-Mutante. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Bindung der Glycyl-tRNA-Synthetase zusätzlich einen positiven Einfluss auf die Translation zu haben scheint. Die Bedeutung der GARS-Bindung an die 3'-UTR des MV scheint so essentiell für die virale Translation zu sein, dass die gemessenen RLU sich halbieren, wenn keine GARS-Bindung stattfinden konnte. Denkbar wäre, dass durch eine Bindung der GARS, ebenso wie beim Poliovirus [27], die Bildung des Initiationskomplexes gefördert wird und es somit zu einer schnelleren und effizienteren Translation kommt. Eine Möglichkeit, um den Einfluss der GARS-Bindung an das GARS-bindende Element des MV genauer zu definieren, wäre es, die Anzahl der Plusstränge nach der Transfektion zu messen. Sollten zu frühen Zeitpunkten post-Transfektion mittels qPCR bei Wildtyp und 3'-UTR-Mutante die gleiche Anzahl an Plussträngen gemessen werden, so ist davon auszugehen, dass die Translation des Wildtyps durch die GARS-Bindung gefördert wird und die Stabilität nicht beeinflusst wird. In weiterführenden Untersuchungen konnten weiterhin genauer die Auswirkungen von GARS-Mutationen auf den Replikationszyklus des MV beschrieben werden. Es kam durch die GARS-Bindung zu einer schnelleren und effizienteren Rekrutierung von Translationselongationsfaktoren und Ribosomen. Eine Mutation in dem GARS-bindenden Element führte zu einer Reduktion dieser Rekrutierungsmechanismen [56]. Diese Ergebnisse passen mit der Feststellung, dass GARS eine moderate Interaktion mit der delta Untereinheit von eIF1 eingeht [67] und so die Translation positiv beeinflusst, zusammen. Beim Poliovirus wurde beobachtet, dass die GARS an die IRES der 5'-UTR bindet, so die Bildung des 48S-Initiationskomplexes fördert [27] und folglich die Translation positiv beeinflusst. Möglich ist auch, dass die Bindung der GARS an die 3'-UTR des MV die intrazelluläre Stabilität des Virus erhöht. Denkbar wäre dies, da sich die GARS-Bindungsstelle nicht wie beim Poliovirus in der 5'-UTR befindet, welche die IRES (und somit die Translationsmaschinerie) des Virus beinhaltet, sondern in der 3'-

UTR. Die 3'-UTR befindet sich kurz vor dem Poly-A-Schwanz [33], welcher die zytosolische Degradation verhindert bzw. verlangsamt und so das virale Genom schützt. Möglich ist, dass die Bindung der GARS diesen Abbau noch weiter inhibiert und der RNA somit zusätzliche Stabilität verleiht. Auch würde diese Vermutung erklären, warum die Zellen, die mit den beiden Wildtyp-Konstrukten transfiziert wurden, schon 3 h post-Transfektion höhere RLU-Werte aufweisen als die 3'-UTR-Mutant-Konstrukte. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden in weiterführenden Untersuchungen RNA-Stabilitäts-Assays durchgeführt und die MV-RNA 2 h nach Elektroporation in HeLa-Zellen gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der RNA-Menge der Wildtyp-MV-RNA und der MV-RNA, welche eine Mutation im GARS-bindenden Element enthielt [56] und so scheint es unwahrscheinlich, dass die GARS-Bindung zur Stabilitätserhöhung der RNA führt.

### **5.2.3 Neuroblasten der Maus zeigen größere Virusproduktion als menschliche Neuroblasten**

Da das MV in Primaten zu Lähmungserscheinungen führt [4], wird vermutet, dass das Virus vor allem neuropathogen ist. Besonders Nagetiere scheinen anfällig für eine Infektion mit dem MV zu sein (1.1), weswegen einerseits Neuroblasten (Vorläufer von vollständig differenzierten Nervenzellen) aus dem Menschen (SK-N-AS-Zelllinie), sowie Neuroblasten aus der Maus (Neuro-2A-Zelllinie) verwendet wurden, um diese Annahme zu überprüfen. Neuro-2A-Zellen lassen sich vom MV transfizieren und auch infizieren [55] und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit stellvertretend für Neuroblasten der Maus gewählt. Nach Infektion der Neuro-2A-Zellen mit MV wiesen diese etwas höhere PFU-Werte auf als die nach der Infektion von HeLa-Zellen. Das Verhalten post-Transfektion wurden bei beiden Zelllinien mittels Lumineszenz-Nachweis (Abbildung 33) analysiert. Zusätzlich wurde mit der SK-N-AS-Zelllinie ein Plaque Assay Test durchgeführt (Abbildung 28, Abbildung 29). Des Weiteren wurden die SK-N-AS- und Neuro-2A-Zellen post-Infektion beobachtet (Abbildung 35). Diese Versuche sollten Aufschluss darüber geben, ob die Zelllinien einen Oberflächenrezeptor für das MV besitzen und ein Virus-Entry mit anschließender Replikation möglich ist. Um Unterschiede zwischen den neuronalen Zellen untereinander, sowie den neuronalen Zellen zu den HeLa-Zellen darzustellen, wurde die Virusproduktion

post-Transfektion sowie post-Infektion mittels Lumineszenz-Detektion quantifiziert.

Betrachtet man die Ergebnisse des Lumineszenz-Nachweises post-Transfektion der neuronalen Zelllinien (Abbildung 33), so wird deutlich, dass sich alle Zelllinien mittels Lipofektion transfizieren lassen und sich anschließend virale Proteine im Zellinneren befinden. Jeder der Zelllinien ist es folglich vermutlich möglich, das MV zu produzieren. Für Neuro-2A-Zellen, sowie einen Verwandten der SK-N-AS-Zellen (die SK-N-BE-Zellen) wurde dies bereits in der Vergangenheit bestätigt [55]. Weiterhin fällt auf, dass die Neuro-2A-Zellen weitaus größere Mengen an Virus beinhalten als die SK-N-AS- und die HeLa-Zellen. Vergleicht man die Virusproduktion post-Transfektion mit MV-3'-UTR-Mutante, so erhält man ein Verhältnis von Neuro-2A : HeLa : SK-N-AS = 62:3,4:1. Schaut man sich die Zellen an, welche mit der MV-Wildtyp-RNA transfiziert wurden, so ergibt sich ein Verhältnis von 16:6:1, wobei die gemessenen RLU des Wildtyps stets um Vielfaches höher sind als die der Mutante. Auch in den Neuroblasten scheint es also eine Rolle für die Virusproduktion zu spielen, ob eine Bindungsstelle für die GARS in der 3'-UTR des Virus vorhanden ist oder nicht (5.2.2). Da Neuro-2A-Zellen aus der Maus stammen und SK-N-AS-Zellen menschlichen Ursprungs sind, stützt dieses Ergebnis auch die Annahme, dass Nagetiere anfälliger für das MV sind, da sie allem Anschein nach größeren Mengen an viralen Partikeln zu produzieren scheinen. Da Neuro-2A-Zellen zu keinem Zeitpunkt konfluent am Boden des Wells wuchsen, wurden keine Plaque Assay Test mit dieser Zelllinie durchgeführt. Mit den menschlichen Neuroblasten hingegen wurden post-Transfektion Plaque Assays gemacht (4.4.1). Die SK-N-AS-Zellen waren nach Entfernen des Polymers nicht durchgehend adhärent, sondern lösten sich bei der „Mock“-Probe, dem Wildtyp und der Mutante unspezifisch vom Boden der Platte ab (Abbildung 29). Möglicherweise sind SK-N-AS-Zellen nicht so stark adhärent wie HeLa-Zellen und bleiben deswegen teilweise nach Entfernen des Polymers an der Gelschicht kleben und lösen sich vom Boden des Wells ab. Dennoch waren stets einige Felder von adhären Zellen bedeckt, welche auch 72 h post-Infektion noch konfluent waren. Es gab kein augenscheinliches Anzeichen dafür, dass die SK-N-AS-Zellen von Virus befallen wurden in Form von Zelllyse oder Plaquebildung. Diese Beobachtungen stehen also in Widerspruch mit den

Ergebnissen des Lumineszenz Assays, die belegen, dass eine Virusproduktion in den SK-N-AS-Zellen stattgefunden hat. Fraglich ist nun, ob die Zellen eine Virusproduktion aufweisen, die im Verlauf des Lumineszenz Assays nachgewiesen wurde, jedoch nach der Produktion nicht nekrotisieren, um die viralen Partikel freizusetzen. Folglich wären nach einem Plaque Assay Test auch keine Plaques erkennbar.

Um diese Frage zu beantworten, wurde der Überstand der transfizierten SK-N-AS-Zellen abpipettiert und auf frische HeLa-Zellen gegeben (Abbildung 34), gleiches wurde auch mit Überstand von Neuro-2A-Zellen durchgeführt. Da bereits aus vorherigen Ergebnissen (4.2.1.2) bekannt war, dass HeLa-Zellen sich vom MV infizieren lassen, konnte man davon ausgehen, dass nach Inkubation der HeLa-Zellen mit dem Überstand der transfizierten Neuroblasten Virus in den HeLa-Zellen nachweisbar sein sollte, sofern ein Virus-Release post-Transfektion stattgefunden haben sollte. Wider Erwarten wurde 24 h post-Infektion mittels Lumineszenz Assay bestätigt, dass die HeLa-Zellen vom Überstand der Neuro-2A-, sowie dem der SK-N-AS-Zellen infiziert werden konnten. Es musste also nach Transfektion der beiden neuronalen Zelllinien eine Freisetzung des Virus in das Medium (Überstand) erfolgt sein. Da die Plaque Assay Tests, welche mit SK-N-AS-Zellen durchgeführt wurden, zum einen mit (Abbildung 29) und zum anderen ohne (Abbildung 28) Polymer-Überschichtung durchgeführt wurden, konnte ausgeschlossen werden, dass die mangelnde Plaquebildung/Lysezeichen auf eine unerwartete Interaktion von SK-N-AS-Zelle mit Inhaltsstoffen des Overlays zurückzuführen ist. Denkbar wäre, dass die SK-N-AS-Zellen zwar virale Partikel freisetzen, selbst jedoch dabei nicht zugrunde gehen und es somit nicht zu einer Plaque-Bildung kommt. Dieser Mechanismus ist als *Knospung* (engl. *budding*) bei der Freisetzung von behüllten Viren aus der Wirtszelle bekannt. Im Rahmen dieser Freisetzung werden die Viren in eine zelluläre Membran verpackt und anschließend ausgeschleust [68]. Man müsste also die Plaque Assay Tests noch einige Male wiederholen und überlegen, ob man den Überstand der transfizierten HeLa-Zellen höher konzentrieren sollte, beispielsweise mittels Zentrifuge, und anschließend erneut Infektionsreihen durchführt.

Weiterhin fällt auf, dass der Überstand der Neuro-2A-Zellen mehr virale Partikel enthalten zu scheit, als der der SK-N-AS-Zellen, da in Abbildung 34 deutlich wird, dass die HeLa-Zellen post-Infektion mehr Virus produzieren, wenn sie vom Überstand der Neuro-2A-Zellen infiziert wurden. Bei Infektion der HeLa-Zellen mit dem Überstand der mit MV-Wildtyp transfizierten Neuro-2A-Zellen ergaben sich ca. 24-fach höhere Werte, als wenn die Zellen mit dem Überstand der SK-N-AS-Zelllinie infiziert wurden. Möglich wäre aber auch, dass Neuro-2A-Zellen schlichtweg einen schnelleren Metabolismus besitzen, unabhängig davon, ob sie vom MV transfiziert/infiziert sind oder nicht. Um diese Hypothese zu widerlegen, müsste man die Translation der Haushalts-Proteine der verschiedenen Zelllinien quantifizieren und anschließend miteinander vergleichen.

Um zu analysieren, ob auch die Neuroblasten sich nicht nur vom MV transfizieren, sondern auch infizieren lassen, wurden mit beiden neuronalen Zelllinien Lumineszenz Assays post-Infektion durchgeführt (Abbildung 35). Da bereits in 4.2.1 deutlich wurde, dass das Medium von transfizierten HeLa-Zellen infektiös ist, wurde der Überstand dieser für eine Infektion verwendet. Auch hier wurde deutlich, dass sich die Neuroblasten vom MV infizieren lassen, folglich ein Virus-Entry stattfinden kann. Wieder wurde deutlich, dass die Virusproduktion in Neuro-2A-Zellen post-Infektion bedeutend höher war als jene in SK-N-AS-Zellen. Das Verhältnis von Neuro-2A- zu SK-N-AS-Zellen der mit MV-Wildtyp infizierten Zellen betrug 8:1, das der mit 3'-UTR-Mutant infizierten Zellen 14:1. Die Infektion von Neuroblasten mit dem MV ist also möglich, und beide Zelllinien scheinen einen passenden Oberflächenrezeptor zu besitzen. Für SK-N-AS-Zellen wird lediglich ein Rezeptor für Vimentin angegeben [69]. Des Weiteren produzieren sie den IGF-II [70]. Weiterhin sind obige Ergebnisse damit konsistent, dass das MV permissiver für Nagetiere (hier am Beispiel von Zellen aus der Maus: Neuro-2A-Zelllinie) ist als für Menschen. Außerdem wird auch bei Infektion der Neuroblasten deutlich, dass die GARS-Bindung an die 3'-UTR des Virus eine Bedeutung für die Virusproduktion zu haben scheint. Die Virusproduktion ist stets höher, sofern die Infektion mit dem MV-Wildtyp erfolgt ist. Allerdings scheint es auch in Abbildung 35 so, dass sich das Verhältnis der beiden Konstrukte zueinander relativiert, hat im Vergleich zu den Ergebnissen post-Transfektion. Diese Beobachtung wurde bereits im vorherigen Absatz in

Bezug auf Abbildung 34 thematisiert. Auch bei der Infektion der Neuroblasten aus der Maus fiel ein Widerspruch zu den Ergebnissen des Plaque Assay Tests auf. Ähnlich wie post-Transfektion ließen sich keine Lysezeichen, sowie keine Plaquebildung erkennen. Dabei schien es keine Rolle zu spielen, ob die SK-N-AS-Zellen vom Überstand der HeLa- oder der SK-N-AS-Zellen infiziert wurden (Abbildung 31).

### 5.3 Ausblick

Abschließend lässt sich sagen, dass die Bindung der GARS an die 3'-UTR des MV einen positiven Einfluss auf die Virus-Vermehrung hat. Dennoch muss dieser Einfluss weiter definiert und charakterisiert werden, da die Frage offenbleibt, wie viele GARS-bindende Elemente (GBE) in der 3'-UTR des Mengovirus vorhanden sind und welche Funktion diese haben. Diese Annahme ist nicht abwegig, da für das eng verwandte Poliovirus bereits zwei GARS-bindende Elemente beschrieben wurden [51] und es durch bioinformatische Untersuchungen Hinweise darauf gibt, dass auch im MV weitere GBEs vorhanden sind [56].

Die durchgeführte Arbeit gibt Hinweise darauf, dass durch Mutationen in dem GARS-bindenden Element der virale Replikationszyklus weniger effizient ablaufen kann. Diese Erkenntnis bietet womöglich neue Ansätze für eine therapeutische Weiterentwicklung bei einer Infektion mit dem Mengovirus. Zusammenhänge, welche zum Gesamtverständnis der viralen Vermehrung beitragen, können den Einblick für die von Picornaviren ausgelösten Erkrankungen erweitern und zu neuen Therapieansätzen führen. Eventuell ließe sich dies sogar für weitere Picornaviren generalisieren. Dies wäre von Relevanz, da Picornaviren eine Vielzahl an Erkrankungen beim Menschen verursachen können. So kann eine Infektion mit dem Poliovirus zur Poliomyelitis führen [71], Hepatitis A Virus beispielsweise zu einer Vergrößerung und Entzündung der Leber [72], Rhinoviren zu Erkältungssymptomen [73], das Coxsackie B Virus zu einer Myokarditis [74], etc. Interessant ist, dass das GBE in allen Enteroviren (Poliovirus, Coxsackieviren, Echoviren, Hepatitis-A-Viren) vorhanden ist [51] und somit liegt es nahe, dass auch hier eine GARS-Bindung die Virusvermehrung positiv beeinflussen könnte.

Zudem wird in dieser Arbeit deutlich, dass die Virusvermehrung in epithelialen und neuronalen Zellen unterschiedlich ist. Die Transfektion und Infektion mit MV in menschlichen Neuronen (hier exemplarisch SK-N-AS-Zellen) führte zu einer geringeren Virusproduktion im Vergleich zu neuronalen Zellen der Maus (hier Neuro-2A-Zellen). Diese Beobachtung ist eine mögliche Begründung dafür, warum das MV pathogener für Nagetiere als für Menschen ist. In diesem Zusammenhang interessant ist die klinische Beobachtung, dass es im Rahmen einer Infektion mit dem MV zu Lähmungserscheinungen kommt [4], möglicherweise ausgelöst durch eine Funktionsstörung der Motoneurone. Durch einen Vergleich der bereits verwendeten Zelllinien mit Motoneuron-Zelllinien könnte überprüft werden, ob die Virusproduktion in Motoneuron-Zelllinien noch höher ist als in den bisher getesteten Zelllinien.

## 6 Zusammenfassung

Das Mengovirus (MV) gehört zur Familie der *Picornaviridae* und zur Gattung der *Cardioviren*. Das RNA-Genom umfasst 7,8 kb, ist positiv-orientiert und einzelsträngig. Das Leseraster für das Polyprotein wird flankiert von den 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTRs). In der 5'-UTR liegt eine interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES), mit deren Hilfe das Virus-Genom cap-unabhängig im Wirtszytosol in ein Polyprotein translatiert werden kann. Die 3'-UTR enthält drei Stemloops (SLs), wobei in SL I ein konserviertes Signal liegt, das bereits beim Poliovirus gefunden wurde und dort Einfluss auf den viralen Replikationszyklus hat.

Das Poliovirus, das ebenfalls zur Familie der *Picornaviridae* zählt, besitzt dieses konservierte Signal in der 5'-UTR. Die Glycyl-tRNA-Synthetase (GARS), die normalerweise in der Proteinbiosynthese die Bindung der Aminosäure Glycin an die zugehörige transfer-Ribonukleinsäure (tRNA) katalysiert, kann an dieser Stelle spezifisch an die Poliovirus-RNA binden und scheint so deren Translation zu fördern im Sinne einer nicht-enzymatischen Funktion.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgrund dieser Beobachtung die GARS als möglicher Interaktionspartner des MV analysiert. Hierfür wurde an der Stelle des konservierten GARS-Signals im MV eine Mutation eingefügt, sodass eine mögliche Bindung der GARS verhindert werden würde. Dabei zeigte sich, dass die GARS-Bindung an die 3'-UTR des MV einen positiven Einfluss auf die Virusproduktion hat. Es konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht eindeutig geklärt werden, ob diese Beobachtung auf die Replikation, die Translation oder die Stabilität der RNA zurückzuführen ist.

Weiterhin wurde die Virusproduktion in verschiedenen Zelllinien (HeLa-Zellen, humane neuronale Zellen (SK-N-AS), sowie Neuroblasten aus der Hausmaus (Neuro-2A)) untersucht, da das MV vor allem neuropathogen für Nagetiere zu sein scheint. Hier wurde deutlich, dass das MV stärker in neuronalen Zellen der Maus repliziert als in humanen Zellen.

## 7 Summary

The mengovirus (MV) belongs to the family of *picornaviridae* which is classified in the genus of *cardiovirus*. The RNA genome has a size of 7.8 kb, is positive-orientated and single-stranded. The viral polyprotein open reading frame is flanked by the 5'- and 3'-untranslated regions (UTRs). The 5'-UTR contains an internal ribosome entry site (IRES) which controls the cap-independent translation of the viral polyprotein in the host's cytoplasm. The 3'-UTR contains three stem loops (SLs). A conserved signal like in SL I was already found in the poliovirus in which it influences the viral replication cycle like a non-enzymatic function.

In poliovirus, which also belongs to the family of *picornaviridae*, this conserved signal is located in its 5'-UTR. The glycyl-tRNA-synthetase (GARS) which normally catalyzes the binding of the amino acid glycine to the accompanying transfer-ribonucleicacid (tRNA), is able to bind specifically to the poliovirus RNA and stimulates its translation.

In this work, the possible interaction partners of the MV were analyzed with reference to the previous study on poliovirus. Based on this, a mutation was inserted at the spot of the conserved GARS signal in the MV, which prohibits a possible binding of the GARS. It was shown that the GARS binding to the 3'-UTR of the MV had a positive influence on virus production. Nonetheless, it remains unclear if this observation is attributable to replication, translation or stability of the RNA.

Furthermore, the virus production was compared in different cell lines since the MV seems especially neuropathogenic for rodents. Therefore, in the present work HeLa cells, human neuronal cells (SK-N-AS), and neuroblasts from mice (Neuro-2A) were used. It was shown that the MV replicates more efficiently in neuronal cells from mice rather than in human cells.

## 8 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Erläuterung</b>
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Adenin
A	Ampere
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
BSA	Fötale Rinderserum (engl. bovine serum albumine)
CMT2D	Charcot-Marie-Tooth Disease Typ II
CTP	Cytidintriphosphat
DEAE-	Diethylaminoethyl-
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eIF	Eukaryotischer Initiationsfaktor
EMCV	Enzephalomyokarditis Virus (engl. Encephalomyocarditis virus)

engl.	Englisch
et al.	und andere (lat. et altera)
FBS	fötales Rinderserum (engl. fetal bovine serum)
FMDV	Maul-und-Klauen-Seuche-Virus (engl. Foot-and-mouth-disease virus)
G	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GARS	Glycyl-tRNA-Synthetase
GBE	GARS-bindendes Element
GTP	Guanosintriphosphat
H	Stunde (lat. hora)
HiBiT	High Binary Technology
IFN	Interferon
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (engl. Insulin-like-growth-factor)
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle (engl. Internal ribosome entry side)
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
Lat	Lateinisch
LB	Lennox Broth
L	Leader
LgBiT	Large Binary Technology
Luc	Luciferase
M	Meter
M	Milli
M	Molar
Mut	Mutant, hier: 3'-UTR-Mutation an der GARS-Bindungsstelle
Min	Minute

mRNA	Boten-RNA (engl. messenger RNA)
MV	Mengovirus
N	Nano
NanoBiT®	NanoLuc® Binary Technology
Nt	Nukleotide
NTP	Nukleotidtriphosphat
P	Pico
p(U/C)	Poly Uracil/Cytosin Trakt
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. polymerase chain reaction)
PFU	Plaque Forming Unit
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PPPC	Proteinprobenpuffer
qPCR	Quantitative Polymerase Ketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
Rev	rückwärts (engl. reverse)
RLU	Relative Lichteinheiten (engl. Relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
Rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SL	Stamm-Schleifen-Struktur (engl. stemloop)

Ss	Einzelstrang (engl. single strand)
TAE	Tris-Acetat EDTA
TBE	Tris-Borat-Essigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMEV	Theiler's murine encephalomyelitis virus
TF	Transkriptionsfaktor
tRNA	transfer-RNA
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
UTR	nicht-translatierte Region (engl. untranslated Region)
V	Volt
VCAM	Vaskuläres Zelladhäsionsmolekül (engl. Vascular cellular adhesion molecule)
VP	Virusprotein
VPg	Engl. Viral protein genome-linked
Wt	Wildtyp, hier: Mengovirus-Wildtyp

## 9 Literaturverzeichnis

1. Pathak HB, Oh HS, Goodfellow IG, Arnold JJ, Cameron CE. Picornavirus genome replication: roles of precursor proteins and rate-limiting steps in oril-dependent VPg uridylylation. *J Biol Chem.* 2008 Nov 7;283(45):30677-88. doi: 10.1074/jbc.M806101200. Epub 2008 Sep 8. PMID: 18779320; PMCID: PMC2576561.
2. Carocci M, Bakkali-Kassimi L. The encephalomyocarditis virus. *Virulence.* 2012; 3: 351–367. doi: 10.4161/viru.20573.
3. Palmenberg AC. Proteolytic processing of picornaviral polyprotein. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44: 603–623. doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003131.
4. DICK GWA, BEST AM. Mengo encephalomyelitis; a hitherto unknown virus affecting man. *Lancet.* 1948; 2: 286–289.
5. Darai G, Handermann M, Sonntag H-G, Tidona CA, Zöller L. *Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Erreger, Symptome, Diagnose, Therapie und Prophylaxe; mit 43 Tabellen.* 3rd ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009.
6. Veckenstedt A. Pathogenicity of mengo virus to mice. I. *Virological studies.* *Acta Virol.* 1974; 18: 501–507.
7. Palmenberg AC, Osorio JE. Cardioviral poly(C) tracts and viral pathogenesis. *Arch Virol Suppl.* 1994; 9: 67–77.
8. Rothberg PG, Harris TJ, Nomoto A, Wimmer E. O4-(5'-uridylyl)tyrosine is the bond between the genome-linked protein and the RNA of poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75: 4868–4872.
9. Ambros V, Baltimore D. Protein is linked to the 5' end of poliovirus RNA by a phosphodiester linkage to tyrosine. *J Biol Chem.* 1978; 253: 5263–5266.
10. Ambros V, Pettersson RF, Baltimore D. An enzymatic activity in uninfected cells that cleaves the linkage between poliovirion RNA and the 5' terminal protein. *Cell.* 1978; 15: 1439–1446.
11. Jiang P, Liu Y, Ma HC, Paul AV, Wimmer E. Picornavirus morphogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2014 Sep;78(3):418-37. doi: 10.1128/MMBR.00012-14. PMID: 25184560; PMCID: PMC4187686.
12. Agol VI, Gmyl AP. Viral security proteins: counteracting host defences. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 867–878. doi: 10.1038/nrmicro2452.
13. Romanova LI, Lidsky PV, Kolesnikova MS, Fominykh KV, Gmyl AP, Sheval EV, et al. Antiapoptotic activity of the cardiovirus leader protein, a viral "security" protein. *J Virol.* 2009; 83: 7273–7284. doi: 10.1128/JVI.00467-09.
14. Porter FW, Bochkov YA, Albee AJ, Wiese C, Palmenberg AC. A picornavirus protein interacts with Ran-GTPase and disrupts nucleocytoplasmic transport. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103: 12417–12422. doi: 10.1073/pnas.0605375103.

15. Hato SV, Sorgeloos F, Ricour C, Zoll J, Melchers WJG, Michiels T, et al. Differential IFN- $\alpha$ / $\beta$  production suppressing capacities of the leader proteins of mengovirus and foot-and-mouth disease virus. *Cell Microbiol.* 2010; 12: 310–317. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01395.x.
16. Zoll J, Melchers WJG, Galama JMD, van Kuppeveld FJM. The mengovirus leader protein suppresses  $\alpha$ / $\beta$  interferon production by inhibition of the iron/ferritin-mediated activation of NF- $\kappa$ B. *J Virol.* 2002; 76: 9664–9672.
17. Groppo R, Brown BA, Palmenberg AC. Mutational analysis of the EMCV 2A protein identifies a nuclear localization signal and an eIF4E binding site. *Virology.* 2011; 410: 257–267. doi: 10.1016/j.virol.2010.11.002.
18. Svitkin YV, Hahn H, Gingras AC, Palmenberg AC, Sonenberg N. Rapamycin and wortmannin enhance replication of a defective encephalomyocarditis virus. *J Virol.* 1998; 72: 5811–5819.
19. Medvedkina OA, Scarlet IV, Kalinina NO, Agol VI. Virus-specific proteins associated with ribosomes of Krebs-II cells infected with encephalomyocarditis virus. *FEBS Lett.* 1974; 39: 4–8.
20. Aminev AG, Amineva SP, Palmenberg AC. Encephalomyocarditis virus (EMCV) proteins 2A and 3BCD localize to nuclei and inhibit cellular mRNA transcription but not rRNA transcription. *Virus Res.* 2003; 95: 59–73.
21. Pincus SE, Diamond DC, Emini EA, Wimmer E. Guanidine-selected mutants of poliovirus: mapping of point mutations to polypeptide 2C. *J Virol.* 1986; 57: 638–646.
22. Morrow CD, Navab M, Peterson C, Hocko J, Dasgupta A. Antibody to poliovirus genome-linked protein (VPg) precipitates in vitro synthesized RNA attached to VPg-precursor polypeptide(s). *Virus Res.* 1984; 1: 89–100.
23. Gorbalenya AE, Svitkin YV, Kazachkov YA, Agol VI. Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 is involved in the processing of the viral precursor polypeptides. *FEBS Lett.* 1979; 108: 1–5.
24. Svitkin YV, Gorbalenya AE, Kazachkov YA, Agol VI. Encephalomyocarditis virus-specific polypeptide p22 possessing a proteolytic activity: preliminary mapping on the viral genome. *FEBS Lett.* 1979; 108: 6–9.
25. Lundquist RE, Ehrenfeld E, Maizel JV. Isolation of a viral polypeptide associated with poliovirus RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1974; 71: 4773–4777.
26. Flanagan JB, Baltimore D. Poliovirus-specific primer-dependent RNA polymerase able to copy poly(A). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977; 74: 3677–3680.

27. Andreev DE, Hirnet J, Terenin IM, Dmitriev SE, Niepmann M, Shatsky IN. Glycyl-tRNA synthetase specifically binds to the poliovirus IRES to activate translation initiation. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: 5602–5614. doi: 10.1093/nar/gks182.
28. Modrow S. *Molekulare Virologie*. 3rd ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2010.
29. Gingras AC, Svitkin Y, Belsham GJ, Pause A, Sonenberg N. Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93: 5578–5583. doi: 10.1073/pnas.93.11.5578.
30. Groppo R, Palmenberg AC. Cardiovirus 2A protein associates with 40S but not 80S ribosome subunits during infection. *J Virol.* 2007; 81: 13067–13074. doi: 10.1128/JVI.00185-07.
31. Duke GM, Osorio JE, Palmenberg AC. Attenuation of Mengo virus through genetic engineering of the 5' noncoding poly(C) tract. *Nature.* 1990; 343: 474–476. doi: 10.1038/343474a0.
32. Martin LR, Neal ZC, McBride MS, Palmenberg AC. Mengovirus and encephalomyocarditis virus poly(C) tract lengths can affect virus growth in murine cell culture. *J Virol.* 2000; 74: 3074–3081.
33. Duque H, Palmenberg AC. Phenotypic characterization of three phylogenetically conserved stem-loop motifs in the mengovirus 3' untranslated region. *J Virol.* 2001; 75: 3111–3120. doi: 10.1128/JVI.75.7.3111-3120.2001.
34. Liu D, editor. *Molecular detection of animal viral pathogens*. Boca Raton, FL: CRC Press, Taylor & Francis Group; 20.
35. Cho MW, Teterina N, Egger D, Bienz K, Ehrenfeld E. Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells. *Virology.* 1994; 202: 129–145. doi: 10.1006/viro.1994.1329.
36. MONTAGNIER L, SANDERS FK. REPLICATIVE FORM OF ENCEPHALOMYOCARDITIS VIRUS RIBONUCLEIC ACID. *Nature.* 1963; 199: 664–667.
37. Murray KE, Barton DJ. Poliovirus CRE-dependent VPg uridylylation is required for positive-strand RNA synthesis but not for negative-strand RNA synthesis. *J Virol.* 2003; 77: 4739–4750.
38. Mikitas OV, Ivin YY, Golyshev SA, Povarova NV, Galkina SI, Pletjushkina OY, et al. Suppression of injuries caused by a lytic RNA virus (mengovirus) and their uncoupling from viral reproduction by mutual cell/virus disarmament. *J Virol.* 2012; 86: 5574–5583. doi: 10.1128/JVI.07214-11.
39. Freist W, Logan DT, Gauss DH. Glycyl-tRNA synthetase. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 1996; 377: 343–356.

40. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Löffler G. Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9th ed. Berlin: Springer; 2014.
41. Motley WW, Talbot K, Fischbeck KH. GARS axonopathy: not every neuron's cup of tRNA. *Trends Neurosci.* 2010; 33: 59–66. doi: 10.1016/j.tins.2009.11.001.
42. NaWei, QianZhang, Xiang-LeiYang. Neurodegenerative Charcot–Marie–Tooth disease as a case study to decipher novel functions of aminoacyl-tRNA synthetases. 2019.
43. James N Sleight, Aleksandra M Mech, Tahmina Aktar, Yuxin Zhang, Giampietro Schiavo. Altered Sensory Neuron Development in CMT2D Mice Is Site-Specific and Linked to Increased GlyRS Levels. 2020.
44. Bird TD. GeneReviews®. Charcot-Marie-Tooth (CMT) Hereditary Neuropathy Overview. Seattle (WA); 1993.
45. Guo M, Schimmel P. Essential nontranslational functions of tRNA synthetases. *Nat Chem Biol.* 2013 Mar;9(3):145-53. doi: 10.1038/nchembio.1158. PMID: 23416400; PMCID: PMC3773598.
46. Yao P, Fox PL. Aminoacyl-tRNA synthetases in medicine and disease. *EMBO Mol Med.* 2013 Mar;5(3):332-43. doi: 10.1002/emmm.201100626. Epub 2013 Feb 21. PMID: 23427196; PMCID: PMC3598075.
47. Qin X, Hao Z, Tian Q, Zhang Z, Zhou C, Xie W. Cocrystal structures of glycyl-tRNA synthetase in complex with tRNA suggest multiple conformational states in glycylation. *J Biol Chem.* 2014 Jul 18;289(29):20359-69. doi: 10.1074/jbc.M114.557249. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24898252; PMCID: PMC4106348.
48. Saks ME, Conery JS. Anticodon-dependent conservation of bacterial tRNA gene sequences. *RNA.* 2007 May;13(5):651-60. doi: 10.1261/rna.345907. Epub 2007 Mar 22. PMID: 17379816; PMCID: PMC1852809.
49. Westhof E, Thornlow B, Chan PP, Lowe TM. Eukaryotic tRNA sequences present conserved and amino acid-specific structural signatures. *Nucleic Acids Res.* 2022 Apr 22;50(7):4100-4112. doi: 10.1093/nar/gkac222. PMID: 35380696; PMCID: PMC9023262
50. Zhaoli Yu, Zihan Wu, Ye Li, Qiang Hao, Xiaofeng Cao, Gregor M Blaha, Jinzhong Lin, Guoliang Lu, Structural basis of a two-step tRNA recognition mechanism for plastid glycyl-tRNA synthetase, *Nucleic Acids Research*, Volume 51, Issue 8, 8 May 2023, Pages 4000–4011
51. Jackson RJ, Hunt SL, Gibbs CL, Kaminski A. Internal initiation of translation of picornavirus RNAs. *Mol Biol Rep.* 1994 May;19(3):147-59. doi: 10.1007/BF00986957. PMID: 7969103; PMCID: PMC7089066.
52. <https://de.wikipedia.org/wiki/Kristallviolett>, Abrufdatum: 12.01.2025
53. Hall MP, Unch J, Binkowski BF, Valley MP, Butler BL, Wood MG, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel

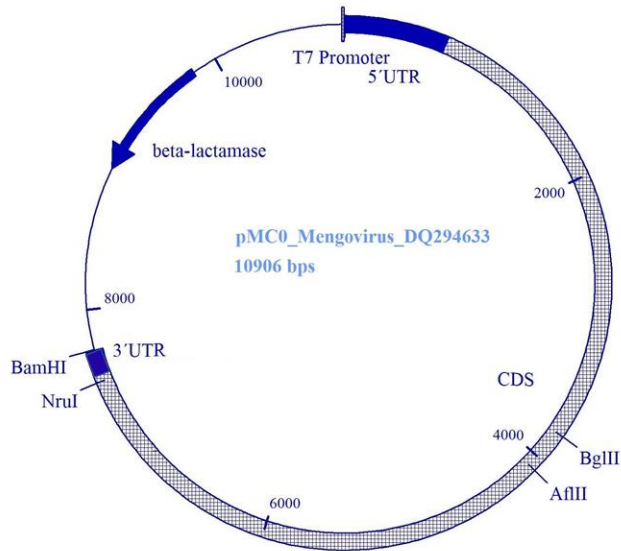
- imidazopyrazinone substrate. *ACS Chem Biol.* 2012; 7: 1848–1857. doi: 10.1021/cb3002478.
54. Dixon AS, Schwinn MK, Hall MP, Zimmerman K, Otto P, Lubben TH, et al. NanoLuc Complementation Reporter Optimized for Accurate Measurement of Protein Interactions in Cells. *ACS Chem Biol.* 2016; 11: 400–408. doi: 10.1021/acscchembio.5b00753
  55. Borman AM, Le Mercier P, Girard M, Kean KM. Comparison of picornaviral IRES-driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25: 925–932.
  56. Droß et al. Binding of Glycyl-tRNA synthetase to the 3'UTR stimulates Mengovirus RNA translation. 2024.
  57. Zhang Y, Fu X, Duan D, Xu J, Gao X. Preparation and characterization of agar, agarose, and agarpectin from the red alga *Ahnfeltia plicata*.
  58. <https://de.wikipedia.org/wiki/Agarose>, Abrufdatum: 12.01.2025
  59. <https://en.wikipedia.org/wiki/Agarpectin>, Abrufdatum: 12.01.2025
  60. Borden EC, Gary GW, Murphy FA. Comparison of agar and agarose preparations for mengovirus plaque formation. *Appl Microbiol.* 1970; 20: 289–291.
  61. CAMPBELL JB, COLTER JS. STUDIES OF THREE VARIANTS OF MENGO ENCEPHALOMYELITIS VIRUS. 3. EFFECT OF OVERLAY AND POLYANIONS OF PLAQUE SIZE. *Virology.* 1965; 25: 608–619.
  62. TAKEMOTO KK, LIEBHABER H. Virus-polysaccharide interactions. I. An agar polysaccharide determining plaque morphology of EMC virus. *Virology.* 1961; 14: 456–462.
  63. TAKEMOTO KK, LIEBHABER H. Virus-polysaccharide interactions. II. Enhancement of plague formation and the detection of variants of poliovirus with dextran sulfate. *Virology.* 1962; 17: 499–501.
  64. COLTER JS, DAVIES MA, CAMPBELL JB. STUDIES OF THREE VARIANTS OF MENGO ENCEPHALOMYELITIS VIRUS. II. INHIBITION OF INTERACTION WITH L CELLS BY AN AGAR INHIBITOR AND BY PROTAMINE. *Virology.* 1964; 24: 578–585
  65. Dianzani F, Rita G, Cantagalli P, Gagnoni S. Effect of DEAE-dextran on interferon production and protective effect in mice treated with the double-stranded polynucleotide complex polyinosinic-polycytidylic acid. *J Immunol.* 1969; 102: 24–27.
  66. Huber SA. VCAM-1 is a receptor for encephalomyocarditis virus on murine vascular endothelial cells. *J Virol.* 1994; 68: 3453–3458.
  67. Sang Lee J, Gyu Park S, Park H, Seol W, Lee S, Kim S. Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 Feb 15;291(1):158-64. doi: 10.1006/bbrc.2002.6398. PMID: 11829477.
  68. Garoff H, Hewson R, Opstelten DJ. Virus maturation by budding. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Dec;62(4):1171-90. doi:

- 10.1128/MMBR.62.4.1171-1190.1998. PMID: 9841669; PMCID: PMC98943.
69. [https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/cb\\_94092302?srsltid=AfmBOooRBAVZEgWa5V309hnXusdAeav5rZoF3M5ajFVqfQBLh218F5RH](https://www.sigmaaldrich.com/DE/de/product/sigma/cb_94092302?srsltid=AfmBOooRBAVZEgWa5V309hnXusdAeav5rZoF3M5ajFVqfQBLh218F5RH)
70. El-Badry OM, Helman LJ, Chatten J, Steinberg SM, Evans AE, Israel MA. Insulin-like growth factor II-mediated proliferation of human neuroblastoma. *J Clin Invest.* 1991; 87: 648–657. doi: 10.1172/JCI115042.
71. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_Poliomyelitis.html#doc2374544bodyText7](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Poliomyelitis.html#doc2374544bodyText7)
72. [https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_HepatitisA.html#doc2374552bodyText7](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_HepatitisA.html#doc2374552bodyText7)
73. Peltola V, Waris M, Osterback R, Susi P, Hyypiä T, Ruuskanen O. Clinical effects of rhinovirus infections. *J Clin Virol.* 2008 Dec;43(4):411-4. doi: 10.1016/j.jcv.2008.08.014. Epub 2008 Oct 2. PMID: 18835215.
74. Tariq N, Kyriakopoulos C. Group B Coxsackie Virus. 2023 Jul 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan–. PMID: 32809618.

## 10 Anhang

### 10.1 Plasmidkarten

#### 10.1.1 MV-Wildtyp

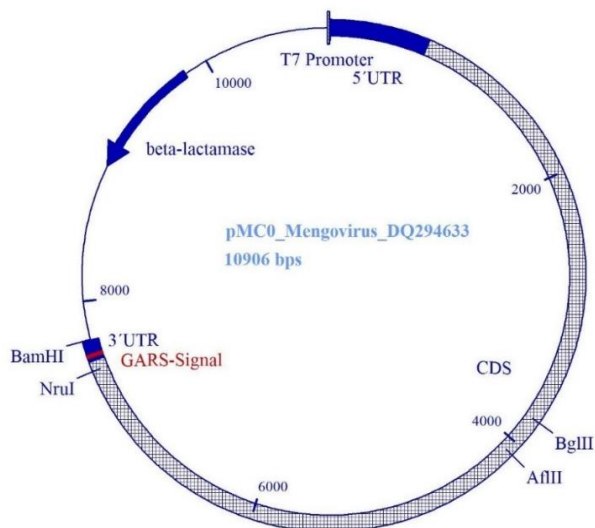


Region	Beschreibung	Start [bp]	Ende [bp]
Beta-Laktamase	Antibiotikaresistenz, welche der Selektion dient	8.970	9.828
T7-Promoter	Spezifische Sequenz, welche von der T7-Polymerase spezifisch erkannt wird und als Startpunkt der Transkription dient	10.888	10.904
5'-UTR	Untranslatierte Region am 5'-Ende	1	697
CDS	Kodierende Sequenz für das virale Polyprotein (P1, P2, P3)	698	7.579
3'-UTR	Untranslatierte Region am 3'-Ende	7.580	7.700
<i>Bam</i> HI	Restriktionsenzym		7.726

<i>Nru</i> I	Restriktionsenzym	7.501
<i>Bgl</i> II	Restriktionsenzym	3.648
<i>Afl</i> II	Restriktionsenzym	4.078

Abbildung 37. Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmids pMC0-MV-Wildtyp, sowie eine Tabelle mit Erklärungen zu den verwendeten Abkürzungen und genauen Stellen.

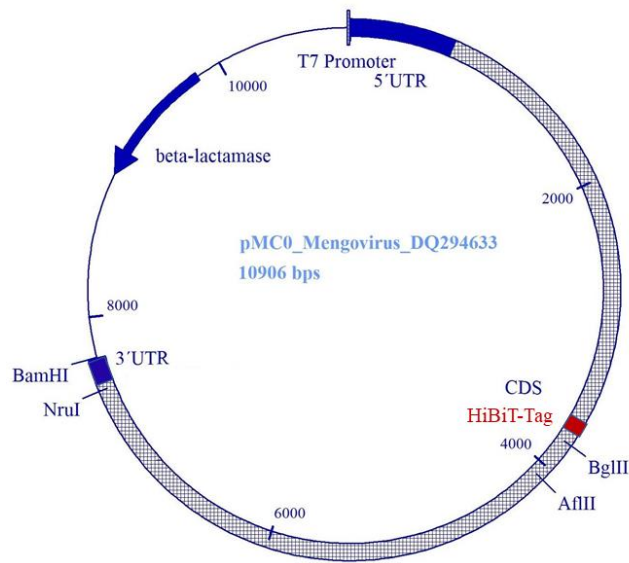
### 10.1.2 MV-3'-UTR-Mutante



Region	Beschreibung	Start [bp]	Ende [bp]
GARS-Signal	Bindungsstelle der Glycyl-tRNA-Synthetase	7.605	7.626

Abbildung 38. Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmids pMC0-MV-3'-UTR-Mutante. Rot hervorgehoben ist die in der 3'-UTR gelegene GARS-Bindungsstelle.

### 10.1.3 MV mit HiBiT



Region	Beschreibung	Start [bp]	Ende [bp]
HiBiT-Tag	11 Aminosäuren langes Tag, welches als Fusionsprotein in den Zellen exprimiert wird.	3.848	3.880

Abbildung 39. Schematische Darstellung des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmids pMC0-MV-3'-UTR-Mutante. Rot hervorgehoben ist der eingefügte HiBiT-Tag.

## 11 Publikationsverzeichnis

### 11.1 International Peer Review Journals

Fabian Droß, Tim Gödert, Selena A. Fuchshuber, Dimitar V. Nachev, Dmitri E. Andreev, Markus Fricke, Muriel Ritsch, Gesche K. Gerresheim, Simeon Repp, Yannic Noe, Oliver Rossbach, Manja Marz, Patrick Barth, Alexander Goesmann, Uwe Linne, Axel Weber, Michael Kracht, Ivan N. Shatsky, Michael Niepmann.

Binding of Glycyl-tRNA synthetase to the 3'-UTR stimulates Mengovirus RNA translation. 2025. Nucleic Acids Research, in press.

### 11.2 Konferenz Beiträge

Fabian Droß, Dimitar V. Nachev, Michael Niepmann, Tim Gödert, Selena A. Fuchshuber, Dmitri E. Andreev, Markus Fricke, Simeon Repp, Gesche K. Gerresheim, Manja Marz, Patrick Barth, Alexander Goesmann, Aleksandra Bogucka, Tim Fugmann, Ivan N. Shatsky.

The role of Glycyl-tRNA synthetase in regulation of Mengovirus translation and replication. Gesellschaft für Virologie Jahrestagung, März 2023.

## 12 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Bad Nauheim, den 20.11.2025

---

Unterschrift

### 13 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich in der Zeit meiner Doktorarbeit in jeglicher Art und Weise unterstützt haben und mir zur Seite standen.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Michael Niepmann, der mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Arbeitsgruppe im Biochemischen Institut der Justus-Liebig-Universität Gießen die Doktorarbeit anzufertigen. Dafür, all die Materialien, Laborräume und Geräte zur Verfügung gestellt zu bekommen und die exzellente Betreuung. Besonders möchte ich mich für die ganzen Tipps, Ratschläge und die Mühe bedanken, welche mir in vielen Situationen sehr weiter geholfen haben. Vor allem möchte ich mich aber für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die super angenehme Atmosphäre im Labor bedanken und sagen, dass ich mich die gesamte Zeit über wohl gefühlt habe.

Des Weiteren danke ich Frau Dr. rer. nat. G. Gerresheim für ihre super intensive Betreuung, die großartige Einarbeitung und die viele Geduld, die sie mit mir hatte. Vielen Dank für die lustigen Tage im Labor und die unzähligen gemeinsamen Mittagessen im Garten.

Ein großes Dankeschön an die gesamte AG Niepmann und das Biochemische Institut Gießen für die nette Zeit, den großartigen gemeinsamen Laboralltag, die Unterstützung und Hilfe, wann immer ich sie benötigt habe. Danke für die konstruktive Zusammenarbeit.

Bei meinen Freunden und meiner Familie möchte ich mich auch herzlich bedanken, dass ihr es mir immer verziehen habt, wenn ich zu spät kam, am Wochenende im Labor war oder einfach wenig Zeit hatte. Danke für eure mentale Unterstützung und die liebevollen Worte zu jeder Zeit!

Mein tiefster Dank gilt dem Herrn Jesus Christus. Ihm verdanke ich die Kraft, die Geduld und die Zuversicht, diesen Weg zu gehen.